

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET**

LETIZIA ANTONELLA VUKOREP

**UČINCI DUGOTRAJNE PRIMJENE HIPNOTIKA ZOLPIDEMA
U KULTURI HEK 293 STANICA
SA STABILNO EKSPRIMIRANIM GABA_A RECEPTORIMA**

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Zavod za farmakologiju i toksikologiju

PREDSTOJNIK:

Prof. dr. sc. Emil Srebočan

MENTORICE:

Dr. sc. Josipa Vlainić

Dr. sc. Jelena Šuran

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Frane Božić
2. Dr. sc. Jelena Šuran
3. Dr. sc. Josipa Vlainić
4. Prof. dr. sc. Andreja Prevendar Crnić (zamjena)

Zahvaljujem se svojim roditeljima i sestri koji su mi bili velika podrška tijekom studiranja i koji su bili uz mene kad je bilo najteže.

Zahvaljujem se i Goranu koji je bio od velike tehničke pomoći tijekom izrade rada.

Posebne zahvale mentoricama dr.sc. Jeleni Šuran i dr. sc. Josipi Vlanić na velikoj pomoći u laboratorijskom radu. Zahvaljujem im i na razumijevanju, strpljenju te neizmjerne podršci koju su mi pružale tijekom pisanja diplomskog rada.

Rad je izrađen u Zavodu za farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te Zavodu za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu.

POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. Sinteza, pohrana i razgradnja GABA-e.

Slika 2. GABA_A receptor.

Slika 3. GABA_B receptor.

Slika 4. GABA_C receptor.

Slika 5. Struktura GABA_A receptora.

Slika 6. Proteini povezani s regulacijom GABA_A receptora.

Slika 7. Vezna mjesta na GABA_A receptoru.

Slika 8. Kemijska struktura zolpidema.

Slika 9. Stanice HEK 293 u kulturi.

Slika 10. Scatchardov dijagram dobiven transformacijom podataka vezivanja.

Slika 11. Krivulja stimulacije vezivanja radioliganda.

Slika 12. Učinak dugotrajne primjene zolpidema i njegovog ustezanja na saturacijske izoterme (A) i Scatchardove krivulje (B) benzodiazepinskih veznih mjesta rekombinantnih GABA_A receptora stabilno eksprimiranih na membranama HEK 293 stanica.

Slika 13. Učinak dugotrajne primjene zolpidema i njegovog ustezanja na maksimalni broj benzodiazepinskih veznih mjesta rekombinantnih GABA_A receptora stabilno eksprimiranih na membranama HEK 293 stanica.

Slika 14. Učinak tretmana i obustavljanja dugotrajne primjene zolpidema na ekspresiju mRNA za α_1 , β_2 i γ_{2S} podjedinicu GABA_A receptora.

Slika 15. Učinak dugotrajne primjene i ustezanja zolpidema na alosteričku povezanost veznih mjesta na rekombinantnim GABA_A receptorima.

Tablica 1. Raspodjela podjedinica GABA_A receptora.

Tablica 2. Lokalizacija i funkcija pojedinih tipova GABA_A receptora (prema OLSEN i SAWYER, 2004.).

Tablica 3. Sastojci za reakciju reverzne transkripcije.

Tablica 4. Početnice za izvođenje RT-PCR reakcije.

Tablica 5. Konstanta disocijacije (K_d) benzodiazepinskih veznih mjesta GABA_A receptora nakon tretmana zolpidemom i njegovog ustezanja.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	3
2.1. γ - aminomaslačna kiselina (GABA)	3
2.1.1. Djelovanje GABA	4
2.2. Klasifikacija GABA receptora.....	6
2.2.1. GABA _A receptori.....	6
2.2.2. GABA _B receptori.....	7
2.2.3. GABA _C receptor	8
2.3. GABA _A receptori	9
2.3.1. Struktura GABA _A receptora.....	10
2.3.2. Podjedinice GABA _A receptora	10
2.3.2.1. Raspodjela podjedinica GABA _A receptora.....	12
2.3.2. Proteini povezani s GABA _A receptorima.....	13
2.3.3. Farmakološka svojstva GABA _A receptora.....	15
2.3.3.1. Mjesto vezanja GABA-e na GABA _A receptor.....	15
2.3.3.2. Mjesto vezanja benzodiazepina na GABA _A receptor.....	16
2.4. Benzodiazepini.....	16
2.5. Zolpidem.....	18
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1. Kultura embrionalnih stanica bubrega čovjeka	20
3.1.1. Materijal za uzgoj stanica	20
3.1.2. Lijekovi za tretman kulture stanica.....	21
3.2. Priprema membrana	21
3.2.1. Metoda vezanja radioaktivnog liganda za receptore	22
3.3. Konvencionalna PCR metoda.....	25

3.3.1. Izolacija ukupne stanične RNA	26
3.3.2. Reverzna transkripcija	27
3.3.3. Lančana reakcija polimerazom.....	28
3.3.4. Semikvantitativna RT-PCR metoda	29
3.3.5. Elektroforeza u gelu agaroze.....	30
3.4. Statistička obrada podataka	31
4. REZULTATI	32
4.1. Učinak dugotrajne primjene u ustezanja zolpidema na svojstva benzodiazepinskih veznih mjesta na rekombinantnim GABA _A receptorima.....	32
4.2. Učinak dugotrajne primjene i ustezanja zolpidema na ekspresiju mRNA za $\alpha 1$, $\beta 2$ i $\gamma 2S$ podjedinice GABA _A receptora	36
4.3. Učinak dugotrajne primjene i ustezanja zolpidema na alosteričku povezanost veznih mjesta na GABA _A receptorskom kompleksu	39
5. RASPRAVA.....	41
6. ZAKLJUČCI	45
7. LITERATURA	46
8. SAŽETAK.....	54
9. SUMMARY	55
10. ŽIVOTOPIS.....	56

POPIS KRATICA I SIMBOLA

ANOVA	analiza varijance
B	koncentracija vezanog liganda (bound)
BIG-2	protein uključen u transport GABA _A receptora
B _{max}	maksimalan broj veznih mjesta
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmudin -ovisna protein kinaza
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
CCA	cis-4-aminokrotonska kiselina
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat
CGP36742	(3-aminopropil)-n-butilfosfinska kiselina
COLD	potprogram EBDA-e
DMEM	medij za uzgoj stanica (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
DTT	ditiotreitol
EBDA	program za obradu podataka (Equilibrium Binding Dana Analysis)
F	F petlja
GABA	gama-aminomaslačna kiselina
GABARAP	protein povezan s GABA _A receptorom

GAD	glutamat dekarboksilaza
GODZ	protein uključen u prijenos GABA _A receptora
GPCR	G-protein povezan s receptorima
GRIF-1	GABA _A receptor interacting factor
HAP 1	protein povezan s Huntingtonovom bolesti
HEK 293	embrionirane stanice bubrega čovjeka 293
KCC2	K ⁺ -Cl ⁻ kontransporter 2
K _d	konstanta disocijacije
μM	mikro mol
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina
nM	nano mol
NMDA	N-metil-D-aspartat
PBS	puferirana otopina soli za ispiranje stanica
PCR	lančana reakcija polimerazom
PKA	protein kinaza A
PKC	protein kinaza C
Plic-1	proteini koji povezuju citoskelet i IAP-a
REM	rapid eye movement
RNA	ribonukleinska kiselina
RNaza	ribonukleaza
RT-PCR	reverzna transkripcija -PCR
SEPI	selenov bioizomer isonipekotične kiseline

SSAD	sukcinat semialdehid
T4MPA	piperidinski analog TPMPA
TACA	trans izomer CAC-e
TM	transmembranska domena
TPMPA	1,2,5,6- tetrahidropiridin metilfosfinska kiselina

1. UVOD

Otpriblike jedna trećina populacije izjavljuje da ima teškoća s usnivanjem ili ostajanjem budnim, a ponekad i oboje. Nesanica (lat. *insomnia*) je poremećaj započinjanja i održavanja sna, te predstavlja simptom uzrokovan različitim poremećajima ili kombinacijom nekoliko njih (KANDEL i sur., 2000.). U terapiji nesаницe koristi se posebna skupina lijekova - hipnotici.

Benzodiazepini u klinici kao lijekovi se počinju koristiti sredinom 1970-tih godina i postaju jedna od najčešće propisivanih skupina lijekova zbog svojeg vrlo širokog spektra djelovanja. Djeluju anksiolitički, sedativno-hipnotički, antikonvulzivno, miorelaksirajuće te izazivaju anterogradnu amneziju. Obzirom na različitu raspodjelu benzodiazepinskih receptora u mozgu te njihovom različitom sastavu (ovisno o prisutnim podjedinicama), moguće je da se anksiolitički i hipnotički učinci lijeka ne preklapaju, stoga neki benzodiazepini imaju bolji hipnotički, a drugi anksiolitički učinak. U načelu, učinak benzodiazepina ovisi o primijenjenoj dozi, tako da benzodiazepini u malim dozama imaju anksiolitički, a u većim dozama hipnotički učinak (KORPI i sur., 2002.). Benzodiazepini smanjuju latenciju za uspavlivanje, produljuju non-REM (non-rapid eye movement) fazu, skraćuju REM fazu i skraćuju trajanje sporovalnog spavanja što u načelu dovodi do poboljšanja spavanja (TREVOR i WAY, 2011.). Najveći problem pri uporabi benzodiazepina je njihov potencijal za razvoj ovisnosti i tolerancije te ponovni nastanak nesаницe (tzv. "rebound" insomnija) (BATESON, 2002.).

Na molekularnoj razini benzodiazepini djeluju preko specifičnih receptora – GABA (gama-aminomaslačna kiselina) receptora tipa A ($GABA_A$). $GABA_A$ receptori su ionotropni transmembranski glikoproteini, sastavljeni od polipeptidnih podjedinica koje okružuju centralni anionski kanal. Protokom iona klora kroz tako formirani kanal regulira se podražljivost neurona (TRETTER i sur., 1997.; BAUMANN i sur., 2002.). Farmakološka svojstva receptora ovise o sastavu podjedinica, mjestu u organizmu na kojem se pojedini receptor nalazi, te smještaju samog receptora u stanici (OLSEN i SIEGHART, 2008.). Danas se smatra da većina $GABA_A$ receptora nastaje kombinacijom α , β i γ podjedinica te da je najzastupljeniji podtip $GABA_A$ receptora u mozgu $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (~60%) (KORPI i sur., 2002.). Ovako sastavljen receptor odgovoran je

za sedativno, amnestičko, a dijelom i antikonvulzivno djelovanje supstanci i lijekova koje se za njega vežu (SIEGHART, 1995.).

Različite tvari (alkohol, inhalacioni anestetici, neuroaktivni steroidi, barbiturati, benzodiazepini) djeluju putem veznih mjesta na GABA_A receptoru u smislu povećanja učinaka GABA-e. S farmakološkog i kliničkog gledišta najznačajnije vezno mjesto na GABA_A receptoru je vezno mjesto za benzodiazepine (DUNN i sur., 1994.; SIEGHART, 1995.; BATESON, 2002.).

Sva su vezna mjesta na receptoru alosterički povezana, pa vezanje liganda za jedno vezno mjesto dovodi do konformacijskih promjena samog receptora. Takove promjene utječu na svojstva i afinitet vezanja drugih liganada na ostalim receptorskim veznim mjestima, a također i na GABA-om inducirani protok iona klora (BEREZHNOY i sur., 2005.).

Neselektivnosti hipnotika prve (diazepam) i druge generacije (nitrazepam, ciklobarbital), te posljedični neželjeni učinci, i visoki potencijal za razvoj ovisnosti i tolerancije bili su poticaj za razvoj nove generacije hipnotika, koji bi bili selektivniji za pojedini podtip GABA_A receptora. Jedan takav danas u uporabi je imidazopiridin zolpidem (N,N,6-trimetil-2-(4-metilfenil)-imidazo(1,2-a)piridin-3-acetamid), hipnotik treće generacije koji se selektivno veže na jedan podtip GABA_A receptora (receptore koji u svom sastavu imaju α_1 podjedinicu). Zolpidem skraćuje vrijeme uspavlivanja i produljuje ukupno trajanje spavanja. Preporuka je koristiti ga samo u kratkotrajnom liječenju nesanice, što često nije slučaj. Istraživanja su, suprotno ranijem vjerovanju kako zolpidem ne izaziva toleranciju i ovisnost (SANGER i sur., 1999.) pokazala upravo suprotno, stoga se ne preporučuje njegovo uzimanje dulje od 4 tjedna bez liječničkog nadzora (PAGE i sur., 2002.).

Cilj rada je istražiti učinke dugotrajnog tretmana hipnotikom zolpidemom kao i učinke obustavljanja nakon dugotrajne primjene kroz istraživanje njegovog djelovanja na GABA_A receptore. Istraživanje smo proveli u *in vitro* uvjetima primjenom odabranih lijekova i njihovom kombinacijom u kulturu stanica sa stabilnom ekspresijom rekombinantnih $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ GABA_A receptora.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

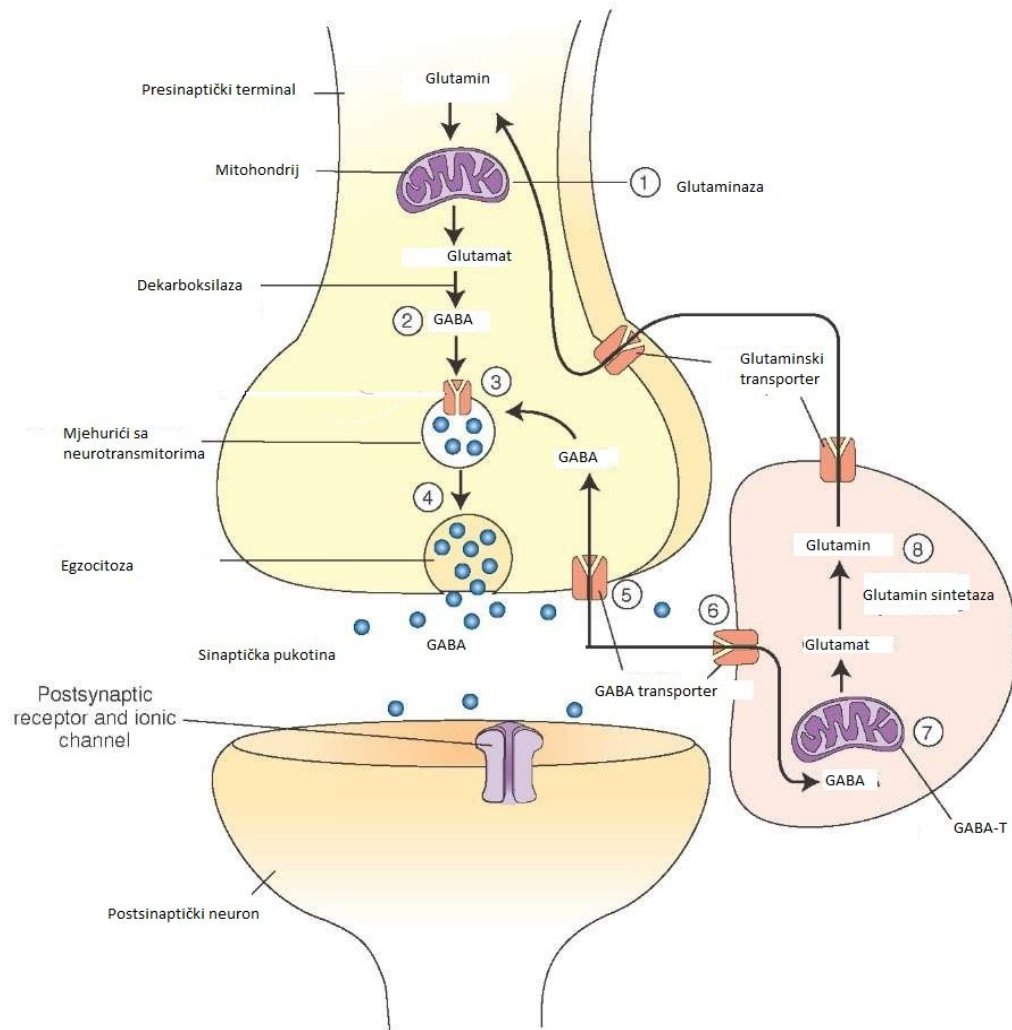
2.1. γ - aminomaslačna kiselina (GABA)

Gama- aminomaslačna kiselina (GABA, engl. gamma aminobutyric acid) je najvažniji inhibicijski neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu sisavaca. U mozgu GABA djeluje kao postsinaptički inhibicijski neurotransmiter, a u kralježničkoj moždini uzrokuje i presinaptičnu inhibiciju. Tijekom prenatalnog razvoja GABA djeluje kao ekscitacijski neurotransmiter te trofički, poticanjem razvoja i sazrijevanja živčanog sustava (BEN ARI i sur., 2002.).

U tkivu mozga GABA-u nalazimo u malim količinama (primjerice nigrostrijatalni sustav sadrži oko 10 μ mol GABA-e/g, a siva tvar 2-5 μ mol GABA-e/g tkiva) dok je u ostalim tkivima sisavaca ima samo u tragovima (RANG i sur., 2006.). Koncentracija GABA-e u mozgu je 200-1000 puta veća od koncentracije drugih neurotransmitera, kao što su noradrenalin ili acetilkolin, pa se smatra da je riječ o jednom od najdjelotvornijih neurotransmitera u središnjem živčanom sustavu (WEI i WU, 2008.). Prema nekim procjenama oko 40% svih neurona u mozgu izlučuje GABA-u kao neurotransmiter (SNYDER, 1996.).

Prvi korak u sintezi GABA-e je pretvorba α - ketoglutarata , koji nastaje u Krebsovom ciklusu, enzimom α - ketoglutaratnom transaminazom (GABA-T) u L- glutamat. Dekarboksilaza glutaminske kiseline (GAD) uz koenzim vitamin B₆ katalizira dekarboksilaciju L- glutamata do GABA-e. Enzim GAD se javlja samo u neuronima koji koriste GABA-u kao neurotransmiter. Postoje dva oblika GAD-a, a to su GAD₆₅ i GAD₆₇ (OLSEN i DELOREY, 1999.). GAD₆₅ se aktivira fosforilacijom dok se GAD₆₇ inhibira. Protein kinaza A (PKA) i protein kinaza C (PKC) su proteini koji su odgovorni za fosforilaciju i regulaciju ova dva izomera GAD-a (WEI i WU, 2008.). Sintetizirana GABA se pohranjuje u mjehuriće (sinaptičke vezikule), odakle u slučaju potrebe za prijenosom signala (uglavnom inhibicijskog) egzocitozom izlazi iz mjehurića i ulazi u sinaptičke pukotine. Nakon otpuštanja GABA, posredovanjem GABA transporterom, ide u presinaptički živčani završetak ili u glija stanice gdje se razgrađuje (Slika 1.). U glija stanicama dolazi do razgradnje GABA-e reakcijom transaminacije u kojoj se amino skupina prenosi na α -oksoglutaru kiselinu da bi se otpustio glutamat (također neurotransmiter). U ovoj reakciji koja je katalizirana

enzimom GABA- transaminazom nastaje sukcinat semialdehid (SSAD). SSAD enzimom sukcinat dehidrogenazom prelazi u sukcinat koji potom ulazi u Krebsov ciklus (RANG i sur., 2006.).



Slika 1. Sinteza, pohrana i razgradnja GABA-e.

(Izvor: <http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/04/tmp1470.jpg>)

2.1.1. Djelovanje GABA

GABA se oslobađa iz lokalnih interneurona (RANG i sur., 2006.) koji su prisutni posebice u korteksu, hipokampusu, hipotalamusu, malom mozgu, olfaktornom bulbusu, ali i u cijelom središnjem živčanom sustavu i kralježničkoj

moždini. Osim u neuronima, GABA je prisutna primjerice i u β - stanicama Langerhansovih otočića gušterače (TILLAKARATNE i sur., 1995.).

GABA djeluje kao inhibicijski neurotransmitor u različitim signalnim putevima u središnjem živčanom sustavu u kojem se oslobađa uglavnom iz kratkih interneurona, iako može i iz drugih GABAergičnih putova koji dolaze do maloga mozga i strijatuma (RANG i sur., 2006). Kada podražaj dođe do sinapse (mješnasta zadebljanja aksonskih membrana) sinaptičke vezikule u kojima je pohranjena GABA stapaju se s presinaptičkom membranom i na taj način se otpušta GABA-u u sinaptičku pukotinu. Naime, zbog pristiglog električnog podražaja sinaptička membrana postaje propusna za ione kalcija (Ca^{2+}) pa se njihova koncentracija povisuje unutar stanice. To dovodi do fuzije membrana sinaptičkih vezikula sa staničnom membranom te se GABA oslobađa procesom egzocitoze (KARLSON, 1993.). Nakon toga GABA difundira kroz sinapsu do subsinaptičke membrane neurona i veže se na postsinaptički smještene $GABA_A$ receptore gdje djeluje inhibicijski ili, u posebnim slučajevima, ekscitacijski (BEN ARI i sur., 2002.). Vežanje GABA-e na $GABA_A$ receptore dovodi do povećane provodljivosti kloridnih iona (Cl^-) što rezultira hiperpolarizacijom membrane i posljedičnom smanjenom podražljivošću neurona. Kratkotrajno izlaganje postsinaptičkih $GABA_A$ receptora visokim koncentracijama GABA-e uzrokuje brzo otvaranje ionskih kanalića i stvaranje brze inhibicije.

Važno je napomenuti da osim postsinaptičkih $GABA_A$ receptora postoje i ekstrasinaptički GABAergični receptori koji su stalno izloženi niskim koncentracijama GABA-e. Takvi receptori imaju visoki afinitet ali malu efikasnost vežanja GABA-e i njihova aktivacija dovodi do toničke inhibicije živčanog sustava (FARRANT i NUSSER, 2005.).

Za GABAergične sinapse posebno važnu ulogu ima promjena u koncentraciji iona klorida (Cl^-) tijekom razvojnog procesa. Naime, sinapse koje su u odrasloj dobi inhibitorne tijekom neonatalnog razvoja su ekscitacijske (BEN ARI i sur., 2002.). Okidač za takovu promjenu djelovanja GABA-e i GABAergičnog živčanog prijenosa signala iz ekscitacijskog u inhibicijski može biti pojava kloridnog transportera (KCC2) kasnije tijekom razvoja živčanog sustava jedinke koji mijenja ravnotežu Cl^- potencijala u još izraženiju hiperpolarizaciju. Ekscitatorna GABAergična transmisija

važna je za razvoj nekih drugih signalnih sustava koji su dio središnjeg živčanog sustava. Tako primjerice u neonatalnom hipokampusu ekscitacijski GABA_Aergični signal može doprinijeti aktivaciji NMDA (N-metil-D-aspartatni) receptora i razvoju glutamatergičnih sinapsa (CRAIG i LICHTMAN, 2001.).

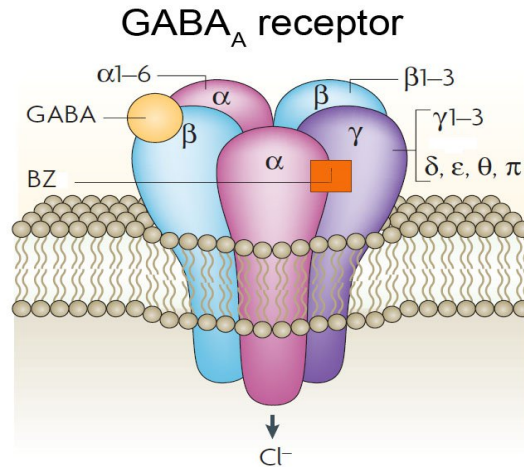
Neurotransmitor GABA ima važnu ulogu u prijenosu živčanih informacija, a posredno je uključena i u kontrolu brojnih funkcija u organizmu. Otpuštena GABA svoje učinke ostvaruje vezanjem na dvije glavne klase receptora: GABA_A (s podskupinom ro odnosno GABA_C) i GABA_B.

2.2. Klasifikacija GABA receptora

GABA djeluje na tri različite vrste receptora: GABA_A receptori (koji u svom sastavu imaju ionski kanal), GABA_B receptori (vezani na G- proteine) i GABA_C receptori (koji se novom nomenkalturom svrstavaju u porodicu GABA_A receptora; te se još nazivaju ρ (ro) receptori) (OLSEN i SIEGHART, 2008.).

2.2.1. GABA_A receptori

GABA_A receptori su transmembranski proteini koji imaju pentamernu strukturu, odnosno sastoje se od pet podjedinica (svaka s četiri transmembranska segmenta) iz nekoliko skupina polipeptida (α , β , γ , δ , ϵ , π , ρ , Θ). Unutar iste skupine polipeptida okarakterizirane su višestruke varijante tvz. izoforme (TREVOR i WAY, 2011.). Na ove receptore vežu se barbiturati, benzodiazepini, opći anestetici, alkoholi, GABA, konvulzivi i steroidi (OLSEN i SIEGHART, 2008.) (Slika 2.).



Slika 2. GABA_A receptor.

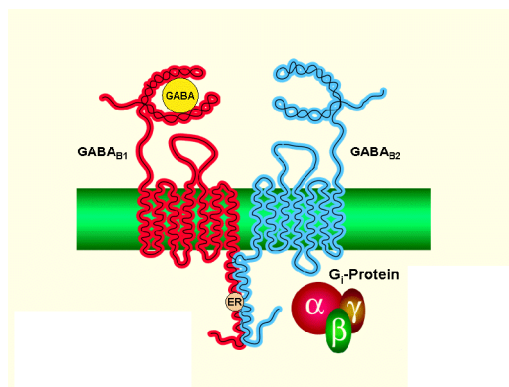
(Izvor: <http://www.pharmacology.us/634546288086850239GABA%20receptor.jpg>)

2.2.2. GABA_B receptori

GABA_B receptori su metabotropni receptori spregnuti s G- proteinom (G-protein coupled receptors, GPCR). Ovi receptori, ovisno o njihovom smještaju u stanici, ili inhibiraju Ca²⁺ kanaliće ili aktiviraju K⁺ kanaliće (RANG i sur., 2006.). Smješteni su presinaptički i postsinaptički te periferno u autonomnom živčanom sustavu te u skladu s time uzrokuju presinaptičku i postsinaptičku inhibiciju (TREVOR i WAY, 2011.).

U središnjem živčanom sustavu GABA_B receptori velikim su dijelom smješteni presinaptički gdje inhibiraju oslobađanje pojedinih ekscitacijskih neurotransmitora kao što su glutamat i aspartat. GABA_B receptori nađeni su i na živčanim okrajcima postganglijskih kolinergičnih neurona parasimpatikusa u bronhalnoj muskulaturi i na bronhalnim okrajcima senzornih tahikininskih neurona (VIGOT i sur., 2006). Za razliku od GABA_A receptora koji su ionski kanali, GABA_B receptori povezani su s kalcijevim i kalijevim kanalićima. GABA_B receptori koji su vezani uz ionske kanale kalcija, uzrokuju blokadu ovih kanalića tako da sprječavaju otvaranje kalcijevih kanalića i povećavaju provodljivosti za ione kalija te time sprječavaju oslobađanje neurotransmitora. Otvaranjem kalijevih kanalića, dolazi do izlaska iona kalija što rezultira hiperpolarizacijom i inhibicijskim učinkom (RANG i sur., 2006.).

Postoje dvije podjedinice GABA_B receptora- GABA_{B1} (GABA_{B1a} i GABA_{B1b}) i GABA_{B2} podjedinica, koje tvore funkcionalan receptor najčešće u obliku dimera (VIGOT i sur., 2006.) (Slika 3.).



Slika 3. GABA_B receptor.

(Izvor: <http://www.pharma.uzh.ch/research/signaltransduction/introduction/fig3.gif>)

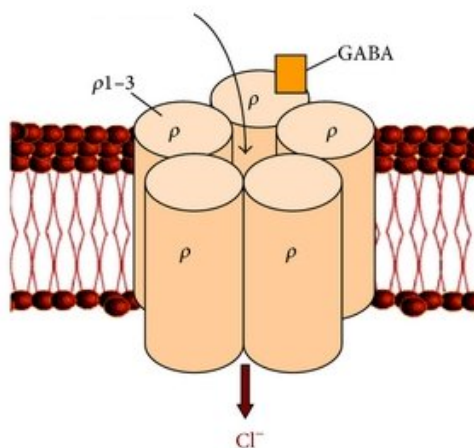
Najvažniji selektivni agonist ovog receptora je baklofen ((RS)- β-aminometil-β- (4-klorofenil- propanoična kiselina)). Baklofen je nastao kao rezultat potrage za tvari sličnoj GABA-i koja bi prolazila krvno-moždanu barijeru i bila učinkovita u kontroli epilepsije i drugih konvulzivnih stanja. Rabi se u liječenju spastičnosti i bolesti motoričkog sustava upravo zbog inhibicijskog učinka na receptore u kralježničkoj moždini (KRACH, 2001.). Baklofen inhibira otpuštanje transmitora, no za razliku od GABA-e ostvaruje slabu postsinaptičnu inhibiciju, a njegova se aktivnost ne može blokirati bikuklinom (RANG i sur., 2006). Kompetitivni antagonisti GABA_B receptora uključuju brojne eksperimentalne tvari kao što je saklofen.

2.2.3. GABA_C receptor

GABA_C receptori su najmanje proučeni GABAergični receptori. Od GABA_A i GABA_B receptora djelomično se razlikuju po svojim fiziološkim, farmakološkim i molekularno- biološkim svojstvima, iako su novom nomenklaturom pripojeni GABA_A receptorima zbog sličnosti (Slika 4.).

GABA_C receptori sastoje se od pet podjedinica (homooligomeri ili pseudohomooligomerni), a svaka podjedinica ima veliku vanstaničnu N- terminalnu i

vanstaničnu C- terminalnu domenu i četiri transmembranske domene (TM 1-4) (slično GABA_A receptorima). Postoje tri podjedinice GABA_C receptora koje nazivamo rho (ρ₁₋₃). Ovi receptori razmješteni su u različitim regijama živčanoga sustava. Postoje dokazi da su ovi receptori pronađeni u mrežnici, leđnoj moždini, kolikulusu, hipofizi i gastrointestinalnom traktu (BORMANN, 2000.). Agonisti ovih receptora su GABA, CAC (cis-4-aminokrotonska kiselina), TACA (trans izomer CAC-e), (+)-cAMP (ciklički adenosin monofosfat) i muscimol. Antagonisti ovih receptora su, među ostalim, TPMPA (1,2,5,6,-tetrahidropliridin metilfosfinska kiselina), PPA (polifosforna kiselina), P4MPA (piperidinski analog TPMPA), SEPI (selenov bioizomer isonipekotične kiseline), CGP36742 (3-aminopropil)-n-butilfosfinska kiselina) (JOHNSTON i sur., 2003.). Ovi su receptori relativno neosjetljivi na djelovanje bikuklina, benzodiazepina, barbiturata i općih anestetika. Važno je reći da GABA ove receptore otvara pri nižim koncentracijama, a otvorenost kanala traje duže (BORMANN, 2000.).



Slika 4. GABA_C receptor.

(Izvor: <http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2014/149187.fig.002.jpg>)

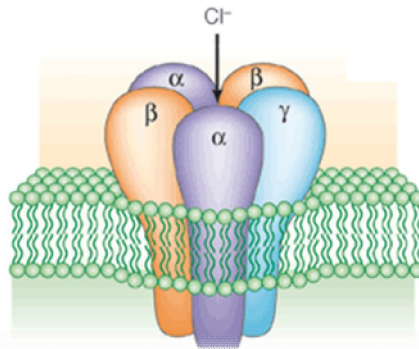
2.3. GABA_A receptori

GABA_A receptor je član velike obitelji ligandom povezanih ionskih kanalića u koju su uključeni glicinski, nikotin- acetilkolinški i 5-hidroksitriptamin (serotoninski tip 3) receptori. Smješteni su postsinaptički (RANG i sur., 2006.) i najvažniji su

inhibicijski receptori u središnjem živčanom sustavu te su prisutni na membranama oko 40% neurona (OLSEN i SIEGHART, 2008.).

2.3.1. Struktura GABA_A receptora

GABA_A receptor je heteromer kojeg oblikuje pet podjedinica a svaka podjedinica sastoji se od velike vanstanične N- terminalne i unutarstanične C-terminalne domene, četiri transmembranske domene (TM 1-4) te velike unutarstanične petlje između TM3 i TM4. Podjedinice GABA_A receptora su složene tako da se između njih nalazi pora ili kanal koji može biti otvoren ili zatvoren, a propusan je za anione (ione klora, Cl⁻) (Slika 5.). Izlučeni neurotransmiter mijenja konformaciju proteina pa kanalić ostaje otvoren, propuštajući pritom ione klora. Time se povećava negativni naboj s unutrašnje strane stanične membrane te dolazi do hiperpolarizacije i smanjenja podražljivosti stanice (FARRANT i NUSSER, 2005.). Zbog tih svojstava postsinaptičkog receptora GABA je neurotransmitor koji posreduje brzu sinaptičku inhibiciju (BAUMANN i sur., 2002.).



Slika 5. Struktura GABA_A receptora.

(Izvor: <http://www.nature.com/nrn/journal/v6/n7/images/nrn1703-i1.gif>)

2.3.2. Podjedinice GABA_A receptora

GABA_A receptori uglavnom su oblikovani od pet podjedinica (iako postoje receptori kao dimeri i trimeri), a do danas je izolirano sedam porodica podjedinica iz

živčanog sustava sisavaca, a to su: α , β , γ , δ , ϵ , π , ρ i Θ (OLSEN i SIEGHART, 2008.). Svaku od proteinskih podjedinica kodira odvojeni gen, tako da je poznato oko 18 gena za podjedinice GABA_A receptora. Prema nekim procjenama moguće je više stotina njihovih kombinacija podjedinica, no treba naglasiti da sve kombinacije nisu funkcionalno djelatne, tj. vezanje GABA-e na svaki od tih receptora uzrokovati otvaranje ionskog kanala i prolaz kloridnih iona, te je do sada sa sigurnošću pronađeno 13 podtipova receptora u središnjem živčanom sustavu sisavaca (OLSEN i SIEGHART, 2008.).

- Alfa (α) podjedinica: postoji šest izoforma α polipeptida (α_{1-6}) koje se razlikuju prema građi i veličini.
- Beta (β) podjedinica: postoje četiri izoforme β podjedinice (β_{1-4}) koje su različito razmještene. Beta podjedinice su prijeko potrebne za vezanje GABA-e.
- Gama (γ) podjedinica: postoje tri izoforme γ podjedinice (γ_{1-3}). Nazočnost ove podjedinice u GABA_A receptoru znatno utječe na provodljivost ionskog kanala, desenzitaciju i na afinitet vezanja benzodiazepina.
- Delta (δ) podjedinica: postoje tri izoforme δ podjedinice (δ_{1-3}). Ova podjedinica najčešće je udružena s α_4 i α_6 podjedinicom.
- Epsilon (ϵ) podjedinica je opisana u bazalnim ganglijama mozga. Receptori s ovom podjedinicom su neosjetljivi na intravenske anestetike (propofol).
- Pi (π) podjedinica: ova podjedinica je identificirana u tkivu reproduktivnog sustava čovjeka i štakora.
- Rho (ρ) podjedinica: Imunohistokemijom mrežnice prepozante su tri ρ podjedinice (ρ_{1-3}). Za ovu podjedinicu smatra se da ne sudjeluje u oblikovanju GABA_A receptora već samo u oblikovanju GABA_C receptora.
- Theta (Θ) podjedinica: ovo je zadnja identificirana podjedinica koja zajedno sa α , β i γ podjedinicom čini funkcionalni receptor.

2.3.2.1. Raspodjela podjedinica GABA_A receptora

GABA_A receptori pronađeni su i izvan živčanoga tkiva; u hipofizi, epitelu koroidnog pleksusa, α_2 -stanicama gušterače, uterusu i probavnom sustavu (TILLAKARATNE i sur., 1995.). Svaka podjedinica GABA_A receptora pokazuje specifičnu tkivnu i staničnu lokalizaciju (TREVOR i WAY, 2011.). Podjedinica α_1 je lokalizirana u staničnim membranama gotovo svih stanica središnjeg živčanog sustava, dok je α_2 podjedinica ograničena na akso-aksonskim sinapsama u pojedinim stanicama. Podjedinice α_2 , α_3 i α_5 , koje su udružene sa β_3 podjedinicom nalaze se u stanicama koje su osim na GABA-u osjetljive i na druge neurotransmitore (OLSEN i SAWYER, 2004.).

Tablica 1. Raspodjela podjedinica GABA_A receptora.

PODJEDINICE	DISTRIBUCIJA PODJEDINICA
α_1	najrasprostranjenija podjedinica u središnjem živčanom sustavu
α_2	njušne lukovice, strijatum, dentatni girus, amigdala, hipotalamus
α_3	njušne lukovice, amigdala, kora, kolikuli
α_4	talamus, dentatni girus, bazalne stanice, olfaktorne tuberkule
α_5	hipotalamus, njušne lukovice, Amonov rog
α_6	granularne stanice maloga mozga
β_2	najrasprostranjenija β podjedinica
γ_1	amigdala, supstanija nigra
$\delta + \alpha_4$	talamus, strijatum, kora
$\delta + \alpha_6$	mali mozak
E	amigdala, talamus, jezgra hipotalamusa
Π	hipokampus, temporalni korteks
P	kolikuli, Purkinjeve stanice, amigdala, talamus
Θ	hipotalamus, amigdala, hipokampus

Receptori se većinom sastoje od α , β i γ kombinacija (WHITING i sur., 2000.). Najčešće kombinacije su α_1 , β_2 i γ_2 , potom slijede α_1 , β_2 i γ_2 , te α_2 , β_3 i γ_2 kombinacija (OLSEN i SIEGHART, 2008.). Smatra se da podjedinice δ , ϵ i π mogu zamjeniti γ podjedinicu u receptorima, kao što bi i Θ podjedinica mogla zamjeniti β podjedinicu (BARRERA i sur., 2008.).

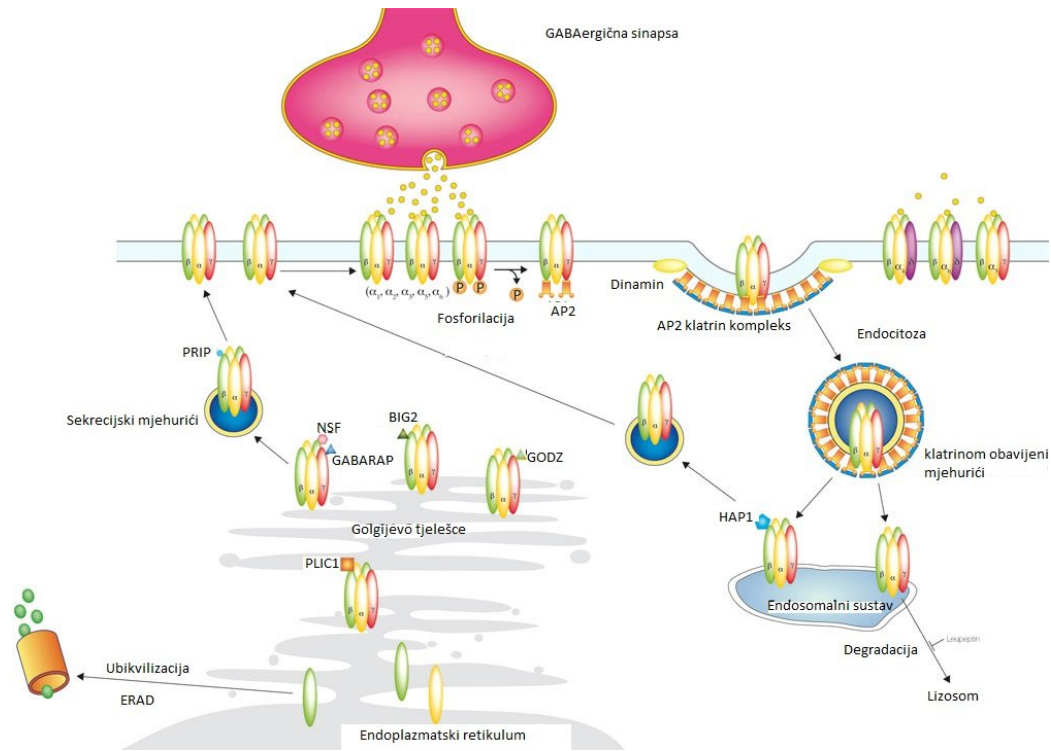
Tablica 2. Lokalizacija i funkcija pojedinih tipova GABA_A receptora
(prema OLSEN i SAWYER, 2004.).

KOMBINACIJA PODJEDINICA	LOKALIZACIJA	FUNKCIJA
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	GABA _A gični neuroni	sedacija, antikonvulzivno djelovanje
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	kralježnička moždina, telencefalon	miorelaksacija
$\alpha_2\beta_1\gamma_1$	glija stanice	
$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	Kora	antikonvulzivna
$\alpha_4\beta_2\gamma_2$	talamus, dentatni girus	
$\alpha_4\beta_2\delta$	talamus, girus dentate	tonička inhibicija
$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	hipokampus, Amonov rog, senzorni gangliji	tonička inhibicija
$\alpha_6\beta_2\gamma$	granulirane stanice malog mozga	
$\alpha_6\beta_2\delta$	granulirane stanice malog mozga	tonička inhibicija

2.3.2. Proteini povezani s GABA_A receptorima

Ionotropni GABA_A receptori su mete pojedinih protein kinaza (podjedinice GABA_A receptora fosforiliraju se na TM3 i TM4 petlji): cAMP ovisna protein kinaza A (PKA ovisna o cikličkom adenozin monofosfatu), protein kinaza C (PKC), Ca²⁺/kalmodulin ovisna kinaza (CaMKII) i ciklički gvanozin- monofosfat (cGMP) (Slika 6.). Enzimi PKA, PKC, CaMKI i cGMP- ovisne protein kinaze fosforiliraju β podjedinice modulirajući pritom aktivnosti receptora, a PKC i CaMKII fosforiliraju i γ podjedinice. PKA je kinaza koji uzrokuje smanjenu regulaciju funkcije receptora i

poboljšava desenzibilizaciju. U mrežnici i Purkinjeovim vlaknima kinaze se aktiviraju putem G- protein udruženih receptora (GPCR) stimulirajući pritom djelovanje GABA_A. PKC djeluje suprotno inhibirajući funkciju GABA_A receptora. CaMKI i CaMKII su o kalciju ovisne protein kinaze, a lokalizirane su na presinaptičkim i postsinaptičkim membranama (MALENKA i SIEGELBAUM, 2001.).



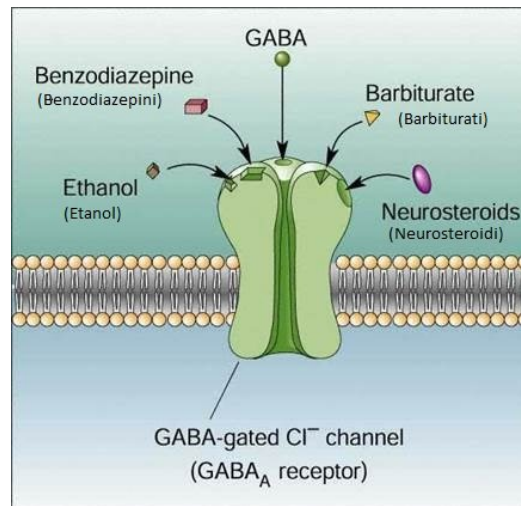
Slika 6. Proteini povezani s regulacijom GABA_A receptora.

(Izvor: http://www.frontiersin.org/files//fmol-01-007/image_m/fmol-01-007-g002.jpg)

Sinaptičku lokalizaciju i unutarstanični prijenos GABA_A receptora reguliraju brojni proteini: GABARAP (GABA_A receptor associated protein), gefirin, Plic -1 (protein linking IAP and cytoskeleton), HAP (Huntingtin- Associated protein), GRIF-1 (GABA_A receptor interacting factor), GODZ (Golgi specific DHHC zinc finger protein), BI2 (brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor) i brojni drugi (Slika 6.).

2.3.3. Farmakološka svojstva GABA_A receptora

GABA_A receptori su po svom molekularnom sastavu veoma heterogeni pa se to odražava i na farmakološke osobine receptora (KORPI i sur., 2002.). Različite tvari značajne s farmakološkog gledišta (alkohol, inhalacioni anestetici, neuroaktivni steroidi, barbiturati, benzodiazepini, konvulzivi, furosemid, klopazin, loreklezol...), djeluju putem veznih mjesta na GABA_A receptoru u smislu povećanja učinaka GABA-e (Slika 7.). Na GABA_A receptor se vežu i tvari koje nemaju terapijske učinke (poput iona Ca²⁺, H⁺, Zn²⁺, La³⁺, Al³⁺). S farmakološkog i kliničkog gledišta, osim veznog mjesta za sam neurotransmitor, najznačajnije vezno mjesto na GABA_A receptoru je vezno mjesto za benzodiazepine (BATESON, 2002.).



Slika 7. Vezna mjesta na GABA_A receptoru.

(Izvor: <http://o.quizlet.com/57Yf5gvdpkUu1vjTGSK5rQ.jpg>)

2.3.3.1. Mjesto vezanja GABA-e na GABA_A receptor

GABA se veže na dodirnoj plohi α i β podjedinica, te tako slijedom ranije navedenog, većina funkcionalnih GABA_A receptora ima dva vezna mjesta za GABA-u (MACDONALD i OLSEN, 1994.). Vezanje GABA-e na receptor uzrokuje otvaranje kloridnoga kanalića i putovanja iona klorida u smjeru koncentracijskog gradijenta. Na GABA_A receptoru postoje dva tipa veznih mjesta za GABA-u: mjesto visokog i mjesto niskoga afiniteta (FARRANT i NUSSER, 2005.). Većina GABA_A

receptora se aktivira putem veznih mjesta niskog afiniteta što podrazumijeva visoke koncentracije GABA-e za otvaranje ionskih kanalića. Smatra se da vezna mjesta visokog afiniteta predstavljaju samo konformacijsku varijantu upravo tog veznog mjesta. Osim GABA-e, na GABA_A receptore vežu se muscimol i izoguvacin kao agonisti GABA-e, te kompetitivni inhibitori bikuklin i gabazin, koji blokiraju GABA-u (BAUR i SIEGEL, 2003.). Muscimol je jak agonist GABA_A receptora koji hiperpolarizira neurone dobiven je iz halucinogene gljive dok je bikukulin konvulziv prirodnog podrijetla koji blokira brzi inhibicijski potencijal u najvećem broju sinapsa u središnjem živčanom sustavu (RANG i sur., 2006.).

2.3.3.2. Mjesto vezanja benzodiazepina na GABA_A receptor

Benzodiazepini se vežu na dodirnoj plohi između α ($\alpha_{1,2,3,5}$) i γ podjedinice na izvanstaničnom, N-terminalnom kraju GABA_A receptora, te potenciraju učinak GABA-e povećavajući učestalost otvaranja kloridnih kanala (PRITCHETT i sur., 1989.). Većina benzodiazepina se neselektivno veže na sve receptore koji imaju jednu od $\alpha_{1,2,3,5}$ podjedinica. U novije vrijeme u kliničku upotrebu su uvedeni lijekovi koji imaju selektivno ili djelomično selektivno vezivanje na određeni podtip receptora, te tako ostvaruju samo neke učinke. Tako su primjerice imidazopiridin zolpidem, triazilipridazini (CL 218872), betakarbolin β - CCE i pirazolokvinolini selektivni ligandi. Benzodiazepini, kao što je primjerice diazepam, se ne vežu na receptore u malom mozgu u čijem sastavu je α_6 podjedinica i na receptore u korteksu i talamusu koji sadrže α_4 podjedinicu (KORPI i SINKONNEN, 2006.).

2.4. Benzodiazepini

Benzodiazepini su anksiolitici, sedativi, hipnotici vrlo raširene uporabe. Svi imaju strukturu 1,4- ili 1,5- benzodiazepina, a većina sadržava karboksilnu skupinu u sedmeročlanom heterocikličkom prstenu (TREVOR i WAY, 2011.). Benzodiazepini prvenstveno djeluju povećavajući frekvenciju otvaranja klornih kanalića u prisutnosti GABA-e (BEREZHNOY i sur., 2005.), dok u odsutnosti GABA-e nemaju utjecaj na aktivaciju GABA_A receptora.

Učinci benzodiazepina su:

a) Anksiolitički i sedativni učinak

Benzodiazepini imaju anksiolitički učinak pri niskim dozama a primjenjuju se kod anksioznih bolesnika koji pokazuju napetost, strah i tjeskobu (TREVOR i WAY, 2011.). Naime, u većini slučajeva pri niskim dozama suprimirane su razne psihomotoričke i kognitivne funkcije. Ovi lijekovi u većim dozama uzrokuju sedaciju, ataksiju, somnolentnost, a u još većim dozama nastupa hipnotički učinak. Benzodiazepini izazivaju anterogradnu amneziju koja ovisi o dozi (BATESON, 2002.).

b) Hipnotički učinak

Svi benzodiazepinski sedativi odnosno hipnotici potiču spavanje ako se primjene u dovoljno visokoj dozi, no ovisno o specifičnim svojstvima lijeka, primijenjenoj dozi i učestalosti primjene. Opći učinci benzodiazepina na obrascu normalnog spavanja su smanjenje latencije za uspavljivanje, produljeno trajanje non-REM faze (non - rapid eye movement), skraćena REM (rapid eye movement) faza i skraćeno trajanje sporovalnog spavanja. Slično djeluje i zolpidem koji skraćuje REM spavanje ali ima minimalan učinak na sporovalno spavanje. Uporaba benzodiazepinskih sedativa u vremenu duljem od 1 do 2 tjedna ,-može dovesti do razvoja tolerancije na hipnotički učinak i nastanka tzv. "rebound" insomnije (BATESON, 2002.; HAJAK i sur., 2003.).

c) Anestetsko djelovanje

Visoke doze određenih benzodiazepinskih lijekova koriste se kao pomoćno sredstvo prilikom opće anestezije. Istovremeno, oni mogu pridonijeti ustrajnoj post-anestetskoj respiracijskoj depresiji zbog depresijskog učinka na SŽS.

d) Antikonvulzini učinak

Brojni benzodiazepinski lijekovi inhibiraju razvoj i širenje epileptiformne električne aktivnosti u središnjem živčanom sustavu. Nekoliko benzodiazepina (klonazepam, lorazepam, diazepam, nitrazepam) dovoljno je selektivno p svom djelovanju da mogu biti klinički upotrebljavani u kontroli epileptičnih napadaja.

e) Miorelaksirajući učinak

Neki benzodiazepini imaju inhibicijski učinak na poli-sinaptičke reflekse i prijenos impulsa u interneuronima kralježničke moždine, a pri visokim dozama mogu smanjiti prijenos signala u neuromišićnoj spojnici.

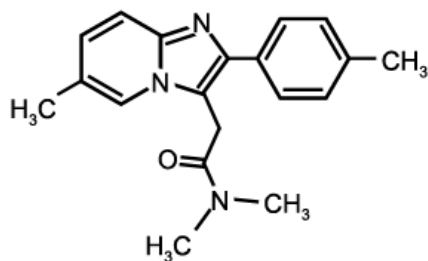
f) Učinci na disanje i funkciju kardiovaskularnog sustava

U zdravih osoba učinci benzodiazepina su usporedivi s promjenama u neurotransitorskom sustavu tijekom prirodnog sna, ali kod bolesnika s plućnim bolestima mogu izazvati značajnu respiracijsku depresiju. Učinci na disanje ovisni su o dozi, a depresija respiracijskog centra uobičajni je uzrok smrti uslijed predoziranja. U zdravih osoba ne opaža se značajan učinak na kardiovaskularni sustav (TREVOR i WAY, 2011.).

2.5. Zolpidem

Nekoliko je novijih lijekova strukture slične benzodiazepinima, no s djelomično selektivnim djelovanjem slijedom vezivanja na pojedini podtip GABA_A receptora. Zolpidem je lijek uveden u kliničku upotrebu s ciljem liječenja poremećaja spavanja, te je postao jedan od najkorištenijih selektivnih agonista benzodiazepinskih receptora (zolpidem je jedan od najčešće propisivanih hipnotika u SAD-u). Iako po strukturi (imidazopiridin) (Slika 8.) nije srodan benzodiazepinima dijeli sličan mehanizam djelovanja. Zolpidem, poput benzodiazepina, veže se za molekularne komponente GABA_A receptora u membranama neurona središnjeg živčanog sustava. Za razliku od benzodiazepina, zolpidem se veže selektivnije jer ima visoki afinitet vezanja za receptore koji sadržavaju α_1 podjedinicu, nešto niži afinitet ima za α_2 i α_3 podjedinicu, dok je afinitet veoma mali za α_5 podjedinicu (ARBILLA i sur., 1986.; PRITCHETT i SEEBURG, 1990.; COPE i sur., 2004.). Poput benzodiazepina ne veže se na GABA_A receptore koji sadrže α_4 i α_6 podjedinice. Za vezanje zolpidema bitan je "džep" između $\alpha_{1,2,3}$ i γ_2 podjedinice, koji predstavlja F petlja smještena na dodirnoj plohi α/γ podjedinice (WULFF i sur., 2007.). Za vezanje zolpidema na benzodiazepinsko vezno mjesto na GABA_A receptore nužna je aminokiselina fenilalanin na γ_2 podjedinici. Ako se zamjeni ova aminokiselina izoleucinom, onemogućeno je vezanje zolpidema na receptor (MORLOCK i CZAJKOWSKI,

2011.). Zolpidem ima izrazito hipnotički učinak (skraćuje REM spavanje i ima minimalni učinak na sporovalno spavanje) dok mu je miorelaksirajuće, anksiolitičko i antikonvulzivno djelovanje znatno slabije (PERIČIĆ i sur., 2008.). Zolpidem postoji i kao pripravak s bifazičnim otpuštanjem što osigurava kontinuiranu razinu lijeka za održavanje spavanja. Upravo zbog svoj bifazičnog otpuštanja produljuje razinu u plazmi.



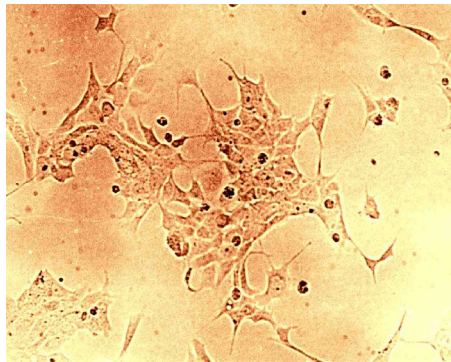
Slika 8. Kemijska struktura zolpidema.

U vrijeme kada je sintetiziran i kada su provedena prva istraživanja dugotrajne primjene zolpidema pretpostavljalo se da će zbog selektivnosti vezivanja imati manje nuspojava nego klasični benzodiazepini (relaksacija mišićne, poremećaji pamćenja, povratna nesanica). Također su rani radovi pokazali kako njegovom dugotrajnom primjenom i/ili naglim prekidom terapije ne dolazi do pojave tolerancije i fizičke ovisnosti, paradoksalne nesanice i znakova ustezanja (VON VOIGHTLANER i LEWIS, 1991.; PERRAULT i sur., 1992.). No istraživanja provedena na babunima pokazuju da dolazi do razvoja fizičke ovisnosti (znakovi ustezanja) i tolerancije (sedativno i relaksirajuće djelovanje se smanjuju) tijekom dugotrajne primjene zolpidema (WEERTS i sur., 1998.; ATOR i sur., 2000.; RAFFA i sur., 2007.), što je također pokazano na štakorima (AUTA i sur., 2008) i miševima (VLAINIĆ i PERIČIĆ, 2009.; WRIGHT i sur., 2014.). Brojne recentne publikacije pokazuju da zolpidem uslijed dugotrajne primjene nosi visoki rizik od zlouporabe i nastanka ovisnosti (za pregled pogledati VICTORII VIGNEAU i sur., 2014.). Danas se naime smatra kako zolpidem, bez obzira na svoj jedinstven neurofarmakološki profil, po svojim svojstvima i nije toliko različit od klasičnih benzodiazepina, te da veći afinitet za GABA_A receptore koji sadrže α_1 podjedinicu ne mora nužno biti povezan sa smanjenim potencijalom za razvoj ovisnosti tijekom njegove dugotrajne primjene (FITZERALD i sur., 2014.)

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Kultura embrionalnih stanica bubrega čovjeka

Kultura embrionalnih stanica bubrega čovjeka HEK 293 (human embryonic kidney) (Slika 9.) poslužila je kao stabilan sustav za ekspresiju rekombinantnih GABA_A receptora. Stanična linija HEK 293 sa stabilnom ekspresijom $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ podtipa GABA_A receptora dobivena je ljubaznošću dr. D. Grahama, a razvijena je u dva koraka (BESNARD i sur., 1997.). U stanice su metodom transfekcije prvotno uneseni plazmidi s ukloniranim genima za α_1 i β_2 podjedinicu GABA_A receptora štakora. Transfecirane stanice su probrane na osnovi rezistencije na neomicin, a zatim su između odabranih kolonija pomoću [³H]muscimola odabrane one koje su eksprimirale obje podjedinice GABA_A receptora. Kolonija s najvećim brojem veznih mjesta za [³H]muscimol, odnosno veznih mjesta za neurotransmiter GABA-u, je umnožena i transfecirana plazmidom, koji je sadržavao gen za γ_{2S} podjedinicu GABA_A receptora štakora i mutirani gen za dihidrofolat- reduktazu. Daljnji probir je učinjen pomoću metotreksata. Tako probrane stanice potom su umnožene. Za farmakološka istraživanja je odabrana ona kolonija koje je imala najveći broj veznih mjesta za [³H]flumazenil odnosno najveći broj veznih mjesta za benzodiazepine.



Slika 9. Stanice HEK 293 u kulturi.

3.1.1. Materijal za uzgoj stanica

Medij za uzgoj HEK 293 stanica: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma) uz dodatak 10 % fetalnog govedeg seruma (inaktiviran 60 minuta na 56°C), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina; pH 7.4

PBS (puferirana otopina soli za ispiranje stanica): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄; pH 7.4

Otopina za presađivanje stanica: 0.05 % tripsin, 1 mM EDTA u PBSA

3.1.2. Lijekovi za tretman kulture stanica

GABA (Sigma) otopljena u destiliranoj vodi (koncentracija matične otopine 10 mM)

zolpidem (N,N,6-trimetil-2-(4-metilfenil)-imidazo(1,2-a)piridin-3-acetamid; Pliva) otopljen u destiliranoj vodi (matična otopina 10 mM)

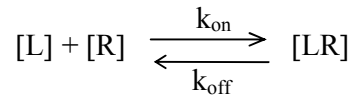
HEK 293 stanice su presađene u nove posude za uzgoj stanica te su ostavljene 24 sata kako bi im se omogućilo prijanjanje na podlogu. Na dan tretmana u medij je i dodan lijek odnosno otapalo u odgovarajućoj koncentraciji.

3.2. Priprema membrana

Za pokuse vezivanja radioaktivnih liganada koristili smo postupak pripreme staničnih membrana koji su opisali Fuchs i suradnici (1995). Stanicama smo odsisali medij, pažljivo isprali s 2×5 ml PBSA i potom postrugali u hladni PBSA (~10 ml po jednoj posudi za uzgoj stanica površine 75 cm²). Stanice se potom istalože centrifugiranjem na 12000 g, 12 minuta pri 4°C. Nakon toga se homogeniziraju u 50 mM tris-citratnom puferu (pH 7.4) pomoću teflonskog tučka (10× gore-dolje) pri brzini od 1250 okretaja u minuti. Homogenat se zatim centrifugira na 200 000 g, 20 minuta na 4°C. Dobiveni talog se resuspendira ručnim homogenizatorom u hladnom tris-citratnom puferu. Opisani postupak se ponovi još dva puta. Zadnji talog se resuspendira tako da koncentracija proteina u suspenziji membrana bude otprilike 1 mg/ml (od 10⁶ stanica dobije se otprilike 100 µg proteina). Tako dobivena suspenzija čuva se na -20°C. Na dan pokusa vezivanja [³H]flunitrazepama, suspenzija membrana se odmrzne i još jednom centrifugira (200 000 g, 20 minuta, 4°C) a zatim ručno resuspendira.

3.2.1. Metoda vezanja radioaktivnog liganda za receptore

Vezanje obilježenog liganda (radioaktivno obilježenog u našem slučaju) za receptor dovodi do stvaranja kompleksa ligand-receptor a proces slijedi zakon o djelovanju masa.



[L] - koncentracija slobodnog liganda

[R] - koncentracija nezauzetih receptorskih mjesta

[LR] - koncentracija kompleksa ligand-receptor

k_{on} - konstanta brzine asocijacije ($M^{-1} \text{min}^{-1}$)

k_{off} - konstanta brzine disocijacije (min^{-1})

U stanju ravnoteže kompleks se jednakom brzinom razlaže kojom se i stvara iz čega proizlazi konstanta disocijacije:

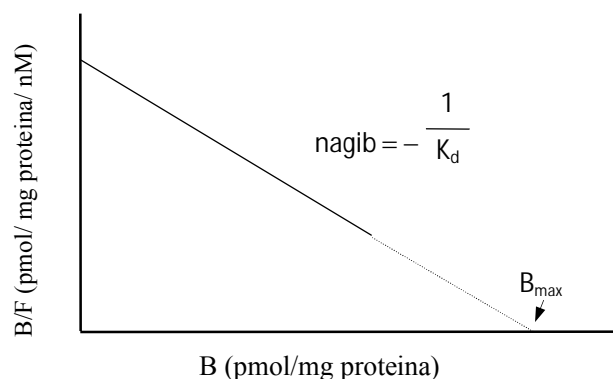
$$K_d = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[L] \times [R]}{[LR]}$$

Konstanta disocijacije odgovara onoj koncentraciji radioliganda koja u stanju ravnoteže zauzima 50% svih receptorskih mjesta i predstavlja mjeru afiniteta radioliganda za receptor. Manja vrijednost konstante disocijacije označava veći afinitet liganda za receptor. Vrijednosti K_d i B_{max} se određuju eksperimentalno u pokusima zasićenja (saturacije) koji se temelje na specifičnom vezanju obilježenog liganda za receptor. Specifično vezivanje predstavlja razliku između ukupnog i nespecifičnog vezivanja.

Koncentracija kompleksa ligand-receptor odgovara koncentraciji vezanog liganda i označava se kao B (koncentracija vezanog liganda, bound). Ako se koncentracija slobodnog liganda (L) označi kao F (Free), iz navedene jednadžbe matematičkim transformacijama dobivamo Scatchardovu jednadžbu:

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{\text{max}} - B}{K_d}$$

Ovako transformirani podaci dobivaju linearni oblik, a iz dobivenog pravca mogu se izračunati vrijednosti za K_d (negativna recipročna vrijednost nagiba pravca) i B_{max} (očita se iz sjecišta pravca na osi x) (Slika 10.).



Slika 10. Scatchardov dijagram dobiven transformacijom podataka vezivanja.

Svojstva benzodiazepinskog veznog mjesta na $\alpha_1\beta_2\gamma_2\delta$ rekombinantnim $GABA_A$ receptorima stabilno eksprimiranim u HEK 293 stanicama analizirali smo koristeći $[^3H]$ flunitrazepam. Alosteričke interakcije između veznih mjesta za GABA-u i benzodiazepine na $GABA_A$ receptoru istražili smo u pokusima stimulacije pri čemu smo uz 1 nM $[^3H]$ flunitrazepam dodavali rastuće koncentracije GABA-e (1 nM - 1 mM).

U pokusima zasićenja epruvete su sadržavale rastuće koncentracije neobilježenog liganda flunitrazepama i 1 nM radioaktivnog $[^3H]$ flunitrazepama. Tome je dodano 50 μ l staničnih membrana (~ 75 μ g membranskih proteina) u 50 mM tris-citrat puferu (pH 7.4), 150 mM NaCl za stimulaciju vezivanja, te u epruvete za određivanje nespecifičnog vezanja 100 μ M diazepama. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 500 μ l. Svaki uzorak je inkubiran u duplikatu kroz 90 minuta na 4°C.

Reakcija je nakon postizanja ravnoteže prekinuta brzim filtriranjem kroz GF/C Whatman filtere. Svaka epruveta je isprana s 3 \times 5 ml hladnog tris-citrat pufera (pH 7.4). Nakon sušenja, filterima u scintilacijskim bočicama dodano je 1.5 ml

scintilacijske tekućine. Nakon 40 minuta mjerili smo radioaktivni raspad u β -scintilacijskom brojilu (Perkin Elmer, Wallac 1409 DSA). Svaki uzorak mjeren je 120 sekundi uz efikasnost brojila od oko 50%.

Za određivanje ukupno dodane radioaktivnosti (vanjski standard) na 10 μ l radioliganda iste koncentracije kao u pokusu, dodali smo 1 ml Bray otopine, a dobivenu vrijednost preračunali na volumen radioaktivnog liganda korišten u pokusu.

Za analizu rezultata dobivenih u pokusima zasićenja mjerenjem radioaktivnih raspada uzoraka na β -scintilacijskom brojilu, a izraženih kao broj raspada u minuti (dpm; disintegration per minute) koristili smo program EBDA (Equilibrium binding data analysis), potprogram COLD. Ovaj program iz unesenih parametara (srednje vrijednosti ukupnog vezivanja radioaktivno obilježenog liganda u prisutnosti pojedinih koncentracija neobilježenog dodanog liganda, vrijednosti nespecifičnog vezanja, srednje vrijednosti vanjskog standarda, datuma izvođenja pokusa, vrste radioliganda i specifične aktivnosti liganda) za svaku koncentraciju izračunava specifično vezanje (B), koncentraciju slobodnog liganda (F) i vrijednost B/F, te metodom linearne regresije interpolira pravac pomoću kojeg se određuju vrijednosti konstante disocijacije (K_d), maksimalnog broja veznih mjesta (B_{max}) i nagib pravca (Hill koeficijent). Metodom nelinearne regresije, kojom se obrađuju podaci dobiveni pokusima kompeticije, a unutar računalnog programa GraphPad, koristi se jednadžba za hiperbolu (model vezivanja radioliganda za jednu populaciju veznih mjesta):

$$Y = B_{max} \times X / (K_d + X)$$

pri čemu je B_{max} maksimalno vezivanje, a K_d koncentracija liganda kod koje se postiže koncentracija maksimalnog vezivanja.

Programom GraphPad Prism koristili smo se i kod obrade podataka dobivenih pokusima stimulacije. Postotak promjene vezivanja [3 H]flunitrazepama u prisutnosti određenog lijeka računali smo prema formuli:

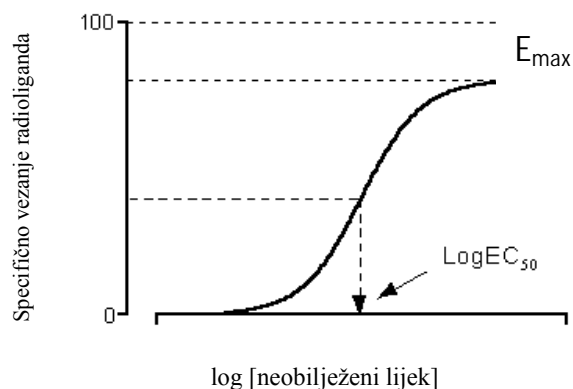
$$\frac{\text{specifično vezanje u prisutnosti lijeka}}{\text{specifično vezanje u odsutnosti lijeka}} \times 100$$

specifično vezanje u odsutnosti lijeka

Unošenjem vrijednosti specifičnog vezanja (izraženih u %) dobivenih u pokusima stimulacije i obradom podataka pomoću jednadžbe za sigmoidalnu krivulju može se izračunati vrijednost maksimalne stimulacije vezanja (E_{max}) koja predstavlja apsolutnu razliku između dna i vrha krivulje.

Postotak razdvajanja alosteričkih veznih mjesta na receptoru (uncoupling) nakon dugotrajne primjene lijekova izračunali smo prema formuli:

$$1 - \frac{\% \text{ maksimalne stimulacije vezivanja radioliganda u skupini izloženoj lijek}}{\% \text{ maksimalne stimulacije vezivanja radioliganda u kontrolnoj skupini}} \times 100$$



Slika 11. Krivulja stimulacije vezivanja radioliganda.

3.3. Konvencionalna PCR metoda

Semikvantitavno određivanje količine mRNA koristili smo kako bismo odredili razinu ekspresije podjedinica $GABA_A$ receptora nakon dugotrajne primjene izabranih lijekova u kulturu stanica sa stabilno ekspimiranim rekombinantnim receptorima.

3.3.1. Izolacija ukupne stanične RNA

Iz kontrolnih i tretiranih HEK 293 stanica sa stabilno eksprimiranim $\alpha_1\beta_2\gamma_2\delta$ podtipom GABA_A receptora izolirali smo ukupnu staničnu RNA pomoću kolona za izolaciju. Prema uputama proizvođača (Biobasic) 10^6 stanica smo resuspendirali u staničnom mediju, centrifugirali (3000 rpm, 3 minute, 4°C), potom isprali i resuspendirali u 400 μ l PBS-a, te ponovno centrifugirali pri istim uvjetima. Nakon centrifugiranja, talog smo resuspendirali u 200 μ l PBS-a. Stanice smo lizirali dodatkom 400 μ l pufera za lizu stanica uz istovremeno vezivanje na kolonu i inaktivaciju RNaza. Uzorak smo potom centrifugiranjem (10 000 rpm, 15 sekundi) propustili kroz kolonu za izolaciju. Eventualno prisutnu kontaminirajuću DNA eliminiramo pomoću enzima DNaze 1, koji se direktno nanosi na površinu staklenog filtera u odgovarajućem inkubacijskom puferu te ostavimo da djeluje kroz 15 minuta na sobnoj temperaturi. Da bi se pročistila vezana RNA (soli, proteini, stanične nečistoće) kroz kolonu se centrifugiranjem (10 000 rpm, 15 sekundi) propušta 500 μ l pufera za ispiranje I. Filter se nakon toga ispiri s 500 μ l pufera za ispiranje II i centrifugira pri istim uvjetima. Ispiranje ponavljamo s 200 μ l pufera II, kojeg u cijelosti uklonimo centrifugiranjem pri brzini od 14 500 rpm kroz 2 minute. Izoliranu RNA odvojimo od kolone centrifugiranjem (10 000 rpm, 1 minutu) pomoću 80 μ l pufera za eluciju i pohranimo na -80°C. Koncentraciju izolirane stanične RNA odredili smo mjerenjem optičke gustoće uzorka pri valnoj duljini 260 nm (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

Materijal za izolaciju RNA:

- pufer za lizu stanica i vezivanje na kolonu: 4.5 M gvanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, 30 % Triton X-100 (w/v); pH 6.6 pri 25 °C
- pufer za inkubaciju s DNazom: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂; pH 7.0, 25°C
- pufer za ispiranje I: 5 M gvanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl; pH 6.6 pri 25°C
- pufer za ispiranje II: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl; pH 7.5 pri 25°C
- pufer za eluciju: sterilna bidestilirana voda
- kolone s filterićima za izolaciju ukupne RNA
- DNaza I

3.3.2. Reverzna transkripcija

Reakcija reverzne transkripcije je enzimatska metoda kojom se informacija sadržana u RNA prevodi pomoću enzima reverzne transkriptaze u informaciju na razini komplementarne DNA (cDNA), a odvija se u dva koraka. Reakcija počinje vezivanjem početnica na lanac RNA, nakon čega se na lanac veže enzim reverzna transkriptaza i sintetizira prvi lanac cDNA. Drugi lanac cDNA sintetizira se pomoću *Taq* DNA polimeraze za vrijeme prvog ciklusa PCR reakcije. Kao početnice koristili smo smjesu heksanukleotida koji prepoznaju različite sekvence unutar molekula RNA. Tako dobivena populacija cDNA različitih je duljina i podrijetla različitih molekula RNA (ribosomska, transportna, glasnička i mala nuklearna RNA).

Uzorak koji je sadržavao ukupnu staničnu RNA, heksanukleotidne početnice i 20 U inhibitora RNaze inkubirali smo 5 minuta na 65°C kako bi denaturirali sekundarne strukture i omogućili slobodno vezanje početnica. Nakon dodatka preostalih komponenti (pufer, DTT, 20 U inhibitora RNaze) i preinkubacije u trajanju od 2 minute na 25°C dodatkom reverzne transkriptaze SuperScript II počinje sama reakcija transkripcije. Ona se odvija na 25°C tijekom 10 minuta da bi se omogućilo vezivanje početnica, a zatim se na temperaturi od 42°C tijekom 50 minuta odvija sinteza DNA lanca. Zagrijavanjem uzorka (70°C kroz 15 minuta) inaktiviramo enzim reverznu transkriptazu i prekidamo reakciju. Dobivenu cDNA smo za izvođenje lančane reakcije polimerazom razrijedili 10 puta s ultra-čistom vodom (razrjeđenje 1:10) i čuvali na -20°C.

Tablica 3. Sastojci za reakciju reverzne transkripcije.

SASTOJCI ZA REAKCIJU REVERZNE TRANSKRIPCije	KONAČNA KONCENTRACIJA
ukupna stanična RNA	1 µg
5×reakcijski pufer	1×
dNTP mješavina	1 mM
(N) ₆ početnice	2.5 µl
inhibitor RNaze	40 U
reverzna transkriptaza	200 U
DTT	10 mM
	ukupni volumen 20 µl

3.3.3. Lančana reakcija polimerazom

Pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) in vitro umnažamo cDNA dobivenu reverznom transkripcijom. Reakcija uključuje tri osnovna koraka: denaturaciju dvolančane DNA, vezivanje početnica na razdvojene lance i njihovu elongaciju na principu komplementarnosti baza. Oligonukleotidne početnice vežu se na suprotne lance DNA, a orijentirane su tako da se DNA sinteza odvija u regiji između njih. Specifičnost reakcije ovisi o odabiru početnica. Poželjna duljina početnica je 15-30 nukleotida, da sadržaj G-C baza bude ~50 %, da u sekvenci nema uzastopnog ponavljanja 3C ili 3G baze, da nemaju sekundarnu strukturu, kao i da početnice nisu međusobno komplementarne, posebice na 3'-kraju. Temperatura pri kojoj se početnice vežu na razdvojene lance (temperatura *annealing*-a) treba biti slična za sve početnice, jer je važna za uspješnost same PCR reakcije, jednako kao i izbor početnica. Temperatura vezivanja početnica ovisi o temperaturi mekšanja (*melting* temperature; temperatura pri kojoj je 50 % početnica i komplementarne sekvence u formi dupleksa) koja se izračuna iz veličine i sastava baza svake početnice. Niti preniska (pojava nespecifičnog vezanja) niti previsoka temperatura (ne dolazi do umnažanja specifičnog fragmenta) nisu dobre za vezivanje početnica na razdvojene lance.

Tablica 4. Početnice za izvođenje RT-PCR reakcije

gen	sekvenca (5' – 3')	broj ciklusa	broj baza (bp)
β -aktin	TCA CCA ACT GGG ACG ACA TG TTC GTG GAT GCC ACA GGA CT	24, 25	150
α 1	AGC TAT ACC CCT AAC TTA GCC AGG AGA AAG CGA TTC TCA GTG GAG AGG	20, 21	304
β 2	TGA GAT GGC CAC ATC AGA AGC AGT TCA TGG GAG GCT GGA GTT TAG TTC	17,18	317
γ 2S	AAG AAA AAC CCT GCC CCT ACC ATT TTC GTG AGA TTC AGC GAA TAA GAC	20,21	336

Sastojci lančane reakcije polimerazom

Otopina A:

cDNA (2 μ l; razrjeđenje 1:5 iz RT reakcije)

mješavina dNTP-a (200 μ l)

"forward" početnica (0.2 μ l)

"reverse" početnica (0.2 μ l)

Q H₂O do volumena 10 μ l

Otopina B:

10 \times Taq pufer 1 \times (uključen 1.5 mM MgCl₂)

Taq DNA polimeraza (1 U)

Q H₂O do volumena od 10 μ l

Ukupni volumen: 20 μ l

3.3.4. Semikvantitativna RT-PCR metoda

Ovu smo metodu koristili za usporedbu ekspresije mRNA za podjedinice rekombinantnih GABA_A receptora između kontrolnih stanica i stanica tretiranih zolpidemom (10 μ M, 7 dana). Isto tako smo usporedili izražajnost mRNA nakon ustezanja lijeka tijekom 24, 48, 72 i 96 sati. Promjene u ekspresiji normalizirali smo na promjene u ekspresiji mRNA za β -aktin koji nam je poslužio kao interni standard.

Sama reakcija RT-PCR podložna je varijacijama, prije svega u odnosu na razlike u kvaliteti i količini RNA između pojedinih uzoraka, ali i na učinkovitost transkripcije RNA u cDNA. Kad se uzme u obzir eksponencijalna priroda PCR-a, čak i male razlike među uzorcima mogu stvoriti velike razlike u konačnom iskorištenju DNA što se korigira i kontrolira normaliziranjem podataka s ekspresijom internih standarda, pri čemu se najčešće koriste *house keeping* geni (u našem slučaju β -aktin), za koje se pretpostavlja da imaju nepromijenjen izražaj u promjenjivim eksperimentalnim uvjetima. Ovakvom korekcijom ispravljaju se i varijacije nastale spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije RNA, nanošenjem i kvalitetom same RNA.

Tijekom lančane reakcije polimerazom reakcijski produkti se akumuliraju brzinom koja je ovisna o efikasnosti umnažanja. Linearna faza reakcije definira se kao vrijeme u kojem je učinkovitost umnažanja maksimalna i konstantna kroz više uzastopnih ciklusa. Kada krene smanjenje učinkovitosti umnažanja, brzina nakupljanja produkta ulazi u fazu platoa. Linearna faza se određuje tako da se logaritmirana maksimalna optička gustoća uzoraka dobivenih iz nekoliko uzastopnih PCR ciklusa grafički prikaže u ovisnosti o broju ciklusa. Za linearnu fazu umnažanja ovakvim se prikazom dobije pravac, a budući da raspon linearne faze ovisi o količini ishodišnog uzorka, za svaki se gen ona mora posebno odrediti. Da bi semikvantitativna RT-PCR pokazala stvarne razlike u ekspresiji gena, a ne razlike nastale zbog različite učinkovitosti umnažanja, produkti reakcije specifičnih i kontrolnih gena se trebaju uspoređivati unutar linearne faze.

Nakon što smo za β -aktin i podjedinice GABA_A receptora odredili linearnu fazu lančane reakcije polimerazom, za svaki gen smo odabrali jedan ciklus iz sredine linearnog dijela reakcije, te produkte umnažali kroz tako određen broj ciklusa. Budući da se napredovanjem reakcije početnice i dNTP nukleotidi iskorištavaju i da broj kalupa nadmašuje dostupnu polimerazu, sinteza DNA postaje manje učinkovita. Da bi povećali iskorištenje, napravili smo završnu ekstenziju lanca (72°C tijekom 7 minuta) kako bi omogućili dovršavanje eventualno nepotpune sinteze.

Konačni rezultat izrazili smo kao omjer signala dobivenih nakon umnažanja specifičnog gena i interne kontrole kroz optimalan broj ciklusa, pa dobiveni rezultat predstavlja korigiranu relativnu vrijednost specifičnog produkta.

3.3.5. Elektroforeza u gelu agaroze

Uzorke smo nakon izvođenja lančane reakcije polimerazom razdvojili horizontalnom elektroforezom u 1.5 %-tnom gelu agaroze u 1×TAE puferu, kroz 30 minuta uz napon od 85V. Naime, molekule DNA su negativno nabijene i u električnom polju putuju prema pozitivnoj elektrodi čime se razdvajaju, ovisno o veličini i konformaciji molekule. Nakon elektroforeze gel smo bojali 30 minuta otopinom etidij-bromida (0.5 µg/ml) kako bi obojali razdvojene odsječke DNA, te potom isprali u destiliranoj vodi. Uzorke smo vizualizirali pomoću UV-

transluminatora (Pharmacia Biotech-Image Master) a maksimalnu optičku gustoću DNA vrpce za α_1 podjedinicu GABA_A receptora i β -aktin, dobivenih iz kontrolnih i onih tretiranih zolpidemom, flumazenilom, gabazinom ili njihovom kombinacijom odredili smo pomoću programa ImageJ NIH.

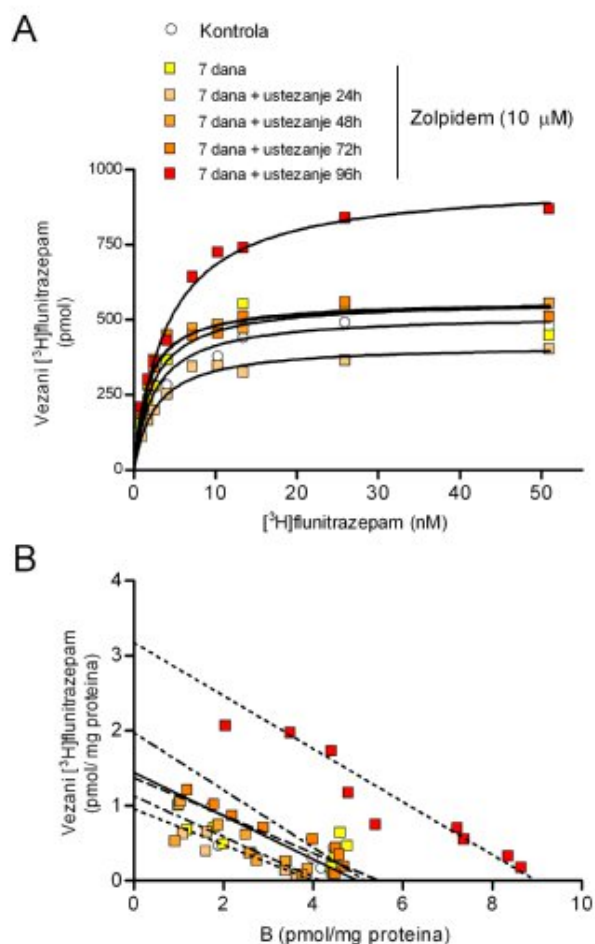
3.4. Statistička obrada podataka

Za grafički prikaz rezultata kao i njihovu statističku obradu koristili smo program GraphPad Prism. Razlike između pojedinih skupina su analizirane jednosmjernom analizom varijance (ANOVA), a tamo gdje su razlike između skupina bile značajne napravili smo i post-hoc analizu (Dunnet's test kojim se uspoređuje učinak tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu). Učinke dva različita faktora i njihovu moguću interakciju analizirali smo dvosmjernom ANOVA-om. Rezultati svih pokusa izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Svi rezultati su dobiveni iz najmanje tri odvojena pokusa, a analize u kojima je vrijednost $P < 0.05$, smatrane su statistički značajnim.

4. REZULTATI

4.1. Učinak dugotrajne primjene u ustezanja zolpidema na svojstva benzodiazepinskih veznih mjesta na rekombinantnim GABA_A receptorima

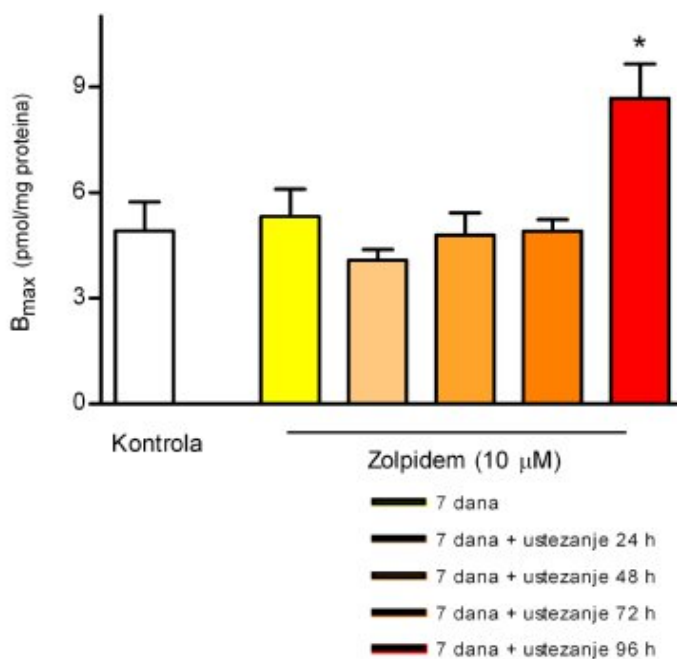
U svrhu istraživanja učinka dugotrajne primjene hipnotika zolpidema, agonista benzodiazepinskih veznih mjesta, na rekombinantne $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ GABA_A receptore stabilno eksprimirane u HEK 293 stanicama, kulturu tih stanica smo izlagali djelovanju 10 mikromolarnog zolpidema kroz 7 dana. Istovremeno smo htjeli dokučiti događaju li se promjene broja veznih mjesta tijekom ustezanja zolpidema u trajanju od 24, 48, 72 i 96 sati. Nakon izlaganja i izolacije membrana kontrolnih i zolpidemom tretiranih stanica, pratili smo kinetičke parametre koristeći [³H]flunitrazepam kao ligand koji se veže za benzodiazepinsko vezno mjesto GABA_A receptora (Slika 12.). Budući da zolpidem u fiziološkim uvjetima svoje djelovanje ostvaruje putem GABA_A receptora u prisutnosti GABA-e, učinak dugotrajne primjene zolpidema, na svojstva benzodiazepinskih veznih mjesta na rekombinantnim receptorima određivali smo u prisutnosti 1 μ M GABA-e (svim kontrolnim, kao i stanicama tretiranim lijekom dodali smo u kulturu 1 μ M GABA-u).



Slika 12. Učinak dugotrajne primjene zolpidema i njegovog ustezanja na saturacijske izoterme (A) i Scatchardove krivulje (B) benzodiazepinskih veznih mjesta rekombinantnih GABA_A receptora stabilno eksprimiranih na membranama HEK 293 stanica.

Stanice smo izlagali zolpidemu (10 μ M) tijekom 7 dana te 24, 48, 72 i 96 sati bez prisutnosti zolpidema (sve u prisutnosti 1 μ M GABA-e, koja je uz otapalo bila prisutna i u kontroli). Nakon izolacije, stanične membrane su inkubirane s rastućim koncentracijama neradioaktivnog flunitrazepama (0.3-50 nM) u prisutnosti stalne koncentracije radioaktivnog [3 H]flunitrazepama (1 nM). Dobivene podatke analizirali smo nelinearnom regresijom (A, B) pomoću programa GraphPad Prism i prikazali kao srednju vrijednost \pm standardna pogreška iz tri odvojena pokusa izvedena u duplikatu.

Kronični tretman stanica zolpidemom (10 μ M, 7 dana) kao i ustezanje zolpidema tijekom 24, 48 i 72 sata nije dovelo do promjene u maksimalnom broju veznih mjesta za benzodiazepine na GABA_A receptorskom kompleksu. Jednostruka je analiza varijance pokazala statističku značajnost među spomenutim skupinama [F(5,16) = 4.83; P < 0.01] (Slika 13.). Maksimalan broj benzodiazepinskih veznih mjesta u kontrolnoj skupini je bio 4.91 ± 0.82 pmol/mg proteina dok je u skupini tretiranoj zolpidemom 7 dana taj broj iznosio 5.32 ± 0.82 pmol/mg proteina. Maksimalan broj benzodiazepinskih veznih mjesta također nije bio promijenjen nakon 24- (4.08 ± 0.30 pmol/mg proteina), 48- (4.79 ± 0.64 pmol/mg protein) and 72- satnog (4.90 ± 0.33 pmol/mg proteina) ustezanja zolpidema. Suprotno tome, u skupini u kojoj je zolpidem ustegnut tijekom 96 sati došlo je povećanja maksimalnog broja veznih mjesta za [³H]flunitrazepam (8.67 ± 0.99 pmol/mg proteina). Naime, u skupini kojoj je zolpidem uskraćen tijekom 96 sati došlo je statistički značajnog (P < 0.05, pos- hoc Dunnett-ov test) povećanja maksimalnog broja veznih mjesta za benzodiazepine u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali u usporedbi sa skupinom tretiranom zolpidemom kroz 7 dana te prema skupinama kod kojih je zolpidem uskraćen 24, 48 i 72 sata.



Slika 13. Učinak dugotrajne primjene zolpidema i njegovog ustezanja na maksimalni broj benzodiazepinskih veznih mjesta rekombinantnih GABA_A receptora stabilno eksprimiranih na membranama HEK 293 stanica.

Stanice smo izlagali zolpidemu (10 µM) tijekom 7 dana te 24, 48, 72 i 96 sati bez prisutnosti zolpidema (sve u prisutnosti 1 µM GABA-e, koja je uz otapalo bila prisutna i u kontroli). Nakon izolacije, stanične membrane su inkubirane s rastućim koncentracijama neradioaktivnog flunitrazepama (0.3-50 nM) u prisutnosti stalne koncentracije radioaktivnog [³H]flunitrazepama (1 nM). Dobivene podatke analizirali smo nelinearnom regresijom kako bi odredili B_{max} pomoću programa GraphPad Prism te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz tri odvojena pokusa izvedena u duplikatu. * P < 0.05 prema kontrolnoj skupini (ANOVA s post hoc Dunnett-ovim testom).

Konstanta disocijacije (K_d) je mjera afiniteta receptora i predstavlja upravo recipročnu vrijednost afiniteta. Rezultati pokazuju kako nije došlo do statistički značajne promjene u vrijednostima konstante disocijacije kao mjere afiniteta liganda za receptor, odnosno vezno mjesto. No može se vidjeti kako je konstanta disocijacije djelomično smanjena u pojedinim grupama, posebice u skupini u kojoj je ustezanje zolpidema trajalo 96 sati.

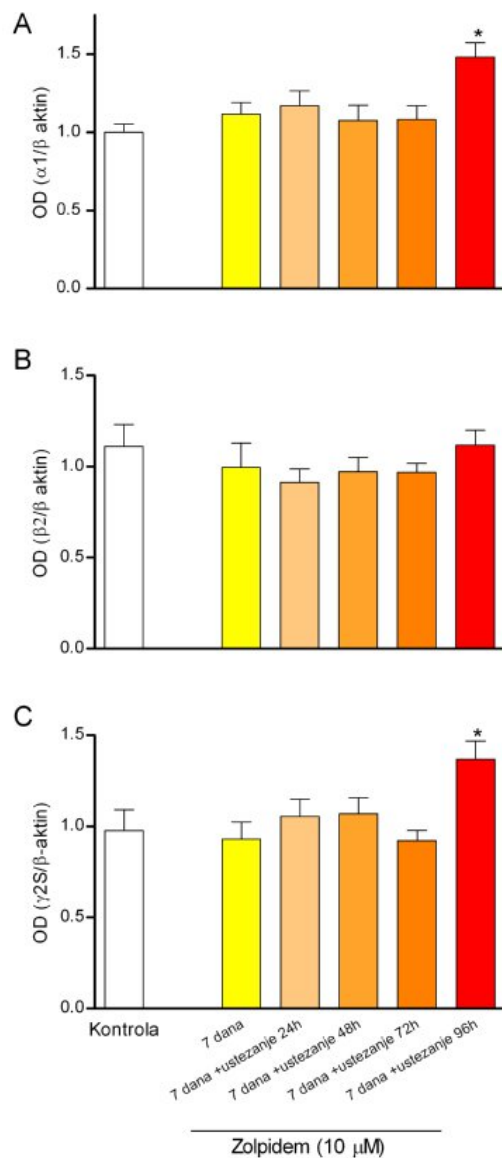
Tablica 5. Konstanta disocijacije (K_d) benzodiazepinskih veznih mjesta $GABA_A$ receptora nakon tretmana zolpidemom i njegovog ustezanja.

		Afinitet [3H]flunitrazepamskih veznih mjesta (K_d ; nM)
Kontrola		3.72 ± 0.44
Zolpidem 7 dana		4.49 ± 0.61
	+ ustezanje 24 h	4.51 ± 0.56
	+ ustezanje 48 h	4.05 ± 0.60
	+ ustezanje 72 h	2.98 ± 0.95
	+ ustezanje 96 h	2.57 ± 0.30

4.2. Učinak dugotrajne primjene i ustezanja zolpidema na ekspresiju mRNA za α_1 , β_2 i γ_{2S} podjedinice $GABA_A$ receptora

Semikvantitativnom RT-PCR metodom smo se koristili kako bi istražili da li dugotrajna primjena zolpidema u kulturi stanica HEK 293 sa stabilno eksprimiranim $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ rekombinantnim $GABA_A$ receptorima inducira promjene u ekspresiji gena, što smo pratili uspoređujući ekspresiju mRNA α_1 , β_2 i γ_{2S} podjedinice $GABA_A$ receptora kod kontrolnih i stanica dugotrajno izlaganih zolpidemu (10 μ M, 7 dana), te stanica kojima je zolpidem uskraćen tijekom 24, 48, 72 ili 96 sati (withdrawal period). Kao interni standard, da bi normalizirali eventualno nastale promjene u ekspresiji ciljnog gena, koristili smo β -aktin, jer u našim uvjetima njegova ekspresija nije bila promijenjena pod utjecajem lijeka. Da bi ova metoda odrazila stvarne promjene nastale uslijed razlike u ekspresiji gena, rezultati lančane reakcije polimerazom specifičnog i kontrolnog gena moraju se uspoređivati unutar linearne faze (nakupljanje produkata reakcije konstantnom brzinom), čiji raspon se određuje titracijskom krivuljom. Nakon optimiziranja uvjeta, usporedili smo ekspresiju α_1 , β_2 i γ_{2S} mRNA između kontrolnih i tretiranih stanica.

Dobiveni rezultati pokazuju da dugotrajna primjena (7 dana) zolpidema ne uzrokuje porast ekspresije mRNA α_1 , β_2 niti γ_{2S} podjedinice GABA_A receptora u kulturi HEK 293 stanica sa stabilnom ekspresijom $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ rekombinantnih GABA_A receptora. Slično nalazimo za periode ustezanja koji su trajali 24, 48 i 72 sata. Također nije promijenjena razina mRNA za β_2 podjedinicu [F(5,60) = 0.813; P = 0.544] nakon ustezanja zolpidema koje je trajalo 96 sati. Suprotan tome je rezultat koji pokazuje da je nakon 96-satnog ustezanja dugotrajne primjene zolpidema došlo do statistički značajnih (jednosmjerna ANOVA) promjena u izražajnosti mRNA za α_1 [F(5,71) = 3.775; P = 0.044] i γ_{2S} [F(5,63) = 2.991; P = 0.017] podjedinicu GABA_A receptora. Naime, mRNA za α_1 (P < 0.01, post- hoc Dunnett-ov test) i γ_{2S} (P < 0.05, post- hoc Dunnett-ov test) podjedinicu je bila značajno veća nakon 96-satnog ustezanja zolpidema u odnosu na izražajnost mRNA u kontrolnoj skupini.



Slika 14. Učinak tretmana i obustavljanja dugotrajne primjene zolpidema na ekspresiju mRNA za α_1 , β_2 i γ_{2S} podjedinicu GABA_A receptora.

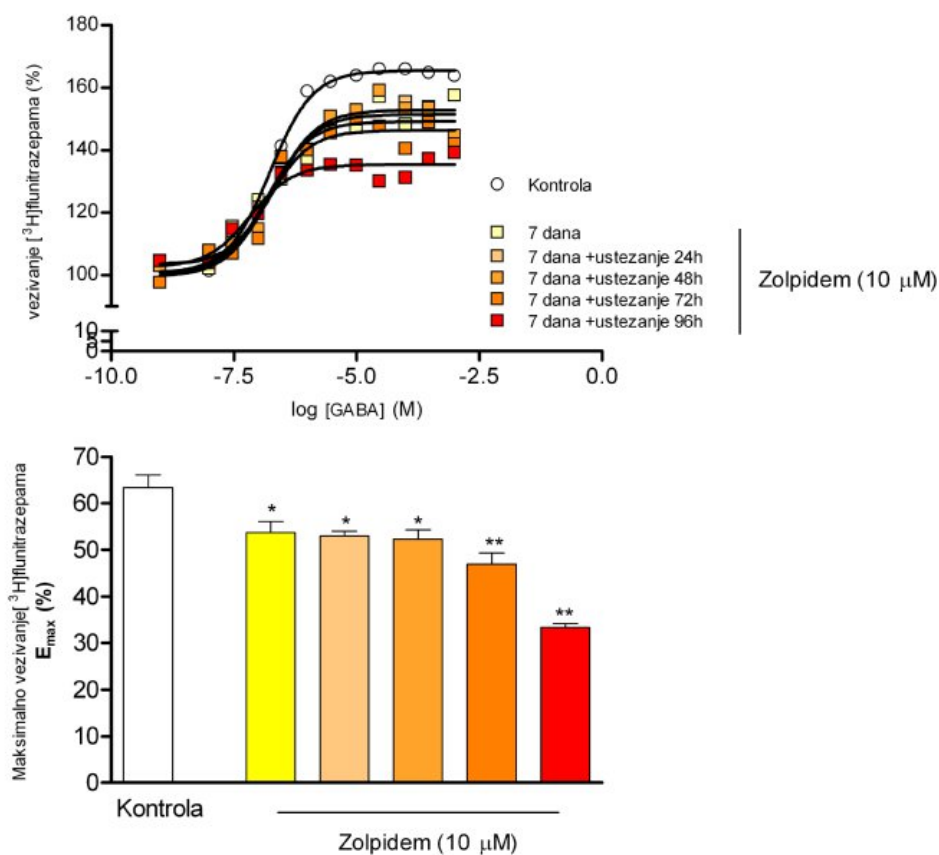
Stanice HEK 293 sa stabilno eksprimiranim $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ rekombinantnim GABA_A receptorima izlagali smo djelovanju zolpidema (10 μ M) tijekom 7 dana te 24, 48, 72 i 96 sati bez prisutnosti zolpidema (sve u prisutnosti 1 μ M GABA-e, koja je uz otapalo bila prisutna i u kontroli). Izolirana je ukupna stanična RNA te je izražajnost mRNA α_1 , β_2 i γ_{2S} podjedinica određena semikvantitativnom RT-PCR metodom te normizirana standardnim genom β -aktinom. Dobivene podatke analizirali smo statističkim programom i prikazali kao srednju vrijednost \pm standardna pogreška (n=5-8). * P < 0.05 prema kontrolnoj skupini (ANOVA s post hoc Dunnett-ovim testom).

4.3. Učinak dugotrajne primjene i ustezanja zolpidema na alosteričku povezanost veznih mjesta na GABA_A receptorskom kompleksu

Benzodiazepini i drugi ligandi benzodiazepinskog veznog mjesta postižu svoje učinke potenciranjem djelovanja same GABA-e na GABA_A receptoru, slijedom čega smo željeli utvrditi utječe li dugotrajna primjena zolpidema (7 dana, 10 μM) i njegovo ustezanje (24, 48, 72 i 96 sati) na funkcionalnu povezanost veznih mjesta za GABA-u i benzodiazepine na GABA_A receptorskom kompleksu. Kontrolne stanice tretirane su otapalima i niskom koncentracijom GABA-e (1 μM).

Jednostruka analiza varijance pokazala je značajne razlike među analiziranim skupinama [$F(5,16) = 30.90$; $P = 0.0001$]. Također, dodana GABA (1 nM – 1 mM) je potencirala vezivanje [³H]flunitrazepama za membrane stanica u ovisnosti o koncentraciji. Suprotno tome, vrijednosti kod kojih se postiže polovica maksimalne stimulacije (EC₅₀) vezivanja [³H]flunitrazepama nisu se značajno razlikovale između skupina. Kako bi uočene promjene u intenzitetu GABA-om potaknutog vezivanja [³H]flunitrazepama učinili jasnijima podaci na slikama su prikazani kao postotak i kao maksimalni učinak (E_{max}) (Slika 15.).

Dugotrajna primjena zolpidema (53.7 ± 2.4 %) izazvala je značajno ($P < 0.05$) manju GABA-om potaknutu stimulaciju vezivanja [³H]flunitrazepama u odnosu na kontrolnu skupinu (64.3 ± 1.8 %). Kako je pokazano na Slici 15. rezultati pokazuju da je u skupinama u kojima je zolpidem ustegnut tijekom 24, 48, 72 i 96 sati također došlo do značajnog smanjenja ($P < 0.01$ i $P < 0.05$) stupnja alosteričke povezanost između veznih mjesta za GABA-u i benzodiazepine na rekombinantnom GABA_A receptoru. Rezultati naime pokazuju kako je GABA-om potaknuta maksimalna stimulacija vezanja [³H]flunitrazepama u skupini u kojoj je zolpidem ustegnut tijekom 24 sata oko 53 %, 48 sati oko 52 %, 72 sata oko 47 % te u skupini u kojoj je ustezanje zolpidema trajalo 96 sati 33 %.



Slika 15. Učinak dugotrajne primjene i ustezanja zolpidema na alosteričku povezanost veznih mjesta na rekombinantnim GABA_A receptorima.

Stanice HEK 293 sa stabilno eksprimiranim $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ rekombinantnim GABA_A receptorima izlagali smo djelovanju zolpidema (10 μM) tijekom 7 dana te 24, 48, 72 i 96 sati bez prisutnosti zolpidema (sve u prisutnosti 1 μM GABA-e, koja je uz otapalo bila prisutna i u kontroli). Izolirane stanične membrane inkubirane su u pokusima stimulacije s rastućim koncentracijama GABA-e (1 nM - 1 mM) u prisutnosti stalne koncentracije $[^3\text{H}]$ flunitrazepama (1 nM). Na slici su prikazane krivulje stimulacije vezivanja $[^3\text{H}]$ flunitrazepama potaknutog GABA-om i maksimalna stimulacija (E_{max}) vezivanja $[^3\text{H}]$ flunitrazepama potaknutog GABA-om. Stupići predstavljaju srednje vrijednosti \pm standardna pogreška iz pet neovisnih pokusa. *P < 0.05 i **P < 0.01 prema kontroli (ANOVA i Dunnettov test).

5. RASPRAVA

Iako ne pripada u benzodiazepine, zolpidem ostvaruje svoje učinke vezanjem na benzodiazepinsko vezno mjesto GABA_A receptora (ARBILLA i sur., 1986.; CRESTANI i sur., 2000.). On djeluje kao pozitivni alosterički modulator GABA_A receptora povećavajući učestalost otvaranja klornog kanalića (PRITCHETT i sur., 1989.). Tehnikama molekularne biologije mogu se dobiti rekombinantni receptori, pa je na takvom eksperimentalnom modelu moguće istražiti farmakološke karakteristike definiranog podtipa receptora, kao i funkcionalno značenje pojedinih podjedinica (BESNARD i sur., 1997.). Naime, takve stanične kulture ekspimiraju homogenu populaciju receptora, s točno okarakteriziranim receptorima i strogo kontroliranim uvjetima rasta, te bi podaci dobiveni istraživanjem na njima trebali olakšati razumijevanje kompleksnih interakcija na razini nativnih receptora središnjeg živčanog sustava. Kako gotovo polovica GABA_A receptora u mozgu ima u svom sastavu α_1 , β_2 i γ_2 podjedinicu (OLSEN i SIEGHART, 2008.), te se zolpidem najvećim afinitetom veže na GABA_A receptore koji sadrže α_1 podjedinicu (WULFF i sur., 2007.), u našim smo istraživanjima učinaka dugotrajne primjene zolpidema kao model koristili HEK 293 staničnu kulturu sa stabilnom ekspresijom upravo ovog podtipa GABA_A receptora.

Stanice sa stabilnom ekspresijom rekombinantnih GABA_A receptora izložili smo zolpidemu (10 μ M) kroz 7 dana kako bi pratili promjene uzrokovane kroničnom primjenom zolpidema i njegovim ustezanjem. Razdoblje ustezanja trajalo je 24, 48, 72 i 96 sati. Naši rezultati pokazuju da primjenom zolpidema kao i 24-, 48- i 72-satno ustezanjem nije došlo do promjena u maksimalnom broju veznih mjesta za [³H]flunitrazepam, dok je 96- satno ustezanje zolpidema (nakon sedmodnevnog tretmana) rezultiralo porastom maksimalnog broja veznih mjesta za benzodiazepine (Slika 14). Temeljem ranijih istraživanja pretpostavljamo da se vezna mjesta za [³H]flunitrazepam vjerojatno nalaze na površini stanice (PERIČIĆ i sur., 2007.; ŠVOB ŠTRAC i sur., 2008.; VLAINIĆ i sur., 2010.).

Naši rezultati također pokazuju da nema promjena na u ekspresiji mRNA α_1 , β_2 i γ_{2S} podjedinica tijekom primjene zolpidema i ustezanja u trajanju od 24, 48 i 72 sata. Follesa i suradnici (2002.) su pokazali da dugotrajnom primjenom zolpidema ekspresija mRNA podjedinica GABA_A receptora u kulturi granularnih stanica malog

mozga štakora ne dolazi do značajnih promjena u ekspresiji $\alpha_{1,4}$, $\beta_{1,2,3}$ i γ_2 podjedinica. Nadalje, istraživanja su također pokazala da niti sedmodnevnom primjenom zolpidema kod životinja ne nastaju promjene u ekspresiji mRNA za α_1 i γ_2 podjedinicu GABA_A receptora (WRIGHT i sur., 2014.; HOLT i sur., 1997.).

Promjena broja veznih mjesta za određeni lijek, primjerice benzodiazepine, može biti razlog promjenenog djelovanja lijekova, odnosno veća količina lijeka je potrebna da bi se ostvario određeni očekivani učinak. Naime, 10- dnevnom primjenom zolpidema dolazi do pojave tolerancije dok nakon prestanka njegovog davanja nastaje sindrom ustezanja (AUTA i sur., 2008.; VLAINIĆ i PERIČIĆ, 2009.; WRIGHT i sur., 2014.). Iako šira javnost smatra da smanjeni broj receptora smanjuje nakon produljene primjene benzodiazepina je glavnim uzrokom smanjenog djelovanja nekog lijeka, to nije u skladu s literaturnim podacima (UUSI OUKARI i KORPI, 2010; VINKERS i OLIVIER, 2012.). Naime, većina studija pokazala je da nema promjena u broju receptora tijekom produljenog izlaganja benzodiazepinima stanica ili životinja (GALLAGHER i sur., 1984.; GALPERN i sur., 1991; PRIMUS i sur., 1996.; TOKI i sur., 1996.), što je slično našim rezultatima (Slika 13). Naprotiv, Toki i suradnici (1996.) primjetili su porast maksimalnog broja benzodiazepinskih veznih mjesta 42 sata nakon ustezanja diazepama. Osim toga, 4 dana nakon prestanka uzimanja klonazepama (tretman je trajao 7dana), povećano je vezanje benzodiazepina i TBPS-a (koji se veže na vezno mjesto za konvulzive na GABA_A receptorskom kompleksu) *in vivo* i *in vitro* (GALPERN i sur., 1991.). Promjene u broju receptora nakon 96- satnog ustezanja zolpidema vjerojatno su rezultat povećane transkripcije gena za podjedinice GABA_A receptora, smanjene razgradnje podjedinica i/ili povećane ekspresije GABA_A vezanih proteina (primjerice GABARAP, BIG2, PRIP, gefirin i/ili radiksin) (VINKERS i OLIVIER, 2012.). U skupini u kojoj je ustezanje nakon produljene primjene zolpidema trajalo 96 sati uočili smo povećanu ekspresiju mRNA za α_1 i γ_{2S} podjedinicu, dok je mRNA za β_2 ostala na kontrolnoj razini. Premda je mRNA međuprodukt u sintezi proteina, pretpostavljamo da je ekspresija α_1 i γ_{2S} polipeptida također pojačana, jer se pokazalo da ekspresija polipeptida korelira s ekspresijom mRNA (UUSI-OUKARI i sur., 2000.). U prethodnim istraživanjima također su uočene promjene u ekspresiji α_1 i γ_{2S} podjedinica nakon dulje primjene benzodiazepina (FOLLESSA i sur., 2002.; ŠVOB ŠTRAC i sur., 2008.). Budući da su obje podjedinice ($\alpha_{1(2,3,5)}$ i γ_2) nužne za vezanje benzodiazepina na receptor

(PRITCHETT i sur., 1989.) može se pretpostaviti da je do povećanja maksimalnog broja benzodiazepinskih veznih mjesta došlo zbog djelomičnog formiranja $\alpha\gamma$ binarnog oblika nakon 96- satnog ustezanja zolpidema. Uočeno povećanje mRNA za α_1 i γ_{2S} podjedinicu u skladu je s našom pretpostavkom da 96-satno ustezanje zolpidema stimulira de novo sintezu proteina GABA_A receptora.

U našem istraživanju kronična primjena zolpidema rezultirala je djelomičnim slabljenjem alosteričke povezanosti između veznih mjesta za GABA-u i benzodiazepinskih veznih mjesta što se očituje smanjenom sposobnošću GABA-e da potencira vezanje [³H]flunitrazepama. Maksimalno povećanje vezanja [³H]flunitrazepama također je smanjeno u svim grupama nakon ustezanja zolpidema, a osobitno u skupini gdje je ustezanje trajalo 96 sati.

U prethodnoj studiji pokazano je da do funkcionalnog slabljenja alosteričke povezanosti između GABA i benzodiazepinskih mjesta vezanja dolazi već nakon dva dana primjene zolpidema (VLAINIĆ i sur., 2010.; VLAINIĆ i sur., 2012.). Naime, kao jedno od mogućih objašnjenja za smanjenje benzodiazepinskog djelovanja na GABA_A receptor kompleks je i alosteričko odvajanje veznih mjesta (BATESON, 2000.; VINKERS i OLIVIER, 2012.). Postoje brojne studije koje pokazuju ovakve promjene nakon kronične primjene benzodiazepina. Tako ALI i OLSEN (2001.) predlažu promjene u građi receptora kao mogući mehanizam funkcionalnog razdvajanja veznih mjesta na GABA_A receptoru. Naime, pretpostavlja se da se kroničnom primjenom benzodiazepina potiče receptor na konformacijske promjene, odnosno da dolazi do internalizacije receptora, iako do alosteričkog razdvajanja veznih mjesta dolazi na GABA_A receptorima na membranama kortikalnih neurona čak i nakon lize unutarnjih vezikula (GRAVIELLE i sur., 2005.). Pretpostavlja se kako se alosteričko odvajanje veznih mjesta odvija u nekoliko koraka u kojem je početni internalizacija receptora, nakon kojeg slijedi aktivacija signalnog puta koja može dovesti do selektivnih promjena u podjedinicama receptora (GUTTIEREZ i sur., 2014.). Naši rezultati naprotiv govore suprotno jer se funkcionalno odvajanje veznih mjesta nakon dugotrajne primjene benzodiazepina (PERIČIĆ i sur., 2007.; ŠVOB ŠTRAC i sur., 2008.) i zolpidema (VLAINIĆ i sur., 2010.; VLAINIĆ i sur., 2012.) ne očituje promjenama u sastavu podjedinica. Možemo pretpostaviti da odvajanje na rekombinantnim GABA_A receptorima može uključivati posttranslacijske promjene

proteina GABA_A receptora ili promjene stohiometrije podjedinica. Internalizacija receptora u unutarstanične vezikule može se također isključiti kao mogući mehanizam budući da je nekoliko studija pokazalo da su receptori na površini stanice (JAZVINŠČAK JEMBREK i sur., 2008.; PERIČIĆ i sur., 2007.; PRIMUS i sur., 1996.). Drugi predloženi mehanizam alosteričkog razdvajanja veznih mjesta za GABA-u i benzodiazepine je promjena samog receptora kroz različite fosforilacijske promjene koji mogu utjecati na otvaranje kanalića. Naime, LILLY i suradnici (2003.) otkrili su disfunkciju cAMP-ovisne (o cikličkom adenozinmonofosfatu ovisne) protein kinaze A (PKA) nakon kronične primjene flurazepama. GUTIERREZ i suradnici (2014.) u svom su istraživanju otkrili da inhibitori protein kinaza A i C blokiraju alosteričko odvajanje, što ukazuje da je odvajanje posredovano aktivacijom fosforilacijske kaskade.

Konstanta disocijacije (K_d) je konstanta za odvajanje kompleksa liganda i receptora u sastavne dijelove. Za pretpostaviti je da bi dugotrajnim djelovanjem zolpidema kao i njegovim ustezanjem moglo doći do promijena u jačini unutarmolekulskih veza koje vezuju ligand-receptor kompleks. Međutim, u našem istraživanju nije bilo značajnijih promjena u afinitetu liganda za receptor i obrnuto nakon dugotrajne primjene zolpidema niti ustezanja (tablica 5.), iako je zabilježeni lagani porast afiniteta GABA_A receptora za [³H]flunitrazepam. Vjeruje se da i male promjene u afinitetu GABA_A receptora mogu utjecati na modulaciju ³⁶Cl⁻ efluksa, primjerice smanjenjem GABA-om stimuliranog pritjecanju kloridnih iona (TOKI i sur., 1996.).

6. ZAKLJUČCI

- Istraživanje pokazuje da kronična primjena zolpidema ne uzrokuje promjene u broju benzodiazepinskih veznih mjesta niti i ekspresiji podjedinici mRNA GABA_A receptora.
- Naši rezultati pokazuju da ustezanje zolpidema ima različite učinke ovisno o trajanju ustezanja. Naime, 24-, 48- i 72-satno razdoblje ustezanje nema utjecaj na broj receptora ili ekspresiju mRNA za podjedinice receptora, dok ustezanje u trajanju od 96 sati dovodi do povećanja broja veznih mjesta za [³H] flunitrazepam uz povećanje mRNA ekspresije za α_1 i γ_{2S} podjedinice ukazujući na povećanu sintezu proteina.
- Produžena primjena zolpidema kao i njegovo ustezanje uzrokuje alosteričko razdvajanje veznih mjesta za GABA-u i benzodiazepinskih veznih mjesta.
- Ovo istraživanje daje uvid u potencijale molekularne i stanične mehanizme temeljene na promjenama funkcije GABA_A receptora nakon kronične primjene GABAergičnih lijekova.
- Uočene su molekularne promjene koje bi mogle biti povezane s tolerancijom na učinke zolpidema te ovisnost nakon njegove dulje primjene.

7. LITERATURA

- ALI, N.J., OLSEN, R.W. (2001.): Chronic benzodiazepine treatment of cells expressing recombinant GABA_A receptors uncouples allosteric binding: studies on possible mechanisms. *J Neurochem.* 79(5):1100-1108
- ARBILLA, S., ALLEN, J., LANGER, S. Z. (1986.): High affinity [³H] zolpidem binding in the rat brain: an imidazopyridin with agonist properties at central benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol.* 130:257.-63.
- ATOR, N., WEERTS, E. M., KAMINSKI, B. J., KAUTZ, M. A., GRIFFITHS R. R. (2000.): Zaleplon and triazolam physical dependence assessed across increasing doses under a once-daily dosing regimen in baboons. *Drug Alcohol Dependence.* 61:69.-84.
- AUTA, J., IMPAGNATIELLO, F., KADRIU, B., GIUDOTTI, A., COSTA, E. (2008.): Imidazenil: a low efficacy agonist at alpha1-but high efficacy at alpha5-GABA_A receptors fail to show anticonvulsant cross tolerance to diazepam or zolpidem. *Neuropharmacol.* 55:148.-153.
- BARRERA, N. P., BETTS, J., YOU, H., HENDERSON, R. M., MARTIN I. L., DUNN, S. M., EDWARDSON, J. M. (2008.): Atomic force microscopy reveals the stoichiometry and subunit arrangement of the alpha4beta3delta GABA (A) receptor. *Mol Pharmacol.* 73:960.-967.
- BATESON, A.N. (2002.): Basic pharmacologic mechanisms developed in benzodiazepine tolerance and withdrawal. *Curr Pharm Des.* 8:5.-21.
- BAUMAN, S. W., BAUR, R., SIGEL, E. (2002.): Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABA_A receptors. Insight into the absolute arrangement. *J Biol Chem.* 277:46020.-46025.
- BAUR, R., SIGEL, E. (2003.): On high- and low-affinity agonist sites in GABA_A receptors. *J Neurochem.* 87:325.-332.
- BEN ARI, Y. (2002.): Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 3:728.-739.

- BEREZHNOY, D., BAUR, R., GONTHIER, A., FOUCAUD, B., GOELDNER, M., SIGEL, E. (2005.): Conformational changes at benzodiazepine binding sites of GABA(A) receptors detected with a novel technique. *J Neurochem.* 92:859.-866.
- BESNARD, F., EVEN, Y., ITIER, V., GRANGER, P., PARTISETI, M., AVENET, P., DEPOORTERE, H., GRAHAM, D. (1997.): Development of stable cell lines expressing different subtypes of GABA_A receptors. *J Recept Signal Transduct Res.* 17:99.-113.
- BORMANN, J. (2000.): The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 21:16.-19.
- COPE, D. W., HALBSGUTH, C., KARAYANNIS, T., WULFF, P., FERRAGUTI, F., HOEGER, H., LEPPA, E., LINDEN, A. M., OBERTO, A., OGRIS, W., KORPI, E. R., SIEGHART, W., SOMOGY, P., WISDEN, W., CAPOGNA, M. (2005.): Loss of zolpidem efficacy in the hippocampus of mice with the GABA_A receptor gamma2 F77I point mutation. *Eur J Neurosci.* 21:3002.-3016.
- CRAIG, A. M., LICHTMAN, J. W. (2001.): Synapse Formation and Maturation. In: *Synapses* (Cowan, W. M., Südhof, T. C., Stevens, C. F.). The Johns Hopkins University Press, Baltimore. pp. 588.
- CRESTANI, F., MARTIN, J. R., MÖHLER, H., RUDOLPH, U. (2000.): Mechanism of action of the hypnotic zolpidem in vivo. *Br J Pharmacol.* 131:1251.-1254.
- DUNN, S. M., BATESON, A. N., MARTINI, I. L. (1994.): Molecular neurobiology of the GABA_A receptor. *Int Rev Neurobiol.* 36:51.-96.
- FARRANT, M., NUSSER, Z. (2005.): Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 6:215.-229.
- FOLLESA, P., MANCUSO, L., BIGGIO, F., CAGETTI, E., FRANCO, M., TRAPANI, G., BIGGIO, G. (2002.): Changes in GABA(A) receptor gene expression induced by withdrawal of, but not by long-term exposure to, zaleplon or zolpidem. *Neuropharmacol.* 42:191.-198.

- GALLAGER, D.W, LAKOSKO, J.M., GONSALVES, S.F., RAUCH, S.L. (1984):
Chronic benzodiazepin treatment decreases postsynaptic GABA sensitivity.
Nature. 308:74.-77.
- GALPERN, W.R., LUMKIN, M., GREENBLATT, D.J., SHADER, R.I., MILLER,
L.G.(1991.): Chronic benzodiazepine administrtion VII. Behvaioral tolerance and
withdrawel and receptor alternations associated with clinazepam administration.
Psychopharmacol (Berl). 104(2):225.-230.
- GRAVIELLE, M.C., FARIS, R., RUSSEK, S.J., FARB, D.H. (2005.):GABA induces
activity dependent delayed-onset uncoupling of GABA/benzodiazepine site
interactions in neocortical neurons. J Biol Chem. 280(22):20954.-20960.
- GUTIÉRREZ, M.L., FERRERI, M.C., GRAVIELLE, M.C. (2014.): GABA-induced
uncoupling of GABA/benzodiazepine site interactions is mediated by increased
GABA_A receptor internalization and associated with a change in subunit
composition. Neurosci. 257:119.-129.
- HAJAK, G., MÜLLER, W. E., WITTCHEM, H. U., PITTRROW, D., KIRCH, W.
(2003.): Abus and dependence potentail for the non-benzodiazepine hypnotics
zolpidem and zopiclone: a rview of case reports and epidemiological dana.
Addiction. 98:1371.-1378.
- JAZVINŠČAK JEMBREK, M., ŠVOB ŠTRAC, M., VLAINIĆ, J., PERIČIĆ D.
(2008.): The role of transcriptional and translation mechanisms in flumazenil-
induced up-regulation of recombinant GABA(A) receptors. Neurosci Res.
61:234.-241.
- JOHNSTON, G. A. R., CHEBIB, M., HANRAHAN, J. R., MEWETT, K. N. (2003.):
GABA_C receptors as drug targets. Curr Drug Targets CNS Neurol Dis 2.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSEL, T. M. (2000.): Disorders of Sleep and
Wakefulness. In:Principles of neural science (Kandel, E. R., Schwartz, J. H.,
Jessel, T. M.). 4th Edition. The McGrw Hill Companies, New York. pp. 948.-954.
- KARLSON, P. (1993.): Posebne biokemijske funkcije nekih organa. U: Biokemija
(Karlson, P.), VIII. izdanje. Školska knjiga, Zagreb. pp. 408.

- KORPI, E. R., GRÜNDER ,G., LÜDDENS, H. (2002.): Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol.* 67:113.-159.
- KORPI, E. R., SINKKONEN, S. T. (2006.): GABA(A) receptor subtypes as targets for neuropsychiatric drug development. *Pharmacol Ther.* 109:12.-32.
- KRACH, L. E. (2001.): Pharmacotherapy of spasticity: oral medications and intrathecal baclofen. *J Chil Neurol.* 16:31.-36.
- LILLY, S.M., ZENG, X.J., TIETZ, E.I.(2003.): Role of protein kinase A in GABA_A receptor dysfunction in CA1 pyramidal cells following chronic benzodiazepine treatment. *J Neurochem.* 85(4):988.-998.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.R., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 265.-275.
- MALENKA, R. C., SIEGELBAUM, S. A. (2001.): Synaptic Plasticity. In: *Synapses* (Cowan, W. M., Südhof, T. C., Stevens, C. F.). The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 415.-416.
- MORLOCK, E. V., CZAJKOWSKI, C. (2011.): Different residues in the GABA_A receptor benzodiazepine binding pocket mediate benzodiazepine efficacy and binding. *Mol Pharmacol.* 80:14.-22.
- OLSEN, R. W., DELOREY, T. M. (1999.): *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Siegel, G. J., Agranoff, R. W., et all editors), 6th Edition. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- OLSEN, R. W., SAWYER, G. W. (2004.): GABA_A receptor, u *Encyclopedia of Biological Chemistry*, vol 2. Elsevier. pp. 162.-166.
- OLSEN, R. W., SIEGHART, W. (2008.): Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology and function. *Pharmacol Rev.* 60:243.-260.
- PAGE, C. P. CURTIS, M., SUTTER, M. C., WALKER, M., HOFFMAN, B. (2002.): *Integrated pharmacology*. 2nd Edition. Mosby, Edinburgh.

- PERIČIĆ, D., JAZVINŠČAK JEMBREK, M., ŠVOB ŠTRAC, D., LAZIĆ, J., ŠPOLJARIĆ, I. R. (2005.): Enhancement of benzodiazepine binding sites following chronic treatment with flumazenil. *Eur J Pharmacol.* 507:7.-13.
- PERIČIĆ, D., ŠVOB ŠTRAC, D., JAZVINŠČAK JEMBREK, M., VLAINIĆ, J. (2007): Allosteric uncoupling and up-regulation of benzodiazepin and GABA recognition sites following chronic diazepam treatment of HEK 293 cells stably transfected with alpha1beta2gamma2S subunit of GABA(A) receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 375:177.-187.
- PERRAULT, G., MOREL, E., SANGER, D. J., ZIVKOVIC, B. (1992.): Lack of tolerance and physical dependence upon repeated treatment with the novel hypnotic zolpidem. *J Pharmacol Exp Ther.* 263:298.-303.
- PRIMUS, R.J., YU, J., XU, J., HARTNETT, C., MEYYAPPAN, M., KOSTAS, C., RAMABHADRAN, T.V., GALLAGER, D.W. (1996): Allosteric uncoupling after chronic benzodiazepine exposure of recombinant γ -aminobutyric acid_A receptors expressed in Sf9 cells: ligand efficacy and subtype selectivity. *J Pharmacol Exp Ther.* 276:882.-890.
- PRITCHETT, D. B., LUDDENS, H., SEEBURG, P. H. (1989.): Type I and type II GABA_A-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science.* 245:1389.-1392.
- PRITCHETT, D. B., SEEBURG, P. H. (1990.): γ -Aminobutyric acid_A receptor α 5-subunit creates novel type II benzodiazepine receptor pharmacology. *J Neurochem.* 54:1802.-1804.
- RAFFA, R. B., CAVALLO, F., CAPASSO, A. (2007.): Flumazenil -sensitive dose-related physical dependence in planarians produced by two benzodiazepine and one non-benzodiazepine benzodiazepine-receptor agonists. *Eur J Pharmacol.* 564:88.-93.
- RANG, H. P. (2006.): Aminokiselinski transmittori. U: Farmakologija (Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K.). V. izdanje. Golden marketing, Tehnička knjiga, Zagreb. pp. 470.-471.

- SANGER, D. J., GRIEBEL, G., PERRULT, G., CLAUSTRE, Y., SCHEMAKER, H. (1999.): Discriminative stimulus effects of drugs acting at GABA(A) receptors: differential profiles and receptor selectivity. *Pharmacol Biochem Behav.* 64(2):269.-273.
- SIEGHART, W. (1995.): Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 47:181.-234.
- SNYDER, S.H. (1996.): *Drugs and the Brain*. Scientific American Library, New York.
- ŠVOB ŠTRAC, D., VLAINIĆ, J., JAZVINŠČAK JEMBREK, M., PERIČIĆ, D. (2008.): Differential effects of diazepam treatment and withdrawal on recombinant GABA_A receptor expression and functional coupling. *Brain Res.* 1246:29.-40.
- TILLAKARATNE, N. J. K., MEDINA-KAUWE, L., GIBSON, K. M. (1995): γ -Aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol.* 11:247.-263.
- TOKI, S., SAITO, T., HATTA, S., TAKKAHATA, N. (1996.): Diazepam physical dependence and withdrawal in rats is associated with alternation in GABA_A receptor function. *Life Sci.* 59(19):1631.-1641.
- TRETTNER, V., EHYA, N., FUCH, K., SIEGHART, W. (1997.): Stoichiometry and assembly of a recombinant GABA_A receptor subtype. *J Neurosci.* 17:2728.-2737.
- TREVOR, A. J., WAY, W. L. (2011.): Anksiolitici i sedativi-hipnotici. U: *Temeljna i klinička farmakologija* (Katzung, B. G., Masters, S. B., Trevor, A. J.). XI. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb. pp. 372.-380.
- UUSI-OUKARI, M., KORPI, E.R. (2010): Regulation of GABA_A receptor subunit expression by Pharmacological agents. *Pharmacol Rev.* 62:97.-135.
- UUSI-OUKARI, M., HEIKKILÄ, J., SINKKONEN, S.T., MÄJELÄ, R., HAUR, B., HOMANICS, G.E., SIEGHART, W., WISDEN, W., KORPI, E.R. (2000.): Long-range interactions in neural gene expression: evidence from gene targeting in the GABA_A receptor $\beta 2$ - $\alpha 6$ - $\alpha 1$ - $\gamma 2$ subunit gene cluster. *Mol Cell Neurosci.* 16:34.-41.

- VICTORII-VIGNEAU, C., GERARIN, M., ROUSSELET, M., GUERLAIS, M., GRALL-BRONNEC, M., JOLLIET, P. (2014.): An update on zolpidem abuse and dependence. *J Addict Dis.* 33(1):15.-23.
- VIGOR, R., BARBIERI, S., BRÄUNER-OSBORNE, H., TURECEK, R., SHIGEMOTO, R., ZHANG, Y. P., LUJÁN, R., JACOBSON, L. H., BIERMANN, B., FRITSCHY, J. M., VACHER, C. M., MÜLLER M., SANSIG, G., GUETG, N., CRYAN, J. F., KAUPMANN, K., GASSMANN, M., OERTNER, T. G., BETTLER, B. (2006.): Differential compartmentalization and distinct functions of GABA_B receptor variants. *Neuron.* 50:589.-601.
- VINKERS, C.H., OLIVIER, B. (2012.): Mechanisms underlying tolerance after long-term benzodiazepine use: A future for subtype-selective GABA(A) receptor modulators? *Adv Pharmacol Sci.* 2012:416864.
- VLAINIĆ, J., JAZVINŠČAK JEMBREK, M., ŠVOB ŠTRAC, D., PERIČIĆ, D. (2010): The effects of zolpidem treatment and withdrawal on the in vitro expression of recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2s$ GABA(A) receptors expressed in HEK 293 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 382:201.-212.
- VLAINIĆ, J., JAZVINŠČAK JEMBREK, M., VLAINIĆ, T., ŠVOB ŠTRAC, D., PERIČIĆ, D. (2012): Differential effects of short- and long-term zolpidem treatment on recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2s$ subtype of GABA(A) receptors in vitro. *Acta Pharmacol Sin.* 33(12):1469.-1476.
- VLAINIĆ, J., PERIČIĆ, D. (2009.): Effects of acute and repeated zolpidem treatment on pentylentetrazole-induced seizure threshold and on locomotor activity: comparison with diazepam. *Neuropharmacol.* 56:1124.-1130.
- VON VOIGTLANDER, P. F., LEWIS, R. A. (1991.): A rapid screening method for the assessment of benzodiazepine receptor-related physical dependence in mice: evaluation of benzodiazepine-related agonists and partial agonists. *J Pharmacol Methods.* 26:1.-5.
- WEERTS, E. M., ATOR, N. A., GRECH, D. M., GRIFFITHS, R. R. (1998.): Zolpidem physical dependence assessed across increasing doses under a once-daily dosing regimen in baboons. *J Pharmacol Exp Ther.* 285:41.-53.

- WEI, J., WU, J. Y. (2008.): Post-translational regulation of L-glutamic acid decarboxylase in the brain. *Neurochem Res.* 33:1459.-1465.
- WHITING, P., WAFFORD, K. A., MCKERNAN, R. M. (2000.): Pharmacological subtypes of GABAA receptors based on subunit composition, GABA in the Nervous System: The View at Fifty Years. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. pp. 113.-126.
- WRIGHT, B.T., GLUSZEK, C.F., HELDT,S.A. (2014): The effects of repeated zolpidem treatment on tolerance , withdrawal-like symptoms, and GABAAreceptor mRNAs, profile expression in mice: Comparison with diazepam. *Psychopharm.* 231(15):2967.-2979.
- WULFF, P., GOETZ, T., LEPPÄ, E., LINDEN, A. M., RENZI, M., SWINNY, J. D., VEKOVISCHEVA, O. Y., SIEGHART, W., SOMOGYI, P., KORPI, E. R., FARRANT, M., WISDEN, W. (2007.): From synapse to behavior: rapid modulation of defined neuronal types with engineered GABAA receptors. *Nat Neurosci.* 10:923.-929.

8. SAŽETAK

UČINCI DUGOTRAJNE PRIMJENE HIPNOTIKA ZOLPIDEMA U KULTURI HEK 293 STANICA SA STABILNO EKSPRIMIRANIM GABA_A RECEPTORIMA

Hipnotik zolpidem svoje djelovanje ostvaruje vezivajući se na benzodiazepinska mjesta na α_1 - GABA_A receptorima. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj trajanja primjene zolpidema i njegovog ustezanja, kao i ulogu α_1 podjedinice GABA_A receptora u razvoju ovisnosti i tolerancije. Naime, rekombinantni receptori koriste se za istraživanje mehanizama koji su uključeni u različite procese u mozgu a posebice pojedinih podtipova receptora. Kako bismo ispitali utjecaj kronične primjene zolpidema, HEK 293 stanice sa stabilnom ekspresijom rekombinantnih GABA_A receptora izložili smo zolpidemu tijekom sedam uzastopnih dana, dok je ustezanje trajalo 24, 48, 72 i 96 sati. Vezanjem radioaktivnih liganda utvrdili smo da kroničnom primjenom zolpidema ne dolazi do promjena u broju GABA_A receptora ili u ekspresiji mRNA podjedinica. Tek nakon 96- satnog ustezanja uočili smo povećani broj veznih mjesta i povećanu ekspresiju α_1 i γ_{2S} podjedinica mRNA. Prema tome, može se pretpostaviti da je ustezanje zolpidema uzrokom promijenjene ekspresije podjedinica GABA_A receptora u našem eksperimentalnom sustavu. Štoviše, primjenom zolpidema i njegovim ustezanjem (kroz sve vremenske točke) došlo je do alosteričkog razdvajanja veznog mjesta za GABA i benzodiazepinskog veznog mjesta na GABA_A receptorskom kompleksu kao funkcionalnog odgovora na djelovanje lijeka.

Ovo istraživanje daje uvid u molekularne i stanične mehanizme koje dovode do promjena u funkciji GABA receptora nakon kronične primjene zolpidema i njegovog ustezanja. Nađene promjene bi mogle biti povezane s tolerancijom i ovisnosti nakon dulje primjene, kako zolpidema tako i drugih GABAergičnih lijekova.

Ključne riječi: zolpidem, kronična primjena i ustezanje, GABA_A receptori, mRNA, radioaktivno obilježavanje veznih mjesta

9. SUMMARY

THE EFFECT OF LONG-TERM USE OF HYPNOTIC ZOLPIDEM IN THE CULTURE OF HEK 293 CELLS WITH STABLY EXPRESSING GABA_A RECEPTORS

Hypnotic zolpidem produces its effects via the benzodiazepine binding site in $\alpha 1$ -containing GABA_A receptors. The aim of the study was to assess the influence of duration of zolpidem treatment and its withdrawal, as well as the role of $\alpha 1$ -containing GABA_A receptors in the development of physical dependence and tolerance. Namely, recombinant receptors can be used to characterize mechanisms involved in different processes in the brain and to delineate the contribution of specific receptor subtypes. To address the influence of chronic zolpidem treatment we exposed HEK293 cells stably expressing recombinant GABA_A receptors for seven consecutive days, while withdrawal periods lasted for 24, 48, 72 and 96 hours. Using radioligand binding studies we determined that chronic zolpidem treatment did not induce changes in either GABA_A receptor number or in the expression of subunit mRNAs. We observed the enhancement of binding sites and upregulated expression of subunit mRNAs only following 96-hour withdrawal. Moreover, zolpidem treatment and its withdrawal (all time points) induced functional uncoupling between GABA and benzodiazepine binding sites in the GABA_A receptor complex. Accordingly, it might be assumed that zolpidem withdrawal- induced uncoupling of GABA_A receptors is associated with altered GABA_A receptor subunit mRNA expression. The results presented here provide an insight into molecular and cellular mechanisms probably underlying adaptive changes of GABA_A receptor function in response to chronic usage and withdrawal of zolpidem and perhaps the observed molecular changes could be linked to the tolerance and dependence produced upon prolonged treatment with other GABAergic drugs.

Keywords: zolpidem, chronic treatment and withdrawal, GABA_A receptors, radioligand binding, mRNA

10. ŽIVOTOPIS

Letizia Antonella Vukorep rođena je 27.07.1989.godine u Vizzolo Predabissi u Italiji. U Zagrebu završava osnovnu školu i VIII. gimnaziju , te 2008. upisuje Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija volontirala je u Klinici za unutarnje bolesti te na istom zavodu , zajedno sa kolegicom, napisala znanstveni studentski rad "Dilatacijska kardiomiopatija pasa u Hrvatskoj" za koji su osvojile Dekanovu nagradu. Posjeduje vozačku dozvolu za B kategoriju vozila i diplomu omladinskog II. stupnja engleskog jezika u centru jezika Sova.