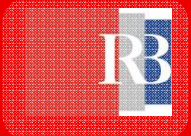




GABA_A receptori: željeni/neželjeni učinci lijekova/supstanci



ČOVJEK

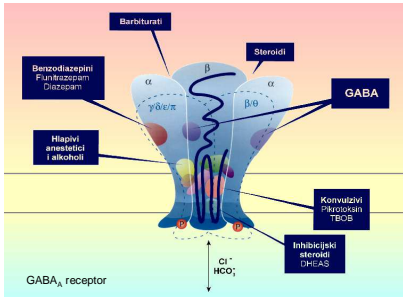
J. Vlainić

(od stanice do organizma)

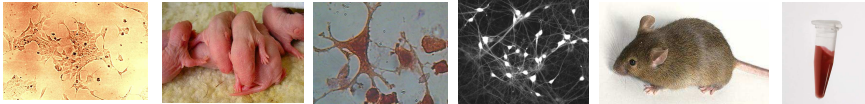
Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za molekularnu neurofarmakologiju

Zahvaljujem D. Švob Štrac i M. Jazvinšćak Jembrek (projekt MZOŠ 14M0002)

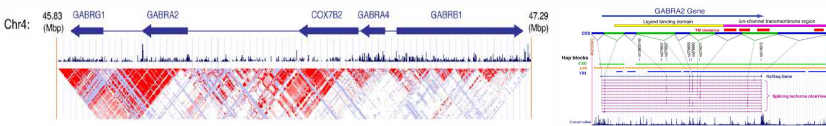
Inhibicijski neurotransmiter GABA (γ -aminomaslačna kiselina) svoje djelovanje u središnjem živčanom sustavu najvećim dijelom ostvaruje vezivanjem na GABA_A receptore. Funkcionalna i farmakološka svojstva GABA_A receptora, funkcionalnih pentamera, su određena sastavom podjedinica koje formiraju centralni ionski kanalčić. GABA_A receptori uključeni su u različite fiziološke funkcije organizma (učenje, pamćenje, cirkadijni ritam, buđenje, hranjenje), ali i mnoge neurološke i psihijatrijske poremećaje (nesanica, ovisnost, poremećaje raspoloženja, anksioznost, epilepsiju, degenerativne bolesti mozga). Brojne supstance (primjerice alkohol), a među njima i klinički značajni lijekovi (antiepileptici, miorelaksanti, anksiolitici, sedativi, hipnotici) svoje djelovanje ostvaruju putem GABA_A receptora. Svoje povoljne učinke tijekom kratkotrajne primjene ovi lijekovi/supstance ostvaruju moduliranjem učinaka same GABA-e. Osim primarnog terapijskog djelovanja, neki lijekovi/supstance (benzodiazepini, flavonoidi) u središnjem živčanom sustavu mogu ostvarivati i druge povoljne učinke, poput neuroprotektivnog djelovanja.



Rasvjetljavanje uključenosti GABA_A receptora u funkcije/disfunkcije organizma može pomoći u postavljanju preciznijih indikacija za primjenu lijekova, kao i razvoju novih lijekova. Istraživanja uloge GABA_A receptora u molekularnoj podlozi razvoja ovisnosti, kao i u potencijalnom neuroprotektivnom djelovanju supstanci u našem se laboratoriju provode na rekombinantnim receptorima, primarnim kulturama neurona, P19 staničnoj liniji, animalnim modelima, te humanim uzorcima.



Alkoholizam predstavlja čest i kompleksan kronični poremećaj s brojnim genetskim i okolišnim rizičnim čimbenicima. Stoga je identifikacija gena koji utječu na rizik razvoja ovisnosti o alkoholu izuzetno teška i zahtjevnja. Iz tog razloga sve do nedavno jedini geni za koje je utvrđeno da utječu na rizik razvoja alkoholizma bili oni koji su kodirali enzime uključene u metabolizam alkohola, no danas je primjenom novih metoda pokazana povezanost i nekoliko drugih gena s ovim poremećajem. Novija su istraživanja uputila na povezanost razvoja alkoholizma i gena koji kodiraju podjedinice GABA_A receptora. Kako je poznato da GABA_A receptori posreduju akutne i kronične učinke alkohola uključujući razvoj tolerancije, ovisnosti i sindroma ustezanja alkohola ovi geni, obzirom na lokaciju i funkciju, predstavljaju potencijalne kandidate za rizik razvoja ovisnosti o alkoholu.



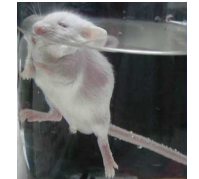
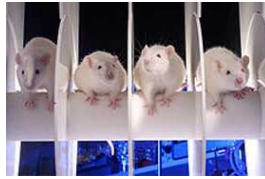
Pretraživanja humanog genoma ukazala da je u razvoj ovisnosti o alkoholu uključen i klaster od 4 gena koji kodiraju za podjedinice GABA_A receptora ($\gamma 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ i $\beta 1$), a koji je smješten na kromosomu 4p12. Ovi geni visoko su eksprimirani u hipokampusu i većini dopaminskih neurona supstancije nigre i ventralnog tegmentalnog područja, odnosno u područjima mozga uključenim u razvoj ovisnosti. Fino mapiranje spomenute genske regije utvrdilo je značajnu povezanost alkoholizma i brojnih biljega u genu koji kodira $\alpha 2$ podjedinicu GABA_A receptora (GABRA2) i to posebno polimorfizama koji se pružaju nizvodno od introna 3, u blizini susjednog gena GABRG1 koji kodira $\gamma 1$ podjedinicu GABA_A receptora, a koji se također povezuje s rizikom razvoja ovisnosti o alkoholu. Iako su dosadašnja istraživanja počela rasvjetljavati povezanost ovisnosti o alkoholu i gena GABRA2, potrebne su daljnje studije koje bi uključivale i podtipove alkoholizma, različite etničke grupe, žene, kao i brojne druge čimbenike, a kojima bi se utvrdila točna uloga ovih gena u razvoju alkoholizma. Stoga se u laboratoriju provode istraživanja s ciljem utvrđivanja moguće povezanosti određenih polimorfizama, posebice onih smještenih u genu GABRA2, s rizikom razvoja alkoholizma u hrvatskoj populaciji. Također se istražuju moguće razlike u distribuciji GABRA2 genotipova s obzirom na spol, početak konzumiranja alkohola, te agresivno ponašanje, a u svrhu stjecanja novih spoznaja o genetskim čimbenicima uključenima u etiologiju alkoholizma.



Benzodiazepini su široko primjenjivana skupina lijekova u kliničkoj praksi zbog svojih brojnih pozitivnih terapijskih učinaka, te niskog stupnja toksičnosti. Imidazopiridin **zolpidem** (Sanval, Ambien) se koristi prvenstveno zbog svog sedativnog djelovanja (nesanica) no naša su istraživanja pokazala kako bi se mogao koristiti u terapiji epilepsije, posebice kod djece.

Dugotrajna primjena benzodiazepinskih lijekova potiče brojne regulatorne mehanizme, a smatra se da su neke od prilagodbi GABA_A receptora razlog nastanka tolerancije na farmakološke učinke lijeka, kao i pojavu ovisnosti.

Naša su *in vivo* istraživanja pokazala da ponavljanom primjenom hipnotika zolpidema dolazi do razvoja tolerancije na njegovo sedativno i antikonvulzivno djelovanje koje se ne razlikuje od onog dobivenog djelovanjem klasičnog benzodiazepina, diazepam (Apaurin).



Produljenom zauzetošću GABA_A receptorskog kompleksa benzodiazepinima, ali i zolpidemom, dolazi do povećanja ukupnog broja GABA_A receptora u kulturi HEK 293 stanica sa stabilnom ekspresijom rekombinantnih $\alpha 1\beta 2\gamma 2S$ receptora, te slabljenja alosteričkih veza između veznog mjesta za GABA-u i benzodiazepine.

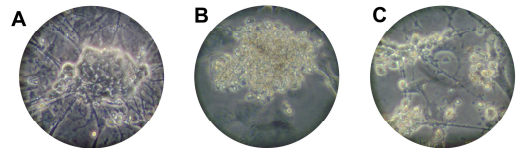
Dugotrajno izlaganje primarne kulture cerebelarnih neurona izoliranih iz štakora nije izazvalo promjene u broju veznih mjesta za benzodiazepine, kao nit i promjenu ekspresije gena za $\alpha 1$ podjedinicu GABA_A receptora. Međutim, istovremeno dolazi do djelomično razdvajanje alosteričkih veznih mjesta na GABA_A receptorskom kompleksu. Pretpostavlja se kako je upravo slabljenje alosteričkih veza uključeno u nastanak tolerancije na neki lijek koji svoje učinke ostvaruje vezanjem na benzodiazepinsko vezno mjesto GABA_A receptora.

Sposobnost samoobnavljanja mozga, za razliku od većine drugih tkiva, je izrazito mala. Diferencirane živčane stanice se ne mogu regenerirati, a matične stanice, iako prisutne u mozgu odraslih jedinki, imaju vrlo ograničenu sposobnost stvaranja neurona kao odgovor na oštećenje. Do oštećenja i posljedičnog odumiranja i gubitka funkcije živčanih stanica dolazi u brojnim akutnim stanjima (moždani udar, ozljeda glave kod npr. prometne nezgode), ali i u kroničnim neurodegenerativnim bolestima čija progresija traje godinama (Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest, multipla skleroza).

Pojam **neuroprotekcija** u najširem smislu podrazumijeva sve one mehanizme koji služe zaštiti živčanih stanica, odnosno smanjenju oštećenja tj. degeneraciju neurona. Cilj neuroprotekcije je ograničiti područje nefunkcionalnih neurona, usporiti njihovo odumiranje i održati maksimalni mogući integritet staničnih interakcija kako bi funkcija preostalih neurona ostala očuvana.

Unatoč brojnim istraživanjima potencijalnih neuroprotektivnih supstanci s različitim mehanizmima djelovanja, zadovoljavajuća terapija još uvijek ne postoji. Stoga je jedan od imperativa i izazova znanstvene zajednice, kao i farmaceutske industrije, razvoj novih i učinkovitijih lijekova s neuroprotektivnim djelovanjem.

Kao model za ovakva istraživanja vrlo često se koriste kulture neurona. U našem laboratoriju uspostavljen je postupak dobivanja **kulture neurona P19** iz pluripotentnih stanica teratokarcinoma miša. Ovi neuroni svojim morfološkim, biokemijskim i funkcionalnim karakteristikama odgovaraju neuronima *in vivo* te se mogu koristiti kao pouzdan model za farmakološka i neurobiološka istraživanja.



A kultura neurona P19
B u uvjetima oksidativnog stresa stanice su oštećene, nestaju veze između neurona
C u prisutnosti zolpidema ponovo se uspostavljaju veze između živčanih stanica

U kulturi neurona P19 dvije skupine spojeva pokazala su neuroprotektivno djelovanje. S jedne strane bavimo se učinkom hipnotika **zolpidema**, lijeka koji se koristi primarno za liječenje nesаницe, a djeluje putem GABA_A receptora. S druge strane, sve je veće zanimanje za spojeve prirodnog porijekla, posebice **flavonoide** koji imaju jako antioksidativno djelovanje, a zastupljeni su u namirnicama biljnog porijekla. Na slici je prikazano da flavonoid kvercetin (u većim količinama nalazimo ga u jabukama, luku, zelenom čaju) djeluje protektivno na oštećenje izazvano oksidativnim stresom, odnosno u uvjetima pojačanog nakupljanja slobodnih radikala koje je vezano uz fiziološko starenje, ali i uz akutno i kronično oštećenje neurona.