

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mojca ŠKRGET

**VPLIV CENTRALNO DELUJOČIH ZRAVIL NA
PRIVZEM HISTAMINA V PODGANJE ASTROCITE,
GOJENE V PRIMARNI KULTURI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mojca ŠKRGET

**VPLIV CENTRALNO DELUJOČIH ZRAVIL NA PRIVZEM
HISTAMINA V PODGANJE ASTROCITE, GOJENE V PRIMARNI
KULTURI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF CENTRALLY ACTING DRUGS ON THE UPTAKE
OF
HISTAMINE INTO RAT ASTROCYTES BREEDDED IN PRIMARY
CULTURE**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek programa študija biologije, sistematsko ekološkega bloka na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Diplomsko delo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce KRŽAN.

Študijska komisija dodiplomskega študija Oddelka za biologijo je na seji dne 18.04.2008 za mentorico imenovala prof.dr. Mojco Kržan.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rok KOSTANJŠEK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
oddelek za biologijo

Član prof. dr. Mojca KRŽAN, dr. med., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
(mentorica): inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo

Član prof. dr. Tom TURK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
(recenzent): oddelek za biologijo

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 15.09.2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca ŠKRGET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK
KG nevrottransmitor histamin/ astrociti/ antidepressivna zdravila / antiepileptična zdravila
KK
AV ŠKRGET Mojca
SA KRŽAN Mojca (mentorica)
KZ SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2010
IN VPLIV CENTRALNO DELUJOČIH ZRAVIL NA PRIVZEM HISTAMINA V
PODGANJE ASTROCITE, GOJENE V PRIMARNI KULTURI
TD diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP XI, 62, 4, 21, 38
IJ sl
JI sl / en
AI Astrociti so v možganih odgovorni za vzdrževanje homeostaze. Na svojih membranah izražajo številne transporterje, s katerimi sodelujejo pri privzemu nevrottransmitorjev, tudi nevrottransmitorja histamina. Specifičnega transporterja zanj še niso odkrili, vemo pa, da ga privzemajo tudi v astrocite. V okviru diplomske naloge smo proučevali vpliv antidepressiva [amitriptilina], ter antiepileptičnih zdravil alosteričnih modulatorjev receptorja GABA A [fenobarbitona in diazepama] ter novejšega protiepileptičnega zdravila levetiracetama na privzem in sproščanje ^3H -histamina v in iz astrocitov. Astrocite smo predinkubirali z različnimi koncentracijami izbranih zdravil v pufru za privzem, nato smo dodali 125 nmol/L ^3H -histamin. Po 20 minutah smo reakcijo prekinili. Pri preverjanju vpliva izbranih zdravil na spremembo smeri transporta ^3H -histamina iz astrocitov smo uporabili podoben poskus, kjer smo najprej nasitili celice s ^3H -histaminom in izzvali sproščanje le-tega z izbranimi zdravili. Na privzem ^3H -histamina je delovalo antidepressivno zdravilo amitriptilin in antiepileptično zdravilo levetiracetam, kar nakazuje na dodaten mehanizem delovanja. Ugotovili smo tudi, da antiepileptična zdravila povečajo sproščanje ^3H -histamina iz astrocitov. S tem je potrjeno dodatno protiepileptično delovanje, kar ponuja možnosti za nove raziskave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC
CX Neurotransmitter histamine/ astrocytes/ antidepressant drugs /antiepileptic drugs
CC
AU ŠKRGET Mojca
AA KRŽAN Mojca
PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2010
TI
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO XI, 62, 4, 21, 38
LA sl
AL sl / en
AB Astrocytes in brain are responsible for maintaining a balanced extracellular environment. They express many different transporters on their membrane, with which they uptake neurotransmitters, also the neurotransmitter histamine. A specific transporter for histamine has not yet been identified, but it is also taken up into astrocytes.
In my graduation thesis, I explored the properties of the uptake and efflux of ^3H -histamine in astrocytes. The influence of antidepressant (AD) and antiepileptic (AE) drugs, group of non-selective antidepressants NSRI [amitriptylin], antiepileptic group modulators of GABA_A receptor [phenobarbiton, diazepam] and antiepileptics with not well defined mechanism [levetiracetam] on the uptake and efflux of ^3H -histamine into astrocytes was studied.
For the uptake experiments astrocytes were preincubated with different concentrations of chosen drugs before 125 nmol/L of ^3H -histamine was added. The reaction was stopped after 20 minutes. For the efflux experiments, astrocytes were first loaded with ^3H -histamine. The release of ^3H -histamine into incubation medium induced by amitriptyline, phenobarbiton, diazepam and levetiracetam was observed.

Antiepileptic drugs have influence on the change of the transport of ^3H -histamine and increase its release from the astrocytes. With this the additional antiepileptic activity is confirmed, which offers possibilities for new researches. Antidepressive drug amitriptylin and antiepileptic drug levetiracetam had effect on the uptake of the ^3H -histamine, which indicates additional mechanism of action.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACh - acetilholin

AD - antidepresivno zdravilo

AMI - amitriptilin

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

DAG - diacil glicerol

DZP - diazepam

DMEM - po Dulbeccu modificiran Eangelov medij

GABA - γ -aminomaslena kislina

HDC - histidin-dekarboksilaza

HNMT - histamin N-tele-metiltransferaza

IP3 - inozitol trifosfat

K_m - Michaelisova konstanta

LTC - levetiracetam

MAO B - monoamin-oksida B

MAOI - inhibitorji monoamin-oksidade

OCT - (organic cation transporter) transmembranski prenašalec organskih kationov

PHB - fenobarbiton

REM faza - (rapid eye movement) faza spanja z značilnim hitrim premikanjem oči

SLC6 - (solute carrier 6) transmembranski prenašalci družine 6

SLC22 - (solute carrier 22) transmembranski prenašalci družine 22

SNRI - inhibitorji ponvne privzema noradrenalina

SSRI - inhibitorji ponvne privzema serotonina

SV2A - 2A glikoprotein na sinaptičnih veziklih

TM nucleus - tuberomamilarno jedro

V_{max} - maksimalna hitrost

SLOVARČEK

Ekscitatorni nevrotransmitor – živčni prenašalec, ki po vezavi na receptor povzroči depolarizacijo membrane

HEPES – organska kemijska spojina s puferskimi lastnostmi, ki se uporablja pri gojenju celičnih kultur

Inhibitorni nevrotransmitor – živčni prenašalec, ki po vezavi na receptor povzroči hiperpolarizacijo membrane

Intraperitonealno – v trebušno votlino

Konfiguracija – prostorska razporeditev atomov v molekuli

Nevrotransmitor – živčni prenašalec v živčnem sistemu

Osteomalacija – mehkost kosti zaradi premajhne količine mineralnih snovi

Prekurzor – molekula, ki je biokemična predstopnja druge molekule

Protein-kinaza – encim, ki pripenja fosfatne skupine na proteine in s tem spremeni njihove lastnosti in funkcije

Receptor – protein v celični membrani ali v jedru, na katerega se veže določen prenašalec in povzroči učinek

KAZALO

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	V
SLOVARČEK	VI
KAZALO	VII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
1 UVOD	1
1.1 UVODNA BESEDA	1
1.2 NAMEN DELA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ŽIVČNI SISTEM	3
2.2 NEVROTRANSMITORJI	4
2.2.1 Skupine nevrotransmitorjev	4
2.2.2 Sproščanje nevrotransmitterjev	5
2.2.3 Mehanizem delovanja nevrotransmitorjev	7
2.2.4 Inaktivacija nevrotransmitorjev	8
2.3 ASTROCITI	8
2.3.1 Celice glije	8
2.3.2 Astrociti	9
2.4 HISTAMIN	10
2.4.1 Sinteza in inaktivacija histamina	11
2.4.2 Histamin kot nevrotransmitor	12
2.4.3 Histaminski receptorji	13
2.4.4 Transport histamina v astrocite	15
2.4.5 Kinetika privzema histamina	15
2.4.6 Vloga histamina pri depresiji	16
2.4.7 Vloga histamina pri epilepsiji	17
2.5 CENTRALNO DELUJOČA ZDRAVILA	17

2.5.1	Antidepresivna zdravila.....	18
2.5.1.1	Depresija	18
2.5.1.2	Hipoteze o depresijah.....	19
2.5.1.3	Skupine antidepresivnih zdravil.....	20
2.5.2	Antiepileptična zdravila	22
2.5.2.1	Epilepsija.....	22
2.5.2.2	Mehanizmi delovanja antiepileptičnih zdravil.....	23
2.6.	PREDSTAVITEV CENTRALNO DELUJOČIH ZDRAVIL UPORABLJENIH V POSKUSIH.....	25
2.6.1	Amitriptilin.....	25
2.6.2	Levetiracetam.....	26
2.6.2.1	Mehanizem delovanja	26
2.6.3	Diazepam.....	27
2.6.4	Fenobarbiton.....	28
3	MATERIAL IN METODE	29
3.1	MATERIALI	29
3.2	METODE.....	29
3.2.1	Živali	29
3.2.2	Priprava primarnih celičnih kultur	29
3.2.3	Sproščanje histamina.....	30
3.2.4	Privzem histamina	30
3.2.5	Določanje koncentracije proteinov.....	31
3.2.6	Analiza podatkov.....	31
4	REZULTATI.....	32
4.1	KINETIKA SPROŠČANJA HISTAMINA IZ ASTROCITOV	32
4.2	KONCENTRACIJSKA ODVISNOST SPROŠČANJA HISTAMINA IZ ASTROCITOV.....	34
4.3	ČASOVNA ODVISNOST VPLIVA ANTIEPILEPTIČNEGA IN ANTIDEPRESIVNEGA ZDRAVILA NA SPROŠČANJE ³ H-HISTAMINA IZ ASTROCITOV NEONATALNIH PODGAN	35
4.4	VPLIV ANTIEPILEPTIČNIH ZDRAVIL NA SPROŠČANJE ³ H-HISTAMINA IZ ASTROCITOV NEONATALNIH PODGAN.	36
4.5	VPLIV AMITRIPTILINA NA SPROŠČANJE ³ H-HISTAMINA IZ ASTROCITOV NEONATALNIH PODGAN	37
4.6	VPLIV NESELEKTIVNIH ZAVIRALCEV PRIVZEMA NA PRIVZEM HISTAMINA	38
4.7	VPLIV PROTIEPILEPTIČNIH ZDRAVIL NA PRIVZEM HISTAMINA.....	39
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	40

5.1	RAZPRAVA.....	40
5.2	SKLEPI.....	44
6	POVZETEK.....	45
7	VIRI	46

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Tabela 1: Skupine nevrotransmitorjev, mesto delovanja in glavni učinki delovanja .	5
Tabela 2: Glavne funkcije astrocitov v različnih življenjskih obdobjih.....	10
Tabela 3: Klasifikacija antidepresivov s primeri	20
Tabela 4: Razdelitev in mehanizem delovanja antiepileptikov	24

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Komunikacija med nevroni.....	7
Slika 2: Astrociti, posneti z elektronskim mikroskopom.	9
Slika 4: Strukturna formula molekule histamina	10
Slika 5: Sinteza in metabolizem histamina v histaminergičnih nevronih.	11
Slika 6: Shema histaminergičnega sistema z jedri histaminergičnih nevronov v tuberomamilarnem nukleusu in aksonskimi projekcijami	12
Slika 7: Shema s proteinom G sklopljenega receptorja.....	13
Slika 8: Odnos hitrosti specifičnega privzema.	16
Slika 9: Shema delovanja zdravil v osrednjem živčevju membransko vezanih proteinov ..	17
Slika 10: Strukturna formula amitriptilina.	25
Slika 11: Strukturna formula levetiracetama.....	27
Slika 12: Strukturna formula diazepama.	27
Slika 13: Strukturna formula fenobarbitona.....	28
Slika 14: Časovni potek sproščanja ³ H-histamina iz kulture astrocitov.....	33
Slika 15: Koncentracija ³ H-histamina v celicah astrocitov neonatalnih podgan po reakciji sproščanja histamina iz celic astrocitov.	33
Slika 16: Vpliv koncentracije ³ H-histamina v predinkubaciji na sproščanje ³ H-histamina iz celic astrocitov.....	34
Slika 17: Vpliv centralno delujočih zdravil na sproščanje ³ H-histamina iz astrocitov neonatalnih podgan.	35
Slika 18: Vpliv antiepileptičnih zdravil na sproščanje histamina iz astrocitov neonatalnih podgan.	36
Slika 19: Vpliv neselektivnega zaviralca privzema na sproščanje ³ H-histamina iz astrocitov neonatalnih podgan.	37
Slika 20: Vpliv neselektivnega inhibitorja privzema na privzem ³ H-histamina v astrocite neonatalnih podgan.	38
Slika 21: Vpliv antiepileptičnih zdravil na privzem ³ H-histamine v astrocite neonatalnih podgan..	39

1 UVOD

1.1 UVODNA BESEDA

Ljudje se razlikujemo od drugih živih bitij pa razumu in zmožnosti čustvovanja ter razmišljanja. Aristotel je v delu O duši - »Peri Psyches« človeka od drugih živih bitij ločil po razmišljajoči duši. S temi trditvami se marsikdo ne bi strinjal, tudi živali so zmožne razmišljanja, učenja in čustvovanja, le na drugačni stopnji. Moje diplomsko delo ne bo razkrilo razlik med dušo človeka in dušo živali, bo pa vseeno odkrilo kanček skrivnosti o kompleksnem delovanju centralnega živčnega sistema, sedežu razuma in mišljenja.

V diplomskem delu sem preučila vpliv antidepresivnega zdravila - amitriptilina in nekaterih antiepileptičnih zdravil na privzem histamina v astrocite. Izbrala sem manj značilne in preučevane akterje, ki pa so se v rezultatih dela pokazali za pomembne udeležence pri regulaciji delovanja centralno-živčnega sistema. Centralno delujoča zdravila vplivajo na privzem nevrotasmitorjev, vendar je histamin kot nevrotasmitor manj poznan in tudi manj raziskan, vseeno pa tarča delovanja zdravil, ki delujejo na centralni živčni sistem. Tudi privzem v astrocite je pomožni mehanizem inaktivacije delovanja nevtotrasmitorjev a vseeno pomembno prispeva k usklajenosti delovanja živčnega sistema.

1.2 NAMEN DELA

V današnjem času so duševne bolezni vedno pogostejše. Z depresijo se vsaj enkrat v življenju sreča vsaka šesta oseba (Mussavi s sod., 2007). Obstajajo dokaj učinkoviti načini zdravljenja, ker pa je bolezen kompleksna, imajo tudi zdravila zapleten način delovanja, ki vključuje več mest delovanja, posledica pa so mnogi neželeni učinki. Antidepresivna zdravila, uspavala in pomirjevala spadajo med zelo pogosto predpisana zdravila. Veliko uporabnikov jih (zlo)uporablja za samozdravljenje ter za rekreativno jemanje kot mamila. Raziskave na tem področju so še kako pomembne za spoznavanje natančnega načina delovanja in možnosti preprečevanja neželenih in toksičnih učinkov. V svoji diplomski nalogi sem preučevala vpliv centralno delujočih zdravil, protipskega antidepresiva amitriptilina in nekaterih antiepileptikov, na privzem histamina. Ker se je med delom izkazalo, da nekatera centralno delujoča zdravila vplivajo tudi na spremembo smeri transporta histamina sem delo razširila še na to področje.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomu sem preverila naslednje delovne hipoteze:

- Privzem ^3H -histamina v astrocite lahko zavirajo zdravila, ki učinkujejo znotrajcelično.
- Privzem ^3H -histamina zavirajo nekateri antidepresivi.
- Nekatera zdravila lahko spremenijo smer transporta ^3H -histamina preko transportnih proteinov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ŽIVČNI SISTEM

Zmožnost preživetja posameznika in njegova uspešnost je v veliki meri odvisna od fiziološke zmožnosti uravnavanje homeostaze organskih sistemov. Spremembe v telesu in v zunanjem okolju so dražljaji, ki jih prepozna omrežje živčnega sistema s svojimi celicami – nevroni. Brez učinkovitega živčnega sistema organizem ne bi zaznal lakote, mraza, bolečine itd. in tak ne bi bil zmožen življenja.

Odgovor na dražljaj je odvisen od nevronske signalizacije, torej komunikacije med nevroni. Ta poteka v štirih fazah, ki vključujejo recepcijo/zaznavo, to je prepoznavanje dražljaja ali senzorne informacije; transmisijo/prenos dražljaja oz. prevajanje vzdolž signalnih nevronov do centralnega-živčnega sistema (CŽS), ki ga sestavljajo možgani in hrbtenjača in po integraciji prevajanje preko efektorskih nevronov do tarčnih organov. Tretja faza je integracija oz. prepoznavanje signalov in določanje primernih odgovorov v CŽS. Efektorski nevroni nato prenesejo informacijo o želenem odgovoru do tarčnih organov. Četrta faza je končni odgovor na dražljaj, ki ga izvedejo tarčni organi, mišice ali žleze (Alberts 2002). Procesiranje senzorične informacije v pravilen mentalni ali motorični odgovor je ena izmed pomembnejših funkcij živčnega sistema. Več kot 99% senzornih informacij možgani označijo kot nepomembne. Tako se na primer ne zavedemo stalnega trenja med telesom in obleko, ki jo nosimo, saj bi nenehno vzdraženje živčnega sistema privedlo do preobremenitve, hitro pa zaznamo različne nenadne spremembe v okolju (npr. sprememba temperature ali vonja), kar nam omogoča prilagoditve na nove razmere ali izzove odgovor umika pred nevarnostjo. Nevrotransmitorji so kemični sporočevalci, s katerimi nevroni komunicirajo med sabo. Če njihovo delovanje ni natančno in če njihove koncentracije niso prave, to vodi v bolj ali manj huda bolezenska stanja kot so epilepsija, depresija, shizofrenija in podobne. Zaradi tega je nevrobiologija raziskovalno zelo živahno področje in močno sodeluje z medicino in farmacijo.

Pri urejanju homeostaze in pravilnem delovanju živčnega sistema imajo ob nevronih in nevrotransmitorjih pomembno vlogo še pomožne celice, tako imenovane celice glije. Te celice oskrbujejo in varujejo nevrone in imajo druge regulacijske funkcije. Astrociti so celice glije zvezdaste oblike, ki nevrone oskrbujejo z glukozo in pomagajo uravnati sestavo

ekstracelularne tekočine. Lahko tudi oddajajo šibke električne signale, zaradi česar so danes dokaj pogost predmet nevrobioloških raziskav, kot morebitne pomočnice pri prevajanju signalov oz. informacij (Alberts 2002).

2.2 NEVROTRANSMITORJI

Nevrotransmitorji oz. kemični prenašalci informacij v živčevju se sintetizirajo v nevronih in shranjujejo v sinaptičnih veziklih. Po aktivaciji presinaptičnega nevrona se z eksocitozo sprostijo v sinaptično špranjo, prostor med pre- in postsinaptičnim nevronom. Ravno pravih količina prenašalca sproži aktivacijo postsinaptičnega nevrona in informacija se na tak način prenaša. Za učinkovit prenos informacije so potrebne natančne regulacije količine in časa aktivnosti prenašalcev. Prenašalec se mora po končanem prenosu informacije inaktivirati ali odstraniti iz sinaptične špranje. Pretirana stimulacija s prenašalcem vodi v nenormalno delovanje živčnega sistema in lahko povzroči celo celično smrt. Tudi premajhna stimulacija prepreči učinkovit prenos informacije. Posledice tega so nevrološke bolezni. Pomembna lastnost nevrotransmitorjev je, da ne prehajajo krvno-možganske pregrade.

2.2.1 Skupine nevrotransmitorjev

Nevrotransmitorje delimo glede na velikost na prenašalce z nizko molekulsko maso, kamor spadajo acetilholin, monoamini (histamin, serotonin, dopamin itd.) in aminokisline, ki delujejo kot prenašalci (glutamat, GABA, aspartat, glicin itd.). Prenašalci z večjo molekulsko maso so nevro-proteini (npr: endorfini, snov P, nevrokinin in drugi). Med prenašalce v živčnem sistemu sodita tudi plina: dušikov oksid in ogljikov monoksid.

Tabela 1: Skupine nevrottransmitorjev, mesto delovanja in glavni učinki delovanja (povzeto po Solomon s sod., 2002).

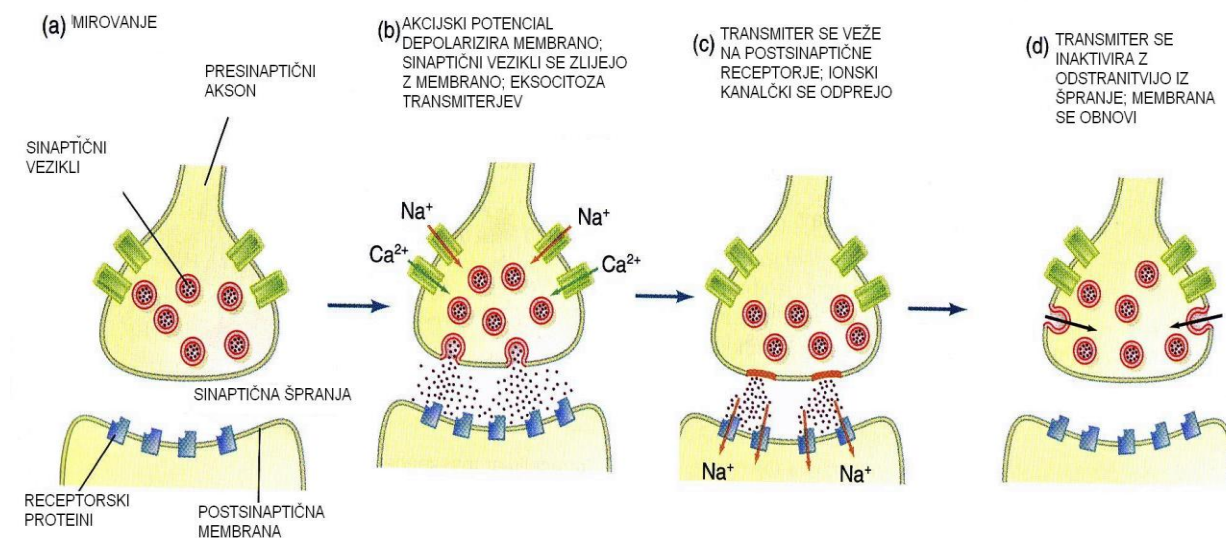
SN OV	MESTO DELOVANJA	UČINEK
Acetilholin	Motorični nevroni, določeni nevroni v možganih in v avtonomnem živčnem sistemu.	Vzdraženje skeletnih mišic in inhibitorni učinek na srčno mišico.
Biogeni amini		
Dopamin	CŽS	Vzdržuje ravnovesje med inhibicijo in ekscitacijo nevronov.
Serotonin	CŽS	Ekscitacijski učinek na kontrolo delovanja mišic in inhibicijski učinek zaznave.
Histamin	CŽS	Več stimulacijskih in inhibicijskih funkcij.
Aminokisline		
GABA	Inhibitorni internevroni in CŽS.	Inhibitorni učinek na živčne poti v CŽS.
Glutamat	Možgani	Ekscitacijski učinek v možganih.
Nevropeptidi		
Endorfini	Možgani	Regulacija bolečine.

2.2.2 Sproščanje nevrottransmitorjev

Nevroni ohranjajo elektro-negativno notranje okolje glede na pozitivno zunajcelično okolje. Razlika v naboju ustvari na membrani napetost, ki ji pravimo mirovni membranski potencial (MMP), to je razlika med potencialom znotraj in potencialom zunaj celice. Informacija se po nevronih razširja v obliki akcijskega potenciala (AP), kar pomeni prehodno spremembo v elektronskem naboju na membranah. Sprememba naboja je časovno in krajevno omejena. V prostoru tik ob površini obeh strani membrane ioni niso razporejeni enakomerno. Do te

neenakomerne razporeditve ionov med notranjo in zunanjo stranjo membrane pride zaradi delovanja Na^+/K^+ -ATPaze in zaradi delovanja napetostno in od ligandov odvisnih ionskih kanalčkov, ki omogočajo prehod ionov preko membrane.

Ob akcijskem potencialu se celična membrana depolarizira, postane bolj pozitivno nabita. Na^+/K^+ -ATPaza prenaša ione Na^+ iz celice in hkrati prenaša ione K^+ v celico. Zaradi delovanja Na^+/K^+ -ATPaze je koncentracija ionov Na^+ zunaj celice približno desetkrat višja kot v notranjosti celice in koncentracija ionov K^+ znotraj celice dvajsetkrat višja kot zunaj celice. Če pride do razlike v koncentraciji nekega iona med obema stranema polprepustne membrane, se preko membrane ustvari ravnovesni potencial (Ex). Natrijevi, kalijevi in določeni drugi ioni (npr. Cl^- , Ca^{2+}) prehajajo preko membrane tudi skozi specifične ionske kanalčke oz. s prenašalci. Ker kalijevi ioni zaradi koncentracijskega gradienta prehajajo na zunanjo stran membrane je posledica neenakomerna razporeditev nabojev na obeh straneh membrane. Mirovni membranski potencial je zato najbližje vrednosti ravnovesnega potenciala za ione K^+ . Do spremembe MMP pride zaradi sprememb v prepustnosti membrane za določene ione, predvsem zaradi aktivacije aktivnih ionskih kanalčkov npr. ob vezavi prenašalca pri kemično odvisnih ionskih kanalčkih ali ob sami spremembi MMP pri napetostno odvisnih kanalčkih. Hitri spremembi MMP v pozitivno smer pravimo depolarizacija, širjenje spremembe vzdolž membrane pa je akcijski potencial (AP). Akcijski potencial nastane po načelu »vse ali nič«, vendar je časovno omejen. Lastnost AP je, da se širi vzdolž membrane. Na presinaptični membrani je veliko število napetostno odvisnih natrijevih, kalijevih in kalcijevih kanalčkov. Ob depolarizaciji presinaptične membrane se ti kanalčki odprejo in v presinaptične končiče vdrejo kalcijevi ioni. Ti se vežejo na posebne proteine na notranji strani presinaptične membrane in to je signal za sproščanje nevrottransmitorjev iz sinaptičnih veziklov v sinaptično špranjo. Nevrottransmitorji ob vezavi povzročijo odprtje kemijsko odvisnih ionskih kanalčkov in tako pride do spremembe MMP v AP na postsinaptični membrani. Najpogostejši nevrottransmitor v CŽS je glutamat (Ribarič 2009).



Slika 1: Komunikacija med nevroni, povzeto po Randall s sod., 2001

2.2.3 Mehanizem delovanja nevrottransmitorjev

Postsinaptična nevronska membrana na zunanji strani vsebuje veliko receptorskih proteinov za nevrottransmitorje. Ob vezavi nevrottransmitorja receptorji spremenijo svojo konformacijo tako, da začnejo prepuščati ione ali aktivirajo sekundarne sporočevalce. Nevrottransmitor, ki povzroči prepuščanje kationov v notranjost nevrona deluje ekscitatorno ali vzpodbujajoče (npr. glutamat preko receptorjev NMDA, AMPA ali kainatnih receptorjev), medtem ko nevrottransmitor, ki povzroči prepuščanje anionov deluje inhibitorno (npr. gama-amino maslena kislina (GABA) preko receptorjev GABA_A). Pri prehodu kationov v notranjost nevrona ta izgubi elektronegativnost in se depolarizira oz. se hiperpolarizira pri prehodu anionov. Nevrottransmitorji, ki aktivirajo sekundarne sporočevalce, lahko povzročijo dolgoročneje spremembe. Dobro raziskan sekundarni sporočevalec je protein G. Aktivirani sporočevalci lahko odpirajo kanalčke, aktivirajo membranske encime, aktivirajo intracelularne encime in tudi aktivirajo gensko transkripcijo. Usklajeno delovanje receptorjev in nevrottransmitorjev, ki delujejo vzpodbujajoče ali zavirajoče je nujno za normalno delovanje živčnega sistema. To omogoča tudi pravilno filtriranje med informacijami in preprečitev preobremenitve sistema. Nekontrolirano širjenje vzbujenja nevronov vodi v huda bolezenska stanja, npr. epilepsijo (Guyton in Hall, 2006).

2.2.4 Inaktivacija nevrotransmitorjev

Ko nevrotransmitor zaključi svojo funkcijo se mora hitro inaktivirati, da ne pride do prekomernega vzdraženja, ki lahko v skrajnem primeru vodi v celično smrt. Nekateri nevrotransmitorji se inaktivirajo z razgradnjo. Tak je npr. acetilholin (ACh), ki ga zunajcelični encim acetilholin-esteraza razgradi na kemični komponenti holin in acetat.

Biogeni amini se ponovno privzemajo v sinaptične končiče. Po privzemu v živčne končiče lahko pride ali do ponovnega »privzemanja« v vezikle, (t.i. reciklaža nevrotransmitorjev) ki se lahko kasneje ponovno uporabijo za nevrotransmisijo ali pa se privzeti nevrotransmitorji razgradijo z znotrajceličnimi encimi. Privzem lahko poteka tudi s pomočjo celic glije. Eden izmed možnih inaktivacijskih načinov je še difuzija v medceličnino, pri čemer vzburjenje upade, ko upade koncentracija nevrotransmitorja. Nekatera antidepresivna zdravila delujejo inhibitorno na ponovni privzem nevrotransmitorjev in s tem regulirajo njihovo delovanje. Kokain deluje inhibitorno na ponovni privzem dopamina in s tem podaljša njegov učinek na razpoloženje (Solomon s sod., 2002).

2.3 ASTROCITI

2.3.1 Celice glije

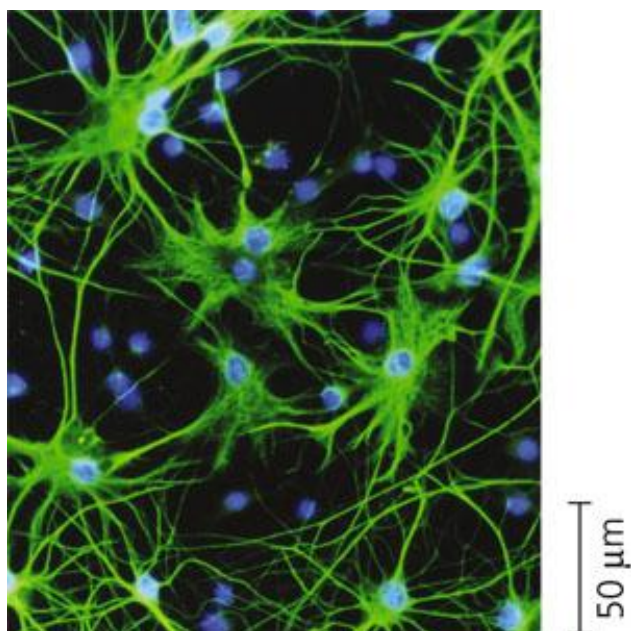
Nevroni delujejo v povezavi s celicami glije, ki tvorijo zaprto in regulirano okolje za delovanje živčevja. Tako kot nevroni, je tudi večina celic glije ektodermalnega izvora (Alberts 2002). Sprva so jih opisali kot električno pasivno, nevzdražno tkivo, ki skrbi za pravilno razporejanje nevronov. Danes vemo, da je njihova vloga kompleksnejša in lahko aktivno posegajo v dogajanje v osrednjem živčevju (Kržan 2001).

Mikroglija celice so fagocitne celice mezodermalnega izvora, ki so del imunskega odziva ob poškodbah in infekcijah.

Makroglija celice delimo na tri glavne skupine: astrociti, oligodendrociti in Schwannove celice. Oligodendrociti tvorijo mielinske ovojnice v CŽS, Schwannove celice imajo enako vlogo v perifernem živčnem sistemu. Zmanjšano število mielinskih ovojnic je značilno za

bolezen multiplo sklerozo. Astrociti so najštevilčnejše celice glije, ki nevronom dajejo oporo in možganom strukturo (Nestler 2001).

2.3.2 Astrociti



Slika 2: Astrociti, posneti z fluorescenčnim mikroskopom. Zeleno obarvane celice so astrociti obarvani s fluorescentnimi protitelesi, modro so jedra astrocitov in drugih celic, obarvana z DNK preferenčnim barvilom (povzeto po Campbell s sod., 2008).

Astrociti predstavljajo do 50% možganske prostornine in dajejo oporo nevronom. Njihova pomembna funkcija je sodelovanje pri izgradnji in vzdrževanju krvno-možganske pregrade. Tvorijo presledkovne stike, s katerimi vzpostavljajo medcelično komunikacijo preko kalcijevih tokov.

Ker astrociti privzemajo presežek sproščenih nevrottransmitorjev in ione, omogočajo ohranjanje homeostaze okolja nevronov (Nestler 2001).

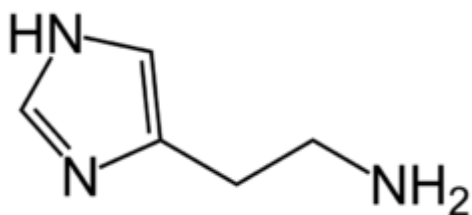
Astrociti niso vzdružni, lahko pa po stimulaciji s signalnimi molekulami sproščajo različne živčne prenašalce - nevrottransmitorje, rastne dejavnike, molekule zunajceličnega matriksa. V skladu s spremembami v neposrednem okolju lahko spreminjajo svojo obliko in funkcijo, zato imajo v različnih življenjskih obdobjih različne vloge (Kržan 2001).

Tabela 2: Glavne funkcije astrocitov v različnih življenjskih obdobjih (povzeto po Kržan 2001).

Življenjsko obdobje	Glavne funkcije astrocitov
Razvojno obdobje	Vodenje in usmerjanje rastočih nevronov. Sinteza trofičnih dejavnikov. Tvorba sinaps.
Normalno odraslo obdobje.	Ohranjanje homeostaze. Vpliv na sinaptično plastičnost. Tridelna sinapsa.
Pri možganskih poškodbah.	Nabrekanje astrocitov. Reaktivna gliosa.

2.4 HISTAMIN

Histamin je biogeni amin, prisoten v večini človeških tkiv, udeležen pri alergijskih in vnetnih reakcijah. Spada med heterociklične imidazole z dvema dušikovima atomoma v obroču.



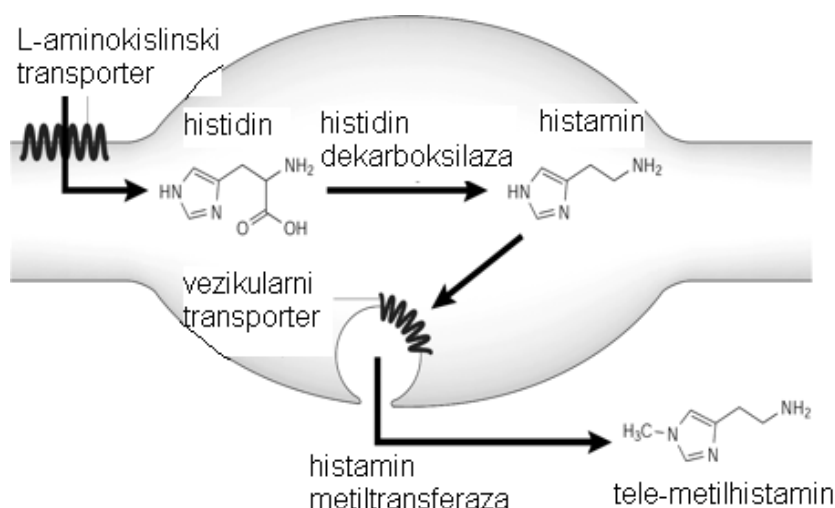
Slika 4: Strukturna formula molekule histamina (povzeto po Nestler s sod., 2001).

Njegova fiziološka funkcija je zapletena, kompleksna in še nepopolno raziskana. Deluje kot lokalni hormon, mediator vnetnih in imunski reakcij, vpliva na izločanje eksokrinih žlez (npr. posreduje pri izločanju HCl iz parietalnih celic želodca), na vazodilatacijo in kontrakcijo nekaterih gladkih mišic. V možganih je histamin prisoten v veliko manjših količinah kot v drugih organih in ima drugačno vlogo.

2.4.1 Sinteza in inaktivacija histamina

Na periferiji, zunaj osrednjega živčevja, poteka sinteza histamina v Golgijevem aparatu mastocitov in bazofilcev, v centralnem živčnem sistemu pa v histaminergičnih nevronih. Histamin se sintetizira iz aminokisline L-histidin preko oksidativne dekarboksilacije, ki jo katalizira encim histidin-dekarboksilaza (HDC). Sinteza je odvisna od razpoložljivosti prekursorjev, zlasti L-histidina) (Cheng 2002). Sinteza in vezikularno sproščanje histamina sta pod nadzorom histaminskih avtoreceptorjev H3, lociranih na somi in aksonih histaminergičnih nevronov.

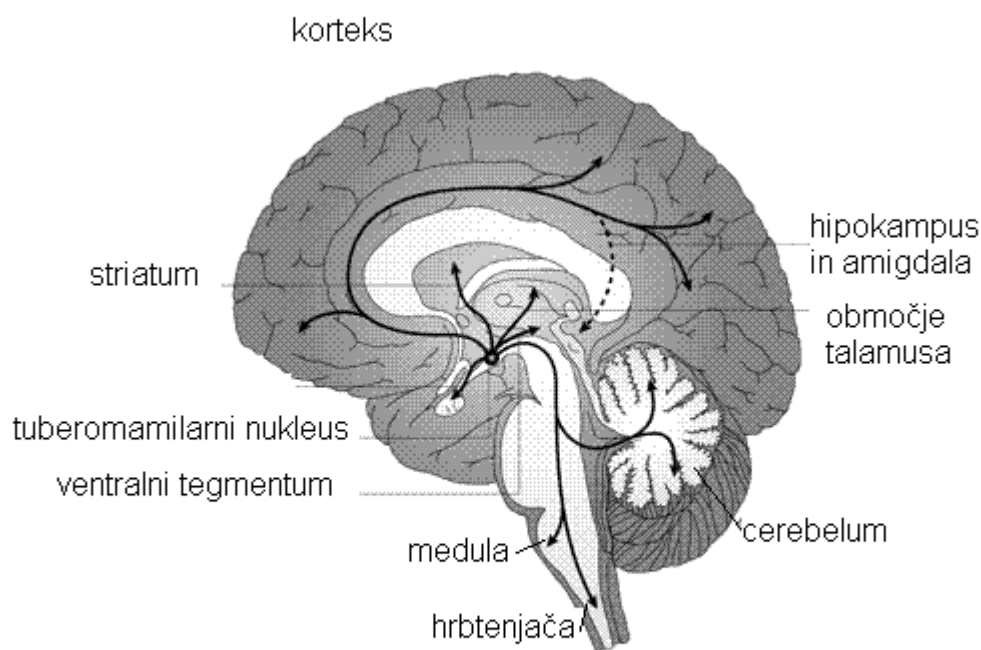
Inaktivacija histamina v centralnem živčnem sistemu poteka preko N-metilacije in oksidativne deaminacije. Znotrajcelični encim histamin N-tele-metiltransferaza (HNMT) katalizira prevorbo histamina v telemetilhistamin, ki se preko kombinacije delovanja monoamin- oksidaze B (MAO B) in aldehyd-dehidrogenaze razgradi do telemetil-imidazol očetne kisline (Brown, Stevens, Haas, 2000). Ker inaktivacija poteka znotrajcelično, je zanjo to reakcijo potreben (ponovni) privzem histamina v celice, udeležene v sinapsi. Te celice so tako nevroni kot celice glije- astrociti. Ker je histamin monoaminski nevrottransmitor, predvidevajo, da transport poteka preko nevrottransmitorskih prenašalcev družine SLC6 in SLC22 (OCT) oz. preko posebnega prenašalca za histamin, ki pa še ni poznan.



Slika 5: Sinteza in metabolizem histamina v histaminergičnih nevronih. Histidin se privzema preko L-aminokislinskega transporterja, se dekarboksilira, nastali histamin se transportira v vezikle. Inaktivacija poteka znotrajcelično z metilacijo (prirejeno po Haas in Panula, 2003).

2.4.2 Histamin kot neurotransmitor

V možganih histamin deluje kot prenašalec. Histaminergični nevroni so v tuberomamilarnem jedru posteriornega dela hipotalamusa. Histaminergični aksoni so razvejani po skoraj celotnem osrednjem živčnem sistemu. Morfološke značilnosti histaminergičnega sistema s kompaktnimi skupinami celic in široko razvejanostjo so podobne živčnim sistemom, ki izločajo druge biogene amine, npr. noradrenalinu in serotoninu. To kaže, da histamin sodeluje pri regulaciji aktivnosti večjih možganskih centrov (Blandina s sod., 2007). Aksonski izrastki histaminergičnih nevronov oživčujejo skoraj celotne možgane po dveh dvigajočih in eni spuščajoči se poti. Ventralna dvigajoča pot oživčuje hipotalamus, septum, Brocovo področje in olfaktorni bulbus, dorzalna pot pa talamus, hipokampus, amigdalo in rostralni del prednjih možganov. Spuščajoča pot oživčuje možgansko deblo in hrbtenjačo. Največja gostota histaminergičnih fibril se nahaja na področju hipotalamusa (Brown s sod., 2000).



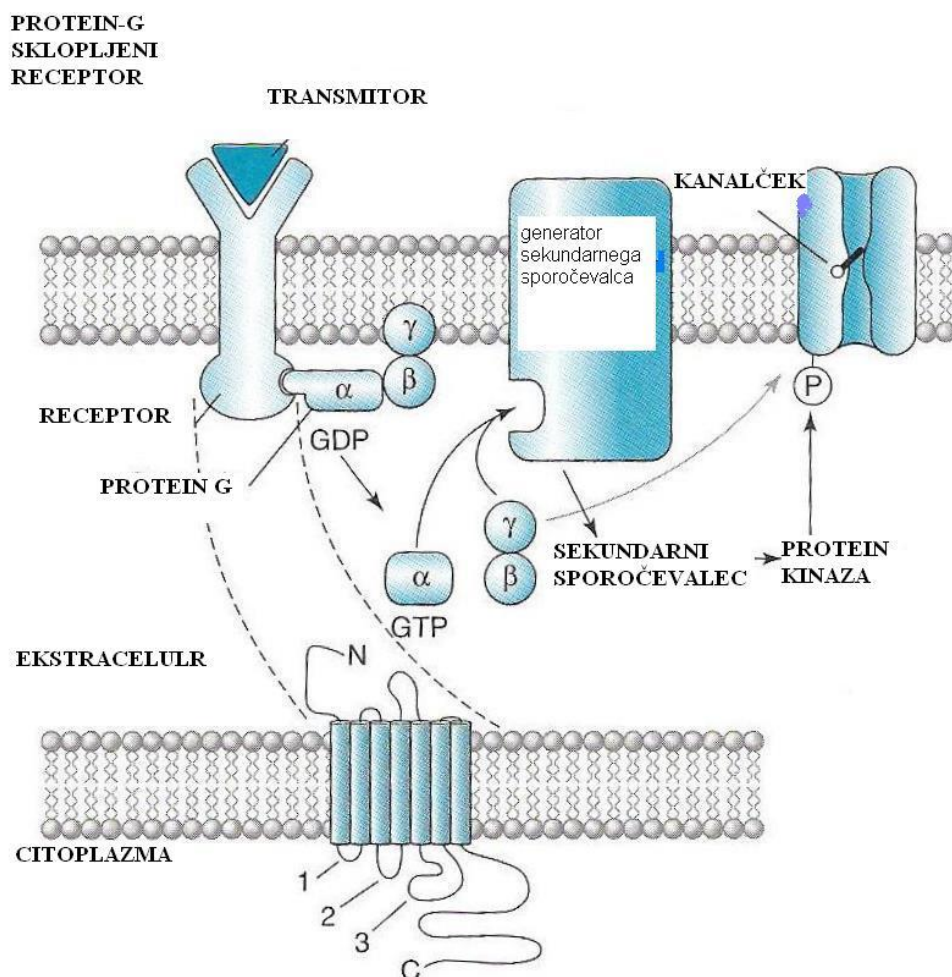
Slika 6: Shema histaminergičnega sistema z jedri histaminergičnih nevronov v tuberomamilarnem nukleusu in aksonskimi projekcijami (prirejeno po Hass in Panula, 2003).

Histamin kot nevrottransmitor vpliva na cikel spanja in budnosti, kar potrjujejo ugotovitve, da se histaminergični nevroni v stanju budnosti prožijo s frekvenco približno 3 Hz, ta se med fazami spanja močno zniža in v REM fazi skoraj popolnoma zamre.

Histamin ima vpliv tudi na homeostatske mehanizme kot so ravnovesje tekočin, hranjenje, termoregulacijo ter regulacijo kardiovaskularnega centra (Brown 2001).

2.4.3 Histaminski receptorji

Histamin deluje na štiri vrste s proteinom G sklopljenih receptorjev: H1, H2, H3 in H4.



Slika 7: Shema s proteinom G sklopljenega receptorja.

Vezava transmitorja povzroči konformacijske spremembe receptorja kar omogoči aktivacijo proteina G. Aktiviran G-protein razpade na prosto podenoto α , vezano na GTP in na podenotni dimer $\beta\gamma$. Obe podenoti lahko aktivirata encim, ki sintetizira sekundarne sporočevalce. Sekundarni sporočevalec preko aktivacija protein kinaze regulira ionske kanalčke (prirejeno po Nestler, 2001).

Receptorji H1 so večinoma nameščeni postsinaptično in ob aktivaciji sprožijo ekscitacijo. Največjo gostoto imajo na področjih talamusa in korteksa. Zunaj osrednjega živčevja jih najdemo v gladkem mišičju črevesja in bronhijev, kjer vplivajo predvsem na vazodilatacijo. Histamin ob vezavi na histaminski receptor H1, ki je sklopljen s proteinom Gq/G₁₁ stimulira aktivnost fosfolipaze C, ki sproži nastanek dveh sekundarnih sporočevalcev DAG in IP₃. DAG poveča aktivnost protein kinaze-C, ki fosforilira druge proteine, ti pa posredno vplivajo na spremembo membranskega potenciala. IP₃ se veže na receptorje IP₃, ki so na membranah endoplazemskega retikla, kar sproži sproščanje kalcijevih zalog v citoplazmo. To lahko aktivira NO sintezo, od kalcija odvisne kationske kanale ali Na⁺/K⁺ črpalko. Temu sledi sprememba membranskega potenciala in močna depolarizacija. Poskusi v razmerah *in vivo* so pokazali, da lahko histamin preko H1 receptorjev poveča sproščanje noradrenalina iz hipotalamusa, vendar točen mehanizem še ni znan.

Receptorji H2 in H3 sprožijo inhibicijo, nameščeni so post- in pre-sinaptično.

Receptorji H2 so odgovorni za stimulacijo izločanja HCl v želodec, povečanje srčnega utripa in povečanje moči srca. V CŽS so v postsinaptičnih membranah. Vezava histamina na receptor H2, sklopljenega s proteinom Gs povzroči stimulacijo adenililat-ciklaze, ki nadalje pospeši produkcijo sekundarnega sporočevalca cAMP. cAMP, vpliva na Na⁺/K⁺ črpalko in preko aktivacije protein-kinaze A na različne tarčne proteine, med drugim tudi na kalijeve kanalčke. Podobno kot pri receptorjih H1, se tudi po aktivaciji receptorjev H2 spremeni membranski potencial.

Receptorje H3 so prvič opisali leta 1983. So na presinaptični membrani in delujejo kot avtoreceptorji, ki regulirajo sproščanje in sintezo histamina. Receptorji H3 so sklopljeni s proteinom Gi in ob aktivaciji inhibirajo adenililat-ciklazo. Posledično se zmanjša nastajanje cAMP, kar pa posledično inhibira napetostno odvisne kalcijeve kanalčke. Ker je sproščanje histamina iz veziklov odvisno od koncentracije kalcija, se le-to zmanjša. Vezava histamina na receptor H3 deluje po principu negativne povratne zanke in zmanjša njegovo sproščanje. Ker so receptorji H3 prisotni tudi na nehistaminergičnih nevronih, regulirajo tudi sproščanje in sintezo drugih nevrottransmitorjev (Brown s sod., 2000).

Receptorje H4 so odkrili šele leta 2001. Imeli naj bi podobno delovanje kot receptorji H3 in naj bi bili locirani tako v mastocitih kot v CŽS (Esch s sod., 2005). Funkcije receptorjev H4 v osrednjem živčevju še ne poznamo.

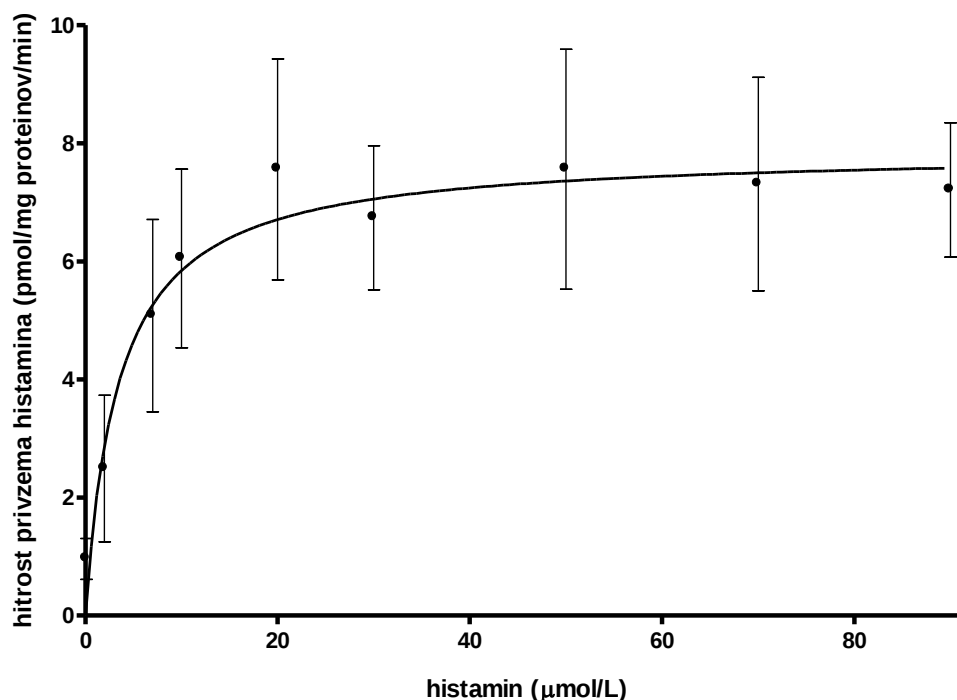
Sproščanje histamina ima cirkadiani ritem. Sprošča se preko dneva, preko noči pa sproščanje upade in s tem vpliva na ritem budnost/spanje, kar uravnavajo receptorji H1 (Rang s sod., 2007). Starejši antagonisti receptorjev H1 so povzročali zaspanost.

2.4.4 Transport histamina v astrocite

Kot nevrottransmitor se histamin sintetizira, shrani v vezikle in po sprostitvi inaktivira. Čeprav obstajajo dokazi, da se histamin iz sinaptične špranje privzema v nevrone in celice glije, specifični histaminski transporter še ni znan. Rezultati raziskav s celičnimi kulturami so pokazali, da se histamin privzema v astrocite neonatalnih in odraslih podgan v odvisnosti od koncentracije Na^+ ionov (Kržan 2006).

2.4.5 Kinetika privzema histamina

Privzem histamina je od koncentracije odvisen proces. V neonatalne astrocite se privzema s K_m 3,5 μM in V_{max} 7,9 pmol/mg proteinov/min (Osredkar s sod., 2009).



Slika 8: Odnos hitrosti specifičnega privzema (celokupni privzem pri 37°C, minus nespecifični privzem pri 0°C) v odvisnosti od koncentracije 3H-histamina. Hitrost privzema je bila za vsako vrednost specifičnega privzema izračunana po Michaelis-Mentenovi formuli (Papler in Pečavar, 2006).

2.4.6 Vloga histamina pri depresiji

Raziskave na živalskih modelih so pokazale, da farmakološko ali genetsko povzročena izguba histamina ali njegovih receptorjev povzroči nastanek fenotipov, ki so podobni depresiji pri človeku. Histaminski nevroni v TM nukleusu so občutljivi na večino nevroendokrinih signalov, ki sodelujejo pri depresiji (biogeni peptidi, steroidni hormoni, antidepresivna zdravila). Histaminske nevrone lahko vzdraži serotonin preko receptorjev 5-HT_{2C}, ki so eno od mest delovanja antidepresivnih zdravil. Mnoga antidepresivna zdravila se tudi vežejo na histaminske receptorje H₁ in H₂, kjer delujejo kot antagonisti, kar povzroči neželene stranske učinke, kot so sedacija, motene funkcije srca, znižan srčni utrip in povečanje apetita, kar vodi k pridobivanju telesne teže (Hass s sod., 2008).

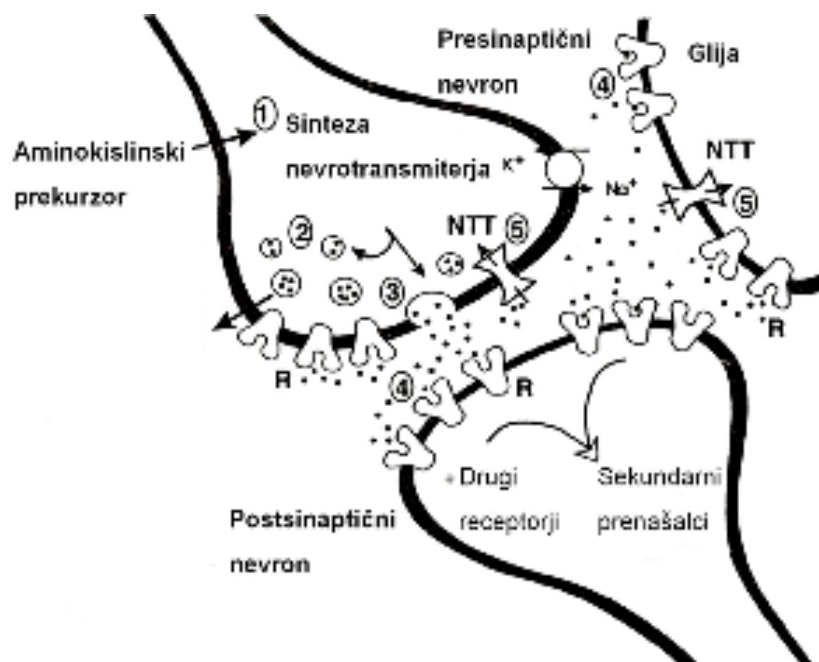
2.4.7 Vloga histamina pri epilepsiji

Pri številnih živalskih modelih so dokazali, da aktiviran histaminergični sistem preprečuje epileptično aktivnost različnih modelov epilepsije pri živalih (Dai s sod., 2007). Raziskave so dokazale, da zdravila, ki povečajo raven histamina v možganih omilijo temporalno epilepsijo. Intraperitonealni vnos antagonist histaminskih receptorjev H1 difenilhidramina pa poveča epileptične napade. Antiepileptično delovanje histamina je verjetno posredovano preko H1 receptorjev na nevronih hipokampusa (Hass s sod., 2008).

2.5 CENTRALNO DELUJOČA ZDRAVILA

Centralni živčni sistem je funkcionalno najbolj kompleksen organski sistem v človeškem telesu. Razumljivo je, da imajo tudi zdravila, ki delujejo na centralni živčni sistem oz. centralno delujoča zdravila bolj kompleksen mehanizem delovanja, zato zahtevajo posebno pozornost in preučevanje.

Osnovni mehanizem delovanja zdravil, ki delujejo na osrednje živčevje je spodbujanje ali zaviranje delovanja transitorjev na različnih mestih v sinapsi.



Slika 9: Shema delovanja zdravil v osrednjem živčevju membransko vezanih proteinov (povzeto po Papler in Pečavar, 2006).

Vendar večina centralno delujočih zdravil ne deluje selektivno. To pomeni, da se v terapevtskih koncentracijah hkrati vežejo na več različnih receptorjev ter preko le-teh posredujejo učinek. Pri antidepresivnih zdravilih pa je terapevtski učinek posledica prilagoditvenih sprememb, ki sledijo primarnemu učinku. Primarni učinek je inhibicija transportnih proteinov, kar ima za posledico povečano zunajcelično koncentracijo serotonina, lahko pa tudi noradrenalina in dopamina. Povečana koncentracija prenašalcev povzroči spremembe v izražanju receptorjev ter drugih proteinov (npr. živčnega ravnega dejavnika možganskega izvora), kar privede do izboljšanja simptomov. Slednje se pojavi šele par tednov po začetku jemanja zdravila. Nadaljevanje zdravljenja poleg biokemičnih sprememb povzroči še spremembe, ki se odražajo v obliki živčnih celic. Živčne celice v hipokampusu postanejo večje in bolj razvejane (t.i. nevroplastične spremembe). Ker prenehanje zdravljenja povzroči, da živčne celice postanejo ponovno manjše in manj razvejanje, je včasih potrebno dolgotrajno, več let trajajoče jemanje antidepresivnih zdravil.

H kompleksnosti delovanja centralno delujočih zdravil pa prispeva še otežen prehod preko krvno-možganske pregrade. Le majhne napolarne molekule lahko pasivno prehajajo skozi celične membrane, večina centralno delujočih zdravil pa prehaja preko transporterjev v krvno-možganski pregradi (Rang s sod., 2007).

2.5.1 Antidepresivna zdravila

Antidepresivna zdravila (AD) delujejo na koncentracijo nevrotansmitorjev v sinaptični špranji. Za razumevanje njihovega delovanja je najprej potrebno razložiti bolezen, ki jo zdravijo.

2.5.1.1 Depresija

Depresija je zelo pogosta duševna motnja, ki ima več vzrokov. Povezana je z motenim biokemičnim ravnovesjem v možganih, ki ga lahko povzročijo splet genetskih, okoljskih in osebnostnih dejavnikov. Prizadene več žensk kakor moških, pogosto pa se pojavi tudi pri otrocih in najstnikih. Bolezen se kaže v obliki blagih motenj razpoloženja do hudih oblik halucinacij in blodenj. Simptomi depresije se lahko odražajo kot motnje čustvovanja in

vedenja. Prve teže ovrednotimo, druge lažje, ker se izražajo tudi z bolezenskimi znaki (npr. izguba telesne teže, sprememba krvnega tlaka). Med prve prištevamo apatijo, izgubo motivacije, potrto, tesnobo, slabo samopodobo, izgubo zaupanja vase in podobno. Med druge pa biološke znake kot so izguba apetita, nespečnost, utrujenost, pomanjkanje energije, izguba libida in podobno. Ker depresija vpliva na človeka tako psihično kot fizično, je eden izmed glavnih razlogov za samomore (Rang s sod., 2007).

2.5.1.2 Hipoteze o depresijah

Monoaminska hipoteza depresijo razlaga z biokemičnega vidika in pravi, da je depresija posledica funkcionalnega pomanjkanja monoaminskih nevrottransmitorjev (noradrenalina in serotonina) na določenih mestih v možganih, medtem ko je presežek teh nevrottransmitorjev odgovoren za manijo.

Ta hipoteza ni popolna in biokemične študije na pacientih je povsem ne podpirajo, vendar pa farmakološka modulacija monoaminergičnega sinaptičnega prenosa ostaja najbolj uspešen pristop k zdravljenju depresije. Za preučevanje depresije nimamo popolnega živalskega modela kar tudi predstavlja dodaten problem pri potrjevanju hipotez (Rang s sod., 2007).

Hipoteza o naučeni (namišljeni) nemoči (ang. »hopelessness depression«) po Abramsonu, Metalskyu in Alloyu (1989) predpostavlja, da so ljudje z večjimi negativnimi življenjskimi stresi in pesimističnim pogledom na življenje, bolj izpostavljeni možnostim razvitja simptomov depresije. Pojavijo se apatije, pomanjkanje energije, psihomotorične retardacije, nespečnost itd.. Zdravila, ki farmakološko delujejo skladno z monoaminsko teorijo so učinkovita tudi pri teh pacientih, zato so te hipoteze lahko pogojeno medsebojno odvisne.

Kognitivno – vedenjska hipoteza depresije po Becku (Abela s sod., 2002) zagovarja trditve, da zgodnjo doživljanje neuspehov vodi do nezaupanja v sebe in kasneje do depresij. Po tej hipotezi negativna pričakovanja in negativne misli vodijo v razvoj že omenjenih psihološko-fizioloških simptomov depresije.

Zdravljenje z antidepresivnimi zdravili, ki takoj povečajo koncentracijo monoaminov v zunajceličnem prostoru, le delno podpira monoaminsko hipotezo depresije, ker se klinični učinki izboljšanja pojavijo šele z nekajtedenskim zamikom.

2.5.1.3 Skupine antidepresivnih zdravil

Inhibitorji privzema monoaminov:

- Triciklični antidepresivi (TCA) z značilno triciklično zgradbo molekule neselektivno zavirajo privzem serotonina in noradrenalina.
- Selektivni zaviralci privzema serotonina (SSRI).
- Selektivni zaviralci privzema noradrenalina (SNRI).

Inhibitorji monoaminoksidaze (MAOI):

Monoaminoksidaze so encimi, ki delujejo kot inaktivatorji nevrotransmitorjev v nevronih.

- MAO inhibitorji z ireverzibilno vezavo na monoaminooksidaze preprečijo njihovo delovanje in omogočijo nakopičenje nevrotransmiorja v presinaptičnem nevronu in povišanje njegove koncentracije v medsinaptični špranji.
- MAO inhibitorji z reverzibilno vezavo.

Atipični antidepresivi:

Večinoma snovi, ki blokirajo receptorje, vendar je njihovo delovanje še pomanjkljivo razumljeno (Rang s sod.,2007).

Tabela 3: Klasifikacija antidepresivov s primeri (povzeto po Lemke s sod., 2008).

Klasifikacija zdravila	Kratika	Zdravilo	Prodajno ime
Selektivni inhibitor ponovnega privzema noradrenalina	SNRI	dezipramin, amoksapin, maprotilin, roboksetin, nortiptilin	Norpramine Asendin Vestra Pamelor, Aventyl
Selektivni inhibitor	SSRI	citalopram,	Celexa

ponovnega privzema serotonina		escitalopram, fluoksetin, fluvoksamin, sertralin	Lexapro Prozac Zoloft
Inhibitor ponovnega privzema serotonina in noradrenalina	NSRI	amitriptilin, klomipramin, doksepin, imipramin, duloksetin, venlafaksin	Elavil Anafranol Sinequan Tofranil Cymbalta Effexor
Inhibitor ponovnega privzema dopamina in noradrenalina	DNRI	Bupropion	Wellbutrin, Zyban
Antagonisti serotoninjskih receptorjev 2/inhibitor ponovnega privzema serotonina	SARI	Trazodon	Desyrel
Adrenergični antagonisti α_2 /serotoninski antagonisti	NaSSA	Mirtazepin	Remeron
Inhibitorji monoamin oksidaze	MAOI	Meklobemid fenelzin nardil tranilcipramin	 Pernate
Stabilizatorji razpoloženja		Litij valproična kislina karbamazepin	Eskalith, Lithobid Depakote, Depakene Tagretol

2.5.2 Antiepileptična zdravila

2.5.2.1 Epilepsija

Epilepsija spada med najstarejše človeku poznana obolenja. Seveda pa si v davni epileptičnih napadov niso razlagali tako, kot si jih razlagamo danes. Bolnika z epileptičnim napadom so imeli za nesrečnika, ki ga je obsedel demon. Tega demona so ga skušali odrešiti tudi tako, da so mu navrtali lobanjo. To naj bi demonu omogočal, da zapusti kletko v glavi. Natančno navrtane lobanje so arheologi našli pri neolitskem človeku in tudi pri starih Egipčanih. Prav poznavanje epilepsije pa se je začelo dejansko šele z opazovanji in deli starogrškega zdravnika in misleca Hipokrata. V svojem zapisku, ki ga je imenoval »o svetem obolenju«, opisuje epilepsijo kot obolenje možganov, ki nastaja zaradi naravnih in ne morda nekih nadnaravnih razlogov. Tudi ime epilepsija izvira iz grškega epilambanein: nenadoma zagrabit (Cvetko 1997).

Epilepsija je stanje, za katerega so značilni ponavljajoči se napadi. Lahko je prirojena ali pridobljena. Ni specifična bolezen. Predstavlja jo skupina znakov in simptomov z mnogo vzroki, ki povečajo vzdraženost živčnih celic, kar ima za posledico nenadne in prehodne motnje delovanja možganov, ki se ponavljajo. Izraža se z naslednjimi znaki: izguba zavesti, mišični krči, nenadne zaznave, na videz smiselna aktivnost; npr. ponavljajoče cmokanje, žvečenje, mežikanje, ko to ni izzvano z dražljaji, kot je npr. hrana, močna svetloba. V uporabi je več klasifikacij, najbolj pogosto uporabljena pa je delitev po Mednarodni ligi proti epilepsiji, ki obsega okoli 80 različnih vrst epilepsije. V grobem napade delimo na delne (nepravilna aktivnost v delu možganov) in generalizirane napade (nepravilna aktivnost po vseh možganih).

Delne napade naprej razdelimo na enostavne delne napade, kjer zavest in odzivnost nista prizadeta in kompleksne delne napade, ki povzročijo vsaj spremembe zavedanja in odzivnosti. Delni napadi pa lahko prehajajo v generalizirane (delni napadi s sekundarno generalizacijo).

Generalni napadi se razlikujejo glede na obliko napada na:

- tonično-klonični napad: pojavijo se močni krči v mišicah, izguba zavesti, slinjenje, nevarnost zadušitve.
- napadi zmedenosti - absence so pogostejši pri otrocih, značilno je nezavedno strmenje, ki traja nekaj sekund.

Epilepsija prizadene približno 0,5% -1% populacije. Nekaterim pacientom antiepileptična zdravila omogočajo dobro kontrolo nad boleznijo, pri približno 20% pa se napadi pojavljajo kljub optimalni farmakoterapiji, kar močno vpliva na kvaliteto življenja takega posameznika (ILAE, 2006).

2.5.2.2 Mehanizmi delovanja antiepileptičnih zdravil

Pospeševanje delovanja GABA nevrottransmitorja.

GABA je glavni inhibitorski nevrottransmitor v možganih. V osnovi aktivacija receptorjev GABA_A zmanjša membranski potencial daleč pod prag akcijskega potenciala. Barbiturati in benzodiazepini so modulatorji receptorja GABA_A. Vezava teh zdravil podaljša odprtje ali poveča frekvenco odpiranj kloridnega kanala, kar ima za posledico hiperpolarizacijo živčnih celic (Nestler s sod., 2001).

Vigabatrin inhibira encim GABA-transaminazo, ki razgrajuje GABA nevrottransmitor. Tiagabin inhibira ponovni privzem GABA (Rang s sod., 2007).

Inhibicija natrijevih kanalčkov.

Karbamazepin, valporat, lamotrigin delujejo na napetostno odvisne natrijeve kanalčke, preprečijo prehajanje natrijevih ionov v notranjost živčnih celic in s tem posledično vplivajo na vzdražnost membrane. Vežejo se na kanalčke v neaktivnem stanju in tako zmanjšajo število funkcionalnih kanalčkov, ki generirajo potencial.

Inhibicija kalcijevih kanalčkov.

Etosukcimid selektivno blokira tip T kalcijevih kanalčkov, kar zmanjša prehajanje kalcijevih ionov v notranjost živčne celice. Posledično se zmanjša vzdražnost živčne celice.

Mehanizmi delovanja mnogih drugih antiepileptičnih zdravil niso popolnoma znani, vendar imajo vsa v osnovi enako funkcijo, preprečiti nekontrolirano širjenje akcijskih potencialov. V terapevtskih koncentracijah mnogi ne delujejo več selektivno, se pravi, da aktivirajo več tarč in imajo zaradi tega tudi veliko neželenih učinkov.

Tabela 4: Razdelitev in mehanizem delovanja antiepileptikov.

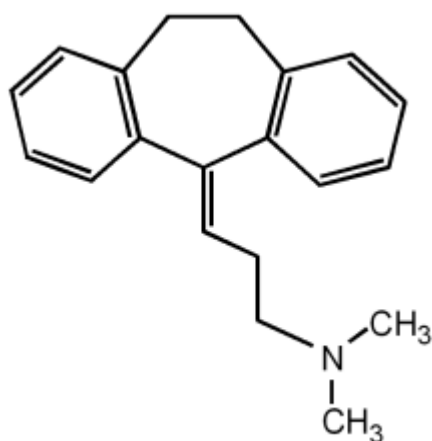
MEHANIZEM DELOVANJA.	ZDRAVILO
Aktivacija receptorjev GABA _A .	fenobarbiton, benzodiazepini
Inhibicija GABA-transaminaze.	vigabatrin
Inhibicija privzema GABA.	tiagabin
Inhibicija Ca ²⁺ kanalov.	karbamazepin, valporat, fenitoin, lamotrigin, topiramat
Inhibicija receptorjev za glutamat.	felbamat, topiramat

2.6 PREDSTAVITEV CENTRALNO DELUJOČIH ZDRAVIL UPORABLJENIH V POSKUSIH

2.6.1 Amitriptilin

Amitriptilin je antidepresiv iz skupine tricikličnih antidepresivov (Slika 10). V osrednjem živčevju zavira ponovni privzem serotonina in noradrenalina v živčne končiče ter podaljša delovanje teh živčnih prenašalcev na ciljne receptorje. Amitriptilin povzroča tudi antiholinergične učinke (je antagonist muskarinskih receptorjev) ter deluje kot antagonist na histaminske H1 in adrenergične receptorje α_1 .

V osnovi deluje tako, da se veže na transportno molekulo (prenašalec za noradrenalin in serotonin) in prepreči vezavo in (ponovni) privzem nevrottransmitorjev. Aktivni metabolit je nortriptilin, ki nastane po demetilizaciji amitriptilina. V poskusu sem uporabila le amitriptilin, ker poleg transporterjev za noradrenalin in serotonin vpliva tudi na druge receptorje, med njimi tudi na receptorje za histamin. Ta neselektivnost delovanja povzroča neželene učinke, ki so pri amitriptilinu posebej pogosti. K njim prištevamo motnje vida, suha usta, motnje pri zadrževanju vode, motnje srčnega ritma in sedacijo, ki je posledica antagonističnega delovanja na histaminske receptorje H1 (Howell, Chauhan, 2007).



Slika 10: Strukturna formula amitriptilina (povzeto po Howell, Chauhan, 2007).

2.6.2 Levetiracetam

Levetiracetam je novejša antiepileptično zdravilo, ki so ga registrirali leta 2000. Mehanizem delovanja sloni na principu uravnavanja izločanja sinaptičnih nevrottransmitorjev, preko vezave na proteine sinaptičnih veziklov SV2A. Vezava na te proteine zavira ATP inducirano in IP3 odvisno sproščanje kalcija (Gillard s sod., 2006). Njegove farmakokinetične prednosti so skoraj popolna absorpcija, minimalna nasepecifična vezava na plazma proteine, ne inducira encimov, ne prihaja do interakcij z drugimi zdravili, delno se metabolizira izven jeter. Zdravilo je registrirano pod imenom KEPPRA, izdeluje ga podjetje UCB Pharmaceuticals. Zdravilo se v kombinaciji z drugim antikonvulzivom (gabapentin) uporablja za lajšanje nevropatske bolečine ali kot samostojno zdravilo pri zdravljenju epilepsije (EMA, 2009).

2.6.2.1 Mehanizem delovanja

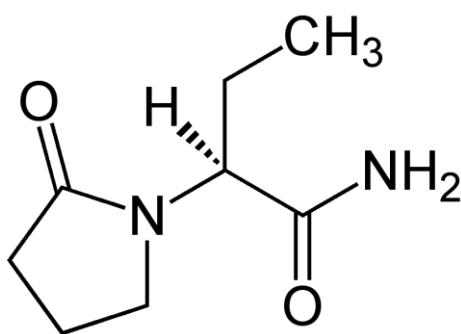
Levetiracetam se veže na proteine sinaptičnih veziklov SV2A.

Ob napadu pride do premočnih živčnih impulzov, ki povzročijo prekomerno sproščanje mediatorjev iz veziklov v sinapsah. To poruši ravnovesje v prenosu živčnih sporočil, kar pacient doživi kot epileptični napad. Levetiracetam se veže na proteine sinaptičnih veziklov, ter inhibira njihovo aktivacijo, tako regulira tok mediatorjev v medsinaptično špranjo.

Levetiracetam ima tudi druge mehanizme delovanja, ki v manjši meri morda prispevajo h delovanju proti napadom. Deluje reverzno na inhibicijo GABA – in glicinskih (napetostnih) tokov preko negativnih alosteričnih modulatorjev cink in β – karbolinov in inhibira tok kalcijevih ionov v celice (Barkley s sod., 2004).

Ker levetiracetam deluje na sproščanje nevrottransmitorjev in ne na ponovni privzem, smo poskuse priredili in poleg privzema preverjali še vpliv zdravila na sproščanje histamina.

Ob zdravljenju z zdravilom se lahko pojavijo naslednji stranski učinki: povečano izpadanje las, občutek zbadanja v ekstremitetah, glavoboli, slabost, razdražljivost, depresija, sedacija.

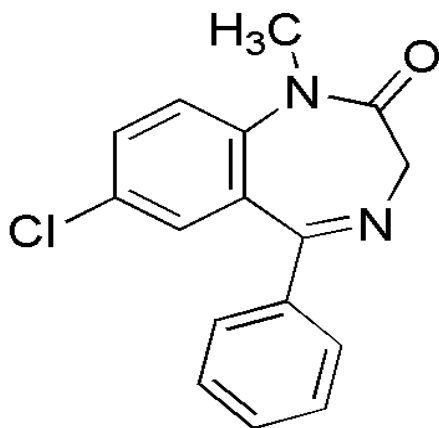


Slika 11: Strukturna formula levetiracetama (povzeto po EMEA, 2009).

2.6.3 Diazepam

Diazepam spada v skupino benzodiazepinov. Struktura je prikazana na sliki 12. Njihov glavni mehanizem delovanja je modulacija receptorjev GABA_A. Večina receptorjev GABA_A je sestavljena iz α , β , in γ podenot in v možganih je najpogostejša kombinacija podenot $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Farmakološke značilnosti GABA_A receptorjev so odvisne od kombinacij njihovih podenot. Aktivacija podenote $\alpha 1$ GABA_A receptorja povzroča sedacijo, zaspanost in delno protikonvulzivno delovanje.

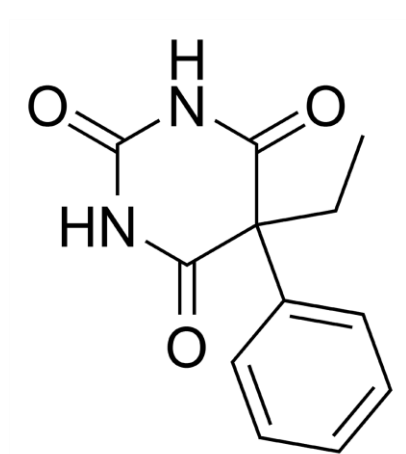
Intravenozno ali rektalno vnesen diazepam ima hiter nastop delovanja in se uporablja za zdravljenje hude oblike akutne epilepsije, t.i. stanja *status epilepticus*, ki je življenjsko nevarno. Uporablja se tudi za zdravljenje anksioznosti, obsesivno kompulzivnih motenj, sindroma nemirnih nog, tudi kot mišični relaksant ter kot sredstvo za pripravo bolnika pred splošno anestezijo.



Slika 12: Strukturna formula diazepama (povzeto po Fitos s sod., 2007).

2.6.4 Fenobarbiton

Fenobarbiton, struktura je prikazana na sliki 13, je tudi modulator receptorja GABA_A. Uporablja se pri generaliziranih tonično-kloničnih in parcialnih napadih. Neželeni učinki so sedacija, kognitivne motnje, motnje motorike, osteomalacija in alergične reakcije. Raziskave na živalskih modelih so vzbudile sum na kancerogenost fenobarbitona, verjetno zaradi povečanega nastanka toksičnih metabolitov, kar je tudi razlog, da se zdravilo manj uporablja (Biswas 2004).



Slika 13: Strukturna formula fenobarbitona (povzeto po Whysner s sod., 1996).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

Vsi mediji za gojenje celičnih kultur, razen fetalnega govejega seruma, ki ga izdeluje Cambex, Belgija, so proizvod tovarne GIBCO, Velika Britanija. Uporabili smo še naslednje snovi: ^3H -histamin (66,7 GB q/mmol) (Perkin Elmer, ZDA), ter naslednja zdravila: levetiracetam (UCB, Belgija), amitriptilin (Lek, Slovenija), fenobarbiton (Merck, ZDA), diazepam (Krka, Slovenija).

3.2 METODE

3.2.1 Živali

Kulture astrocitov smo dobili iz neonatalnih, tri dni starih podganjih mladičev obeh spolov seva Wistar (WHI 24-103). Vsi postopki na živalih so bili opravljeni v skladu z dovoljenjem Veterinarske uprave Republike Slovenije za izvajanje poskusov na živalih št. 323-02-232/2005/02 ter s smernicami za delo s poskusnimi živalmi, ki ga je izdal Komite za zaščito živali Nacionalnih Inštitutov zdravja, Bethesda, ZDA.

3.2.2 Priprava primarnih celičnih kultur

Za pripravo primarnih celičnih kultur je podgane najprej potrebno dekapitirati. To je opravil tehnik, ki ima dovoljenje za izvajanje evtanazije poskusnih živali. Odstranjene možgane je shranil v raztopini Leibowitz L-15. Možganom smo odstranili možganske ovojnice in možgansko skorjo. Preostalo možgansko tkivo smo razdrobili v raztopini Leibowitz L-15, s pomočjo pipet in igel različnih svetlin. Po centrifugiranju suspenzije, smo usedlino prenesli v gojilne posode z medijem za gojenje astrocitov. Sestava medija je naslednja: DMEM (po Dulbeccu modificiran Eaglov medij) z visoko koncentracijo glukoze, in dodatkom 10% govejega fetalnega seruma, 1mM piruvata, 2 mM glutamina in 25 μM gentamicina. Celice smo vzgajali v inkubatorju pri 37°C, v mešanici 95% zraka in 5% CO_2 .

Konfluentne kulture smo stresali preko noči pri 225 obratih/minuto. Naslednjo jutro smo zamenjali medij. Ta postopek smo trikrat ponovili in tako odstranili celice mikroglija, ki se na gojitvene posodice ne pritrdijo tako učinkovito kot astrociti. Pritrjene astrocite smo od podlage ločili s tripsinom. Celice smo nato prenesli v nove posode in jih 24 ur kultivirali v prisotnosti 10 μM antimetabolita citozin arabinozida, ki je uničil prisotne fibroblaste. Za poskus smo uporabili astrocite po treh tednih gojenja v drugi pasaži v gojitvenih posodah z 12 petrijevkami.

3.2.3 Sproščanje histamina

Medij DMEM smo odlili in celice dvakrat sprali s pufrom za privzem histamina, ki je vseboval 25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM MgSO_4 , 1,7 mM CaCl_2 , 5,6 mM glukoze in je imel pH 7,4. Celice z dodanim pufrom za privzem (500 μL) smo inkubirali 30 min pri 37 °C. Po inkubaciji smo dodali 100 μL 0,75 μM ^3H -histamina in inkubirali nadaljnjih 20min. V slepi vzorec smo odpipetirali le pufer, v kontrolni vzorec pa pufer in 100 μL 0,75 μM ^3H -histamina. Po zaključeni inkubaciji smo vzorce 4-krat sprali s hladnim pufrom brez Ca^{2+} in ponovno dodali 540 μL pufra brez Ca^{2+} za sproščanje histamina, ogretega na 37 °C in 60 μL 10^{-4} izbranega zdravila. Reakcijo smo pri zasledovanju časovnega poteka sproščanja histamina ustavili v časovnem območju od 1 minute do 45 minut (časovni potek) oz. po 15 minutah (drugi poskusi sproščanja) tako, da smo plošče postavili na led in odstranili inkubacijsko tekočino. Celicam smo dodali 600 μL 0,5 M NaOH. Po stresanju smo 500 μL tekočine uporabili za štetje radioaktivnosti, 100 μL pa za določevanje koncentracije proteinov s pomočjo Brafordove metode (BioRad, ZDA).

Poskuse koncentracijske odvisnosti sproščanja histamina smo inkubirali enak čas 15 minut, uporabili pa različne koncentracije izbranih zdravil.

3.2.4 Privzem histamina

Odstranili smo DMEM in celice dvakrat sprali s pufrom za privzem, ki je vseboval 25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 4,8 mM MgSO_4 , 1,7 mM CaCl_2 , 5,6 mM glukoze in je imel pH 7,4. V vsako petrijavko s konfluentnimi kulturami astrocitov smo dodali eno od koncentracij

izbranega zdravila. Z vsako koncentracijo smo opravili poskus v treh paralelkah. Vzorce smo izpostavili 20 minut na 37 °C, nato dodali 125 nM/L ^3H - histamina in inkubirali še 20 minut. V slepi vzorec smo odpipetirali pufer, v kontrolni vzorec pa pufer in 125 nM ^3H -histamin. Po dvajsetih minutah smo reakcijo ustavili s postavitvijo posodic na led in odstranitvijo inkubacijske tekočine. Posodice smo nato sprali s pufrom brez Ca^{2+} in celice denaturirali z 0,6 mL 0,5 M NaOH. V nadaljevanju smo uporabili 500 μL vsakega vzorca za merjenje radioaktivnosti, preostalih 100 μL vzorca smo porabili za določitev koncentracije proteinov s pomočjo Bradfordove metode (BioRad, ZDA).

3.2.5 Določanje koncentracije proteinov

Uporabili smo Bradfordovo metodo za določanje proteinov (BioRad, ZDA). Za standardno krivuljo smo pripravili naslednje koncentracije albumina: 2,5 μg , 5 μg , 8 μg , 10 μg , 20 μg , 30 μg . Pripravili smo še epruvete, ki vsebujejo po 20 in 40 μL vzorca. V vsako epruveto smo dodali 200 μL 0,5 M NaOH in premešali. Čez 10 minut smo dodali vodo do skupnega volumna 0,6 mL, 200 μL 0,5 M HCl in 200 μL reagenta (BioRad; fosforna kislina) ter ponovno premešali. Pripravljene raztopine smo pustili stati 30 minut in nato spektrofotometrično izmerili absorbcijo pri valovni dolžini 595 nm.

3.2.6 Analiza podatkov

Vse poskuse smo izdelali v treh paralelkah in jih večkrat ponovili. Vse vrednosti so označene kot aritmetična sredina $\pm$ standardna napaka aritmetične sredine (SEM). Kinetične parametre smo izračunali s pomočjo računalniškega programa Prism4, verzija 4,00 (GraphPad Software Inc., San Diego, ZDA). Statistično značilnost smo izračunali s Studentovim t-testom. Statistično razliko predstavlja vrednost $p \leq 0,05$.

4 REZULTATI

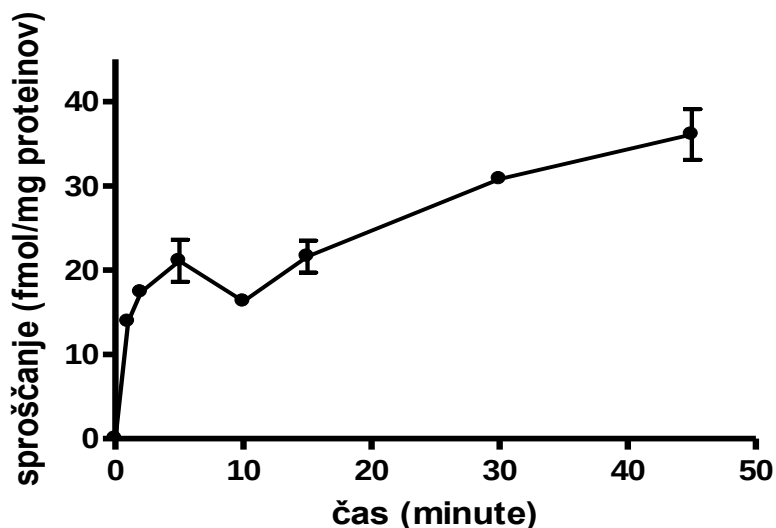
4.1 KINETIKA SPROŠČANJA HISTAMINA IZ ASTROCITOV

Primarne kulture astrocitov smo izpostavili ^3H -histaminu in počakali, da so ga celice privzele. Potem smo opazovali sproščanje histamina v medij. Ugotovili smo, da se je histamin v majhnih koncentracijah začel sproščati iz astrocitov. Sproščanje histamina iz celic je potekalo dvofazno: naraščalo je v prvih petih minutah, sledil je statistično neznačilen padec in ponovno naraščanje sproščanja (Slika 14). Po 5 minutah se je sprostilo 21 ± 2 fmol ^3H -histamina/mg proteinov, po 45 minutah pa smo v mediju izmerili 36 ± 3 fmol ^3H histamina/mg proteinov.

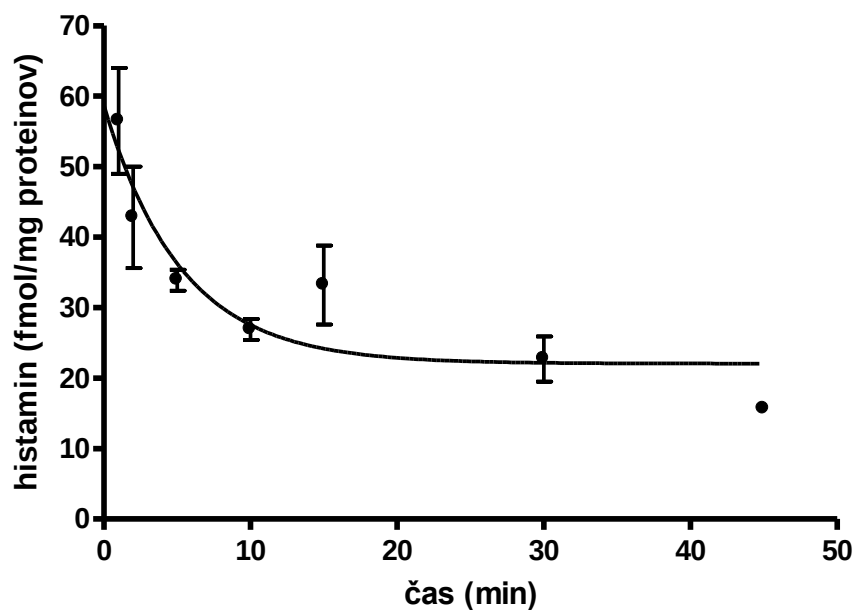
Hkrati smo merili koncentracijo histamina v celicah, ki je eksponentno upadala od začetne vrednosti 60 fmol/mg proteinov na $15 \pm 0,2$ fmol/mg proteinov po 45 minutah (Slika 15).

Razpolovni čas sproščanja ^3H -histamina iz celic je bil 3,6 minute.

V nadaljnjih poskusih smo za preučevanje sproščanja histamina uporabili 20 minutno predinkubacijo s ^3H -histaminom.



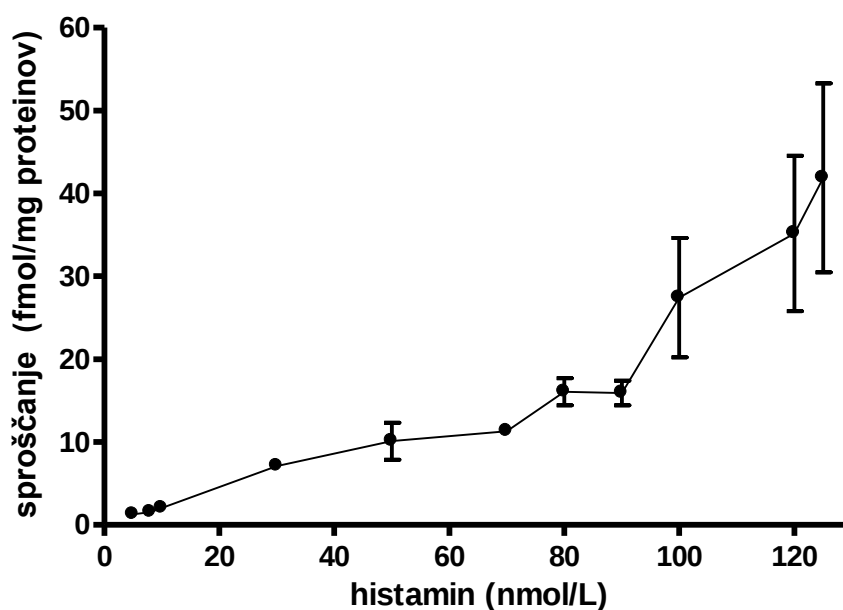
Slika 14: Časovni potek sproščanja ^3H -histamina iz kulture astrocitov. Kulture smo inkubirali z 125 nmol/L ^3H -histamina, dodali pufer brez kalcija za sproščanje in po določenih časovnih intervalih reakcijo prekinili. Rezultati so predstavljeni kot absolutna vrednost sproščenega histamina v pufru. Prehodni padec ni statistično značilen ($p > 0,05$).



Slika 15: Koncentracija ^3H -histamina v celicah astrocitov neonatalnih podgan po reakciji sproščanja histamina iz celic astrocitov. Rezultati so predstavljeni kot absolutna vrednost histamina v celicah.

4.2 KONCENTRACIJSKA ODVISNOST SPROŠČANJA HISTAMINA IZ ASTROCITOV

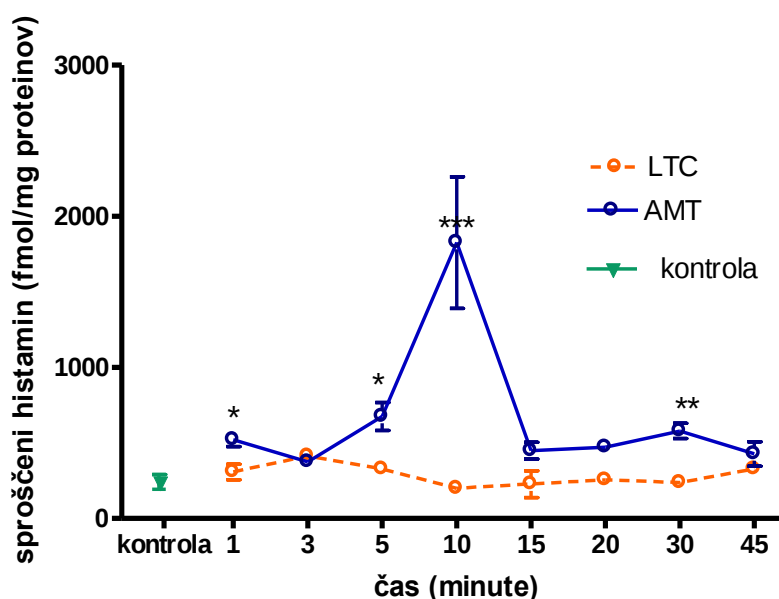
Astrocite v kulturi smo predinkubirali 20 minut z naraščajočimi koncentracijami ^3H -histamina v koncentracijskem območju od 5 do 125 nmol/L pri 37 °C. Sproščanje histamina je bilo odvisno od koncentracije histamina, s katero smo predhodno »nasitili« astrocite. Če so bili astrociti izpostavljeni večjim koncentracijam histamina, so ga več tudi sprostili. Kljub platoju, ki se je pojavil v koncentracijskem območju med 50-70 nmol/L in ponovnem dvigu sproščanja pri višjih koncentracijah uporabljenega histamina, računsko nismo mogli dokazati dvofaznega sproščanja (Slika 16).



Slika 16: Vpliv koncentracije ^3H -histamina v predinkubaciji na sproščanje ^3H -histamina iz celic astrocitov. Kulture astrocitov smo 20 minut predinkubirali v različnih koncentracijah ^3H -histamina, nato dodali pufer za sproščanje brez Ca^{2+} in reakcijo prekinili po 15 minutah. Rezultati so predstavljeni kot absolutna vrednost histamina v pufru. Prilagajanje eksperimentalnih podatkov enačbama za enofazno in dvofazno sproščanje je pokazalo, da se se histamin sprošča enofazno.

4.3 ČASOVNA ODVISNOST VPLIVA ANTIEPILEPTIČNEGA IN ANTIDEPRESIVNEGA ZDRAVILA NA SPROŠČANJE ^3H -HISTAMINA IZ ASTROCITOV NEONATALNIH PODGAN

Primerjali smo vpliv antidepresivnega zdravila amitriptilina in antiepileptičnega zdravila levetiracetama na sproščanje histamina iz astrocitov neonatalnih podgan. Amitriptilin statistično značilno poveča sproščanje histamina iz astrocitov po 1, 5, 10 in 30 minutah. Najbolj izražen je vpliv po 10 minutah izpostavitve, medtem ko protiepileptično zdravilo levetiracetam pri izbrani koncentraciji ne vpliva na sproščanje histamina iz astrocitov.

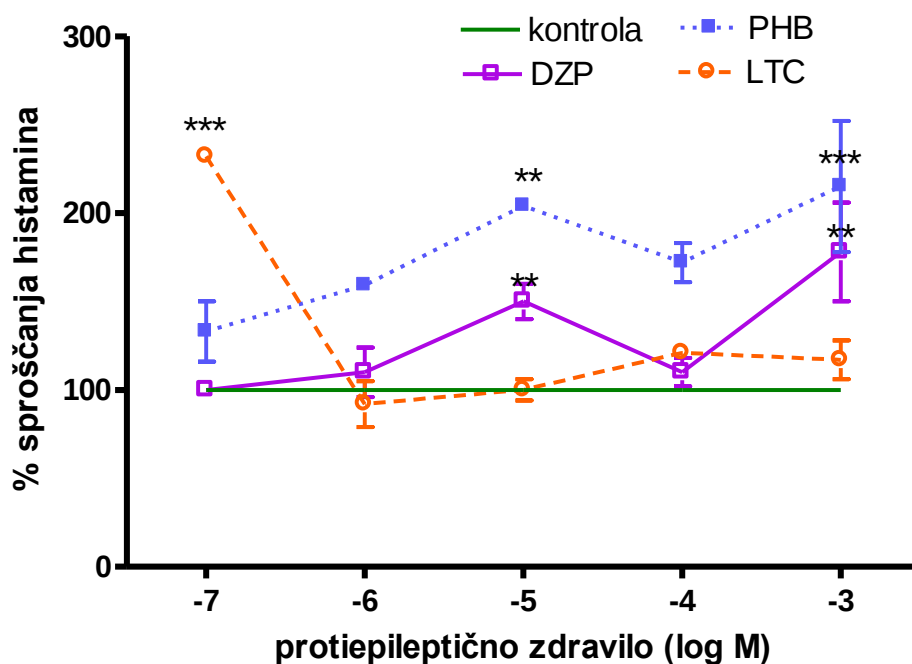


Slika 17: Vpliv centralno delujočih zdravil na sproščanje ^3H -histamina iz astrocitov neonatalnih podgan. Vzorce smo predinkubirali s $0,75 \mu\text{M}$ ^3H -histaminom. Po 20 minutni inkubaciji smo zamenjali pufer za privzem s puferom za sproščanje in dodali $10 \mu\text{M}$ amitriptilina (AMT) ali levetiracetama (LTC). Reakcijo smo prekinili v različnih časovnih intervalih. Rezultati so predstavljeni kot absolutna vrednost sproščenega ^3H -histamina v pufru. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,001$.

4.4 VPLIV ANTIEPILEPTIČNIH ZDRAVIL NA SPROŠČANJE ^3H -HISTAMINA IZ ASTROCITOV NEONATALNIH PODGAN

Primerjali smo vpliv fenobarbitona (PHB), diazepama (DZP) in levetiracetama (LTC) na sproščanje histamina iz astrocitov neonatalnih podgan po 15 minutni inkubaciji.

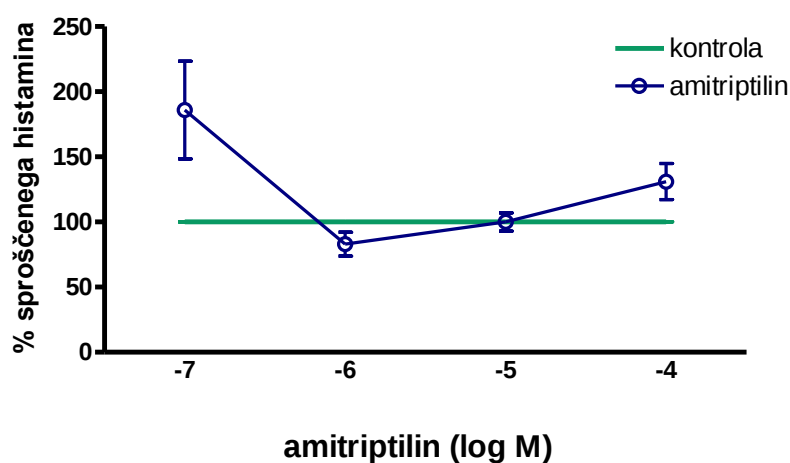
Levetiracetam ima v manjših koncentracijah (100 nmol/L) statistično značilen vpliv na sproščanje ^3H -histamina iz astrocitov v primarni kulturi. Fenobarbiton in diazepam imata največji vpliv na sproščanje ^3H -histamina iz astrocitov v primarni kulturi pri najvišji koncentraciji (1 mM), pri nižjih koncentracijah pa ne vplivata na sproščanje histamina iz astrocitov.



Slika 18: Vpliv antiepileptičnih zdravil na sproščanje histamina iz astrocitov neonatalnih podgan. Vzorce smo predinkubirali s $0,75 \mu\text{M}$ ^3H -histaminom. Po 20 minutni inkubaciji smo zamenjali pufer za privzem s pufrom za sproščanje in dodali različne koncentracije izbranih antiepileptičnih zdravil. Po 15 minutni inkubaciji smo reakcijo prekinili. Rezultati so predstavljeni v % sproščenega ^3H -histamina v pufru. Zvezdice označujejo statistično značilnost * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,001$.

4.5 VPLIV AMITRIPTILINA NA SPROŠČANJE ^3H -HISTAMINA IZ ASTROCITOV NEONATALNIH PODGAN

Uporabili smo antidepresivno zdravilo amitriptilin, ki deluje kot neselektivni zaviralec privzema serotonina in noradrenalina. Amitriptilin ima največji vpliv na sproščanje ^3H -histamina pri najmanjši uporabljeni koncentraciji (100 nmol/L), kjer se je sproščanje povečalo za 80%.

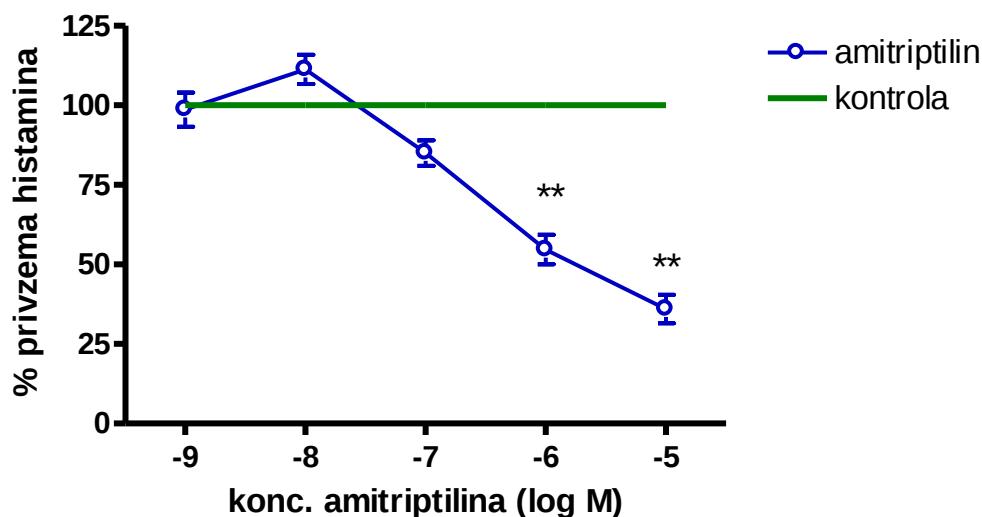


Slika 19: Vpliv neselektivnega zaviralca privzema na sproščanje ^3H -histamina iz astrocitov neonatalnih podgan. Po 20 minutni inkubaciji smo zamenjali pufer za privzem s puferom za sproščanje in dodali različne koncentracije antidepresivnega zdravila amitriptilin. Po 15 minutni inkubaciji smo reakcijo prekinili. Rezultati so predstavljeni v % sproščenega ^3H -histamina v pufru.

4.6 VPLIV NESELEKTIVNIH ZAVIRALCEV PRIVZEMA NA PRIVZEM HISTAMINA

Histamin se v astrocite privzema preko dveh mehanizmov: z aktivnim transportom ($K_m = 3,5 \mu\text{M}$ in $V_{\text{max}} = 7,9 \text{ pmol/mg proteinov}$ v času ene minute) in s pasivno elektrodifuzijo, oz. tako imenovanim privzemom, ki mogoče vključuje enega od organskih kationskih transportejev. Na njegov privzem lahko vplivajo različna zdravila.

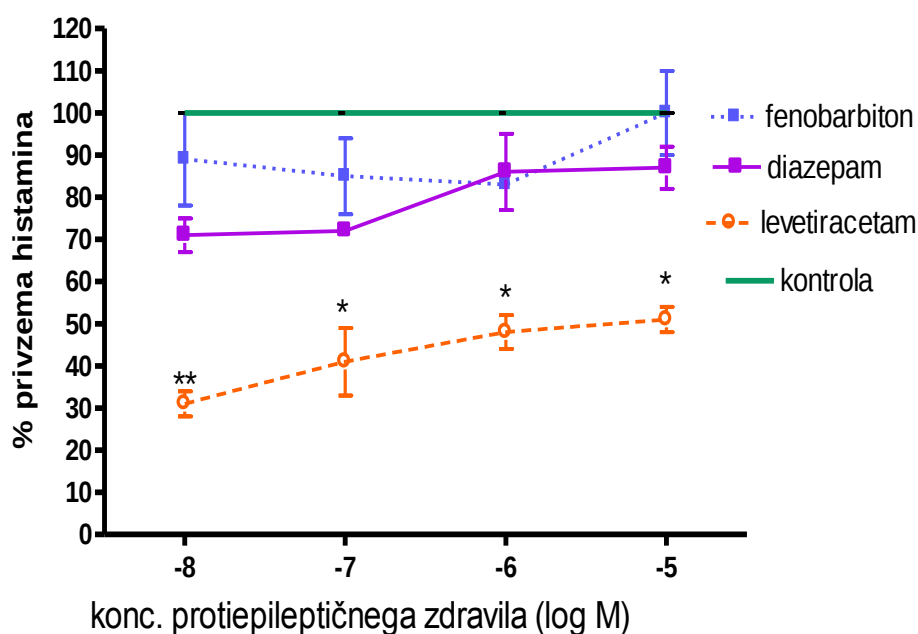
Amitriptilin, ki neselektivno inhibira prevzem noradrenalina in serotonina vpliva tudi na prevzem histamina v astrocite vzgojene iz neonatalnih podgan v koncentracijskem območju $1\text{-}10 \mu\text{mol/L}$.



Slika 20: Vpliv neselektivnega inhibitorja privzema na privzem ^3H -histamina v astrocite neonatalnih podgan. Rezultati so predstavljeni kot % privzema samega ^3H - histamina v pufru. Zvezdice označujejo statistično značilnost $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0.001$.

4.7 VPLIV PROTIEPILEPTIČNIH ZDRAVIL NA PRIVZEM HISTAMINA

Uporabili smo levetiracetam, fenobarbiton in diazepam v koncentracijah od 0,1nM do 10μM in preverjali vpliv na privzem histamina po 15 minutni predinkubaciji. Levetiracetam statistično značilno vpliva na inhibicijo privzema ^3H -histamina pri vseh uporabljenih koncentracijah, medtem ko imata fenobarbiton in diazepam manjši, statistično neznačilen vpliv na inhibicijo privzema histamina v astrocite. Levetiracetam je najbolj inhibiral privzem histamina pri najnižji koncentraciji in sicer je bila inhibicija do 70%. Pri najvišji koncentraciji levetiracetam inhibira privzem histamina do 50%. Fenobarbiton inhibira za največ 20%, diazepam pa 30%.



Slika 21: Vpliv antiepileptičnih zdravil na privzem ^3H -histamine v astrocite neonatalnih podgan. Astrocite smo predinkubirali z različnimi koncentracijami izbranih antiepileptičnih zdravil, preden smo dodali 125 nmol/L ^3H -histamina. Po 20. minutah smo reakcijo prekinili. Zvezdice označujejo statistično značilnost $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,001$.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Sinaptični prenos v osrednjem živčevju je zelo reguliran proces. Med vzbujenjem se v sinaptični prostor v kratkem času sprostijo relativno velike količine nevrottransmitorjev, tako da koncentracija nevrottransmitorja lahko doseže celo molarne vrednosti (npr. glutamat) (Danbolt 2001). Če bi prišlo do časovno podaljšanega povečanja koncentracij nevrottransmitorjev v sinaptičnem prostoru, bi bila ekscitacijska poškodba živčnih celic in njihova posledična smrt neizogibna. Da se to prepreči, se morajo nevrottransmitorji po sprostitvi v zelo kratkem času odstraniti iz sinaptičnega prostora z difuzijo, encimsko razgradnjo ali s ponovnim privzemom v presinaptični nevron ali privzemom v celice glije. Privzem in ponovni privzem posredujejo posebne molekule – transporterji. Poznani so že posebni transporterji za noradrenalin in za serotonin, medtem ko posebna molekula, ki privzema predvsem histamin še ni poznana. Privzem preko transporterja je aktivni proces, odvisen od ATP-ja in gradienta natrijevih ionov. »Promet« po transporterju navadno poteka dvosemerno, prevladuje prehajanje iz zunajceličnega prostora v znotrajceličnega, obstaja pa tudi promet nevrottransmitorja v obratni smeri – iz znotrajceličnega prostora v zunajceličnega. Slednje, dvosmerni transport histamina v astrocitih sem dokazala v svojem diplomskem delu. Astrociti ne le privzemajo histamin, temveč ga po privzemu tudi sproščajo. Kinetiko sproščanja smo izmerili in kljub značilni sliki (Slika 14) računsko nismo mogli potrditi dvofaznega sproščanja histamina v medij. Verjetno bi bilo potrebnih več poskusov, da bi z večjo verjetnostjo lahko potrdili ali ovrgli dvofazno sproščanje.

Dvosmerni transport histamina je prisoten tudi v endotelnih celicah osrednjega živčevja, kjer je bolj izrazit na laminarni membrani endotelnih celic in skrbi za izplavljanje histamina iz osrednjega živčevja v kri (Huszt i sod., 1995). Prisotnost dvosmernega transporta za histamin v astrocitih pa lahko regulira zunajcelično koncentracijo histamina v možganih. Histamin se privzame, kadar je v prebitku ter se izplavlja, kadar so za optimalno delovanje potrebne večje koncentracije histamina v zunajcelični tekočini. Dokaz, da je privzem histamina v astrocitih dvosmeren je dodatna potrditev vloge, ga astrociti regulirajo zunajcelične koncentracije različnih nevrottransmitorjev in ustvarjajo optimalno okolje za delovanje živčnih celic.

Zdravila, ki delujejo v osrednjem živčevju navadno vplivajo na enega ali več korakov sinaptičnega prenosa. V manjših koncentracijah delujejo selektivno (npr. le na eno tarčno mesto), v večjih koncentracijah pa se selektivnost »izgubi«, se pravi, da učinkujejo preko več tarčnih mest.

Fenobarbiton v nizkih koncentracijah deluje kot alosterični modulator na receptorju GABA_A, v višjih koncentracijah pa deluje še kot zaviralec natrijevih in kalcijevih kanalov, vpliva pa tudi na prenos glutamata. Za preprečevanje epileptičnih napadov moramo doseči višje koncentracije fenobarbitona v osrednjem živčevju.

Fenobarbiton je protiepileptično zdravilo, ki se najbolj pogosto predpisuje pri otrocih do 3 leta starosti. Zanimivo je, da pri otrocih z epilepsijo enake koncentracije fenobarbitona povzročijo manjšo sedacijo in zaspanost kot pri odrasli populaciji. V naši raziskavi smo dokazali, da fenobarbiton ne vpliva na privzem histamina v astrocite, v koncentracijah (10 μmol/L) pa poveča sproščanje histamina iz astrocitov. Povečana koncentracija histamina v osrednjem živčevju lahko vpliva na večjo budnost in zmanjša epileptično aktivnost, kar je lahko eden od vzrokov za manjšo sedacijo, ki jo fenobarbiton povzroča pri otroški populaciji.

Torej ima fenobarbiton v koncentracijah večjih od 10 μmol/L dodatno protiepileptično delovanje, hkrati pa poveča budnost. Terapevtska koncentracija fenobarbitona v krvi je 40 μmol/L. Že v tej koncentraciji ima fenobarbiton dodatno protiepileptično delovanje.

V bodoče bi bilo zanimivo, če bi iste poskuse opravili na astrocitih vzgojenih iz odraslih podgan. Če bi fenobarbiton na astrocitih vzgojenih iz odraslih podgan povečal privzemanje histamina v astrocite, bi dokazali, da je koncentracija histamina v zunajcelični tekočini lahko odgovorna za s fenobarbitonom izzvano povečano sedacijo pri odraslih bolnikih z epilepsijo.

Diazepam v nižjih koncentracijah deluje tudi kot alosterični modulator receptorja GABA_A, v večjih koncentracijah pa tudi zavira natrijeve kanalčke. Enako kot fenobarbiton poveča sproščanje histamina iz astrocitov; na privzem histamina v astrocite pa nima statistično značilnega vpliva. Torej, tudi diazepam v koncentracijah, ki so večje kot 10 μmol/L, kaže dodatno protiepileptično delovanje, ki je posledica delovanja na histaminergični živčni

prenos. Ta koncentracija pa je večja od normalne terapevtske koncentracije diazepama v krvi, ki se uporablja za preprečevanje epileptičnih napadov in znaša 3 $\mu\text{mol/L}$. Večje plazemske koncentracije diazepama pa so potrebne za zdravljenje epileptičnega statusa, epileptičnega napada, ki traja dlje kot 5 minut in takrat lahko tudi učinek diazepama na histaminergični živčni sistem prispeva k prekinitvi napada. Diazepam se uporablja za prekinitev epileptičnega statusa tako pri otrocih kot pri odraslih. V razpoložljivi literaturi ni podatkov o različnem protiepileptičnem učinkovanju diazepama v različnih življenjskih obdobjih. Če bi opazovali vpliv diazepama na privzem/sproščanje histamina v astrocitih vzgojenih iz odraslih podgan, bi verjetno vplival le na sproščanje, ne pa tudi na privzem. Ker pa ima protiepileptično delovanje tudi metabolit diazepama nordazepam, bi bilo zanimivo preučiti, če tudi ta snov vpliva na privzem ali sproščanje histamina v oz. iz astrocitov v različnih življenjskih obdobjih.

Levetiracetam je po farmakokinetičnih lastnostih skoraj idealno protiepileptično zdravilo s še ne povsem pojasnjenim mehanizmom delovanja. Mehanizma delovanja sta vsaj dva. Najstarejši dokazan mehanizem delovanja je inhibicija kalcijevih kanalov. Zadnje znanstvene ugotovitve so pokazale, da se levetiracetam veže na protein iz sinaptičnih veziklov (SV2A) oz. krajše protein SV2A. Protein SV2A je del aparata, ki sodeluje pri eksocitozi, neposredno pred fuzijo sinaptičnega mešička s celično membrano. Vezava levetiracetama na protein SV2A zmanjša eksocitozo in zmanjša količino nevrottransmiterjev v zunajceličnem prostoru. Protein SV2 pa se ne nahaja le v živčnih in endokrinih celicah (Lambeng s sod., 2004), marveč tudi v astrocitih. Zaradi obeh mehanizmov delovanja, spremenjena vloga proteina SV2 v astrocitih ter manjše znotrajcelične koncentracije kalcija, opazimo posledice delovanja levetiracetama na »promet« histamina preko celične membrane astrocita. Manjše koncentracije levetiracetama (100 nM) povečajo sproščanje histamina, večje ne vplivajo na sproščanje. 100 nM koncentracija je subterapevtska. Pri tej koncentraciji še niso zasedena vsa tarčna mesta. Koncentracije, kjer sproščanja histamina v našem modelnem sistemu nismo opazili, pa se nahajajo v terapevtskem območju levetiracetama.

V poskusih, kjer smo pa opazovali vpliv levetiracetama na privzem histamina v celice, pa smo opazili, da levetiracetam statistično značilno zmanjša privzem histamina in na ta način povečuje njegovo zunajcelično koncentracijo. Eden od vzrokov za to interakcijo je morebiti prehajanje nevrottransmitorja histamina in zdravila preko istega prenašalca/prenašalcev v notranjost astrocita.

Enak učinek opazimo pri antidepresivnem zdravilu amitriptilinu. Amitriptilin je neselektivni antidepresiv s tremi obroči v strukturi svoje molekule. Za skupino NSRI so značilni različni stranski učinki zaradi antagonističnega delovanja na muskarinske, α_1 -adrenergične in histaminske H_1 receptorje. Strukturno je amitriptilin zelo podoben imipraminu iz iste skupine antidepresivov, ki pa že pri nizkih koncentracijah zavre privzem histamina v sinaptosome (Sakurai s sod., 2006). Zaradi tega smo pričakovali, da bo amitriptilin tudi vplival na privzem histamina v astrocite. Amitriptilin je statistično značilno vplival na privzem histamina v astrocite neonatalnih podgan pri koncentracijah enakih in večjih kot $1 \mu\text{mol/L}$. Koncentracija je enaka najvišji terapevtske koncentraciji amitriptilina. V terapevtskih koncentracijah pa je amitriptilin tudi pomembno vplival na sproščanje histamina iz astrocitov.

Glede vpliva koncentracije zdravila na biološki odgovor smo pričakovali sigmoidno krivuljo, pri kateri odgovor z višanjem koncentracije narašča do zasičenja receptorjev, ki so v našem primeru transportni proteini. Pri poskusu vpliva zdravila amitriptilin na sproščanje smo dobili t.i. krivuljo U (Slika 19).

Tak odgovor je značilen za zdravila, ki ob večjih koncentracijah začnejo delovati na druge tarče, ki imajo nasprotni učinek od prvotne tarče. Možno je tudi, da visoke koncentracije takih zdravil povzročijo zmanjšanje občutljivosti tarčnih receptorjev (Nestler 2001).

5.2 SKLEP

V svojem diplomskem delu sem preverjala vpliv centralno delujočih zdravil (antidepresiva amitriptilina in nekaterih antiepileptikov, ki se uporabljajo tudi za zdravljenje epileptičnega statusa) na privzem histamina v podganje astrocite, gojene v primarni kulturi.

Dve delovni hipotezi sem potrdila v celoti, eno pa delno.

1. Privzem ^3H -histamina v astrocite zavirajo zdravila, ki učinkujejo znotrajcelično.

Levetiracetam je antiepileptično zdravilo, ki deluje znotrajcelično tako, da se veže na proteine sinaptičnih veziklov. To zdravilo je imelo statistično pomemben vpliv na zaviranje privzema ^3H -histamina. Prav tako je, tudi amitriptilin, statistično pomembno vplival na privzem, vendar to zdravilo ne deluje znotrajcelično, pač pa se veže na transportno molekulo za neurotransmitor na zunanji membrani.

2. Privzem ^3H -histamina zavirajo nekateri antidepresivi.

Zdravilo amitriptilin je antidepresivno zdravilo, ki statistično značilno zavira privzem ^3H -histamina v astrocite.

3. Nekatera zdravila lahko spremenijo smer transporta ^3H -histamina preko transportnih proteinov.

Vsa antiepileptična zdravila, ki sem jih preučevala in amitriptilin uporabljeni so spremenili smer transporta ^3H -histamina v astrocite in so statistično značilno povečala izplavljanje predhodno privzetega histamina.

6 POVZETEK

Astrociti so v možganih odgovorni za vzdrževanje homeostaze. Na svoji membrani izražajo številne transporterje, s katerimi sodelujejo pri privzemu nevrotransmitorjev, tudi nevrotransmitorja histamin. Specifičnega transporta zanj do še ne poznamo, se pa privzema tudi v astrocite. V okviru diplomske naloge sem proučevala lastnosti privzema ^3H -histamina v astrocite s pomočjo farmakoloških metod (inhibicija privzemam ^3H -histamina z antidepresivnimi (AD) in antiepileptičnimi (AE) zdravili, skupin neselektivno delujoči antidepresivi NSRI [amitriptilin], antiepileptiki skupine aktivatorji GABA_A receptorja [fenobarbiton, diazepam] in antiepileptiki z nespecifičnim delovanjem [levetiracetam]). Astrocite smo predinkubirali z različnimi koncentracijami izbranih zdravil, preden smo dodali 125 nmol/L ^3H -histamina in pufer za privzem. Po 20 minutah smo reakcijo prekinili. Podoben poskus z razliko uporabe pufru za sproščanje smo izvedli pri preverjanju vpliva izbranih zdravil na spremembo smeri transporta ^3H -histamina iz astrocitov.

Ugotovil smo, da antiepileptična zdravila vplivajo na spremembo transporta ^3H -histamina in povečajo njegovo sproščanje iz astrocitov. S tem je potrjeno dodatno protiepileptično delovanje, kar ponuja možnosti za nove raziskave. Na privzem ^3H -histamina sta delovali tako antidepresivno zdravilo amitriptilin kakor tudi antiepileptično zdravilo levetiracetam, kar nakazuje na neselektivne mehanizme delovanja.

Zaključimo lahko, da je privzem histamina v astrocite vzgojene iz neonatalnih podgan kompleksen proces. Privzem histamina je energetske-odvisen aktiven proces, ki poteka dvosmerno. Privzem histamina statistično značilno inhibirata antidepresivno zdravilo amitriptilin in protiepileptično zdravilo levetiracetam in povečata njegovo izplavljanje iz astrocitov. Diazepam in fenobarbital pa statistično značilno povečata le izplavljanje histamina iz astrocitov, medtem ko je inhibicija privzema statistično neznačilna.

7 VIRI

Abramson L., Metalsky G., Alloy L. 1989. Hopelessness depression: A theory – based subtype depression. American Psychological Association 96: 358-372

Abela J., D'Allesandro, D. (2002). Beck's cognitive theory of depression: The diathesis-stress and causal mediation components. British Journal of Clinical Psychology, 41: 111-128.

Alberts B., Johnson A., et al. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th edition, New York, Garland Science: 834-1228

Berkley A., Lambeng N., Nocka K., Kensel-Hemmes P. 2004. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. PNAS, 101:9861-9866

Blandina P, Efofudebe M, Cenni G, Mannaioni P, Passani MB. 2004. Acetylcholine, Histamine and Cognition: Two Sides of the Same Coin. Learning & Memory, 11: 1-8

Brown RE., Stevens DR., Haas HL. 2000. The Physiology of Brain Histamine. Progress in Neurobiology, 63: 637-672

Campbell N.A., Reece J.B. 2008. Biology, 8th Edition, Pearson, San Francisco: 1047-1069.

Chen Z., Li W., Zhu L., Shen Y., Wei E. 2002. Effects of histidine, a precursor of histamine, on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. Acta Pharmacol Sin 23:361-366

Custer L.K., Austin N.S., Sullivan J. M. 2006. Synaptic Vesicle Protein. The journal of Neuroscience. 26: 1303-1313

Cvetko B. 1997. Knjiga o epilepsiji. Rašica, samozaložba: 9-41

Dai H, Kaneko K, Kato H, Fujii S, Jing Y, Xu A, Sakurai E, Kato M, Okamura N, Kurmasu A, Yanai K. 2007. Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H1 and H2 receptors. *Neurosci Res* 57: 306–313

de Esch IJP., Thurmond RL., Jongejan A., Leurs R. 2005. The Histamine H4 Receptor as a new Therapeutic Target for Inflammation, *Trends in Pharmacological Sciences*, 269: 461-469

EMA. Keppra levetiracetam. 2009. London, European Medicines Agency.
<http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/keppra/H-277-sl1.pdf> (april 2010)

Fitos I., Visy J., Zsila F., Mady G., Simonyi M. 2007. Conformation selectivity in the binding of diazepam and analogues to $\alpha 1$ -acid glycoprotein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15:4857-4862

Gillard M., Chatelin P., Fuks B. 2006. Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A(SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein. *European Journal of Pharmacology* 536:102-108

Haas HL, Panula P. 2003. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 4: 121–130.

Haas H., Sergeeva O., Selbach O. 2008. Histamine in the Nervous System. *Physiological Reviews*, 88: 1183-1241

Hardman J.G., Limbird L.E.. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. Mc-Graw, Dallas USA str: 546

Hall J.E., Guyton A. 2006. Guyton and Hall Medical Physiology. Philadelphia.Sanunders: 786-799

Howell B., Chauhan A. 2007. Uptake of amitriptyline and nortriptyline with liposomes, proteins, and serum: Implications for drug detoxification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 319:81-93

ILAE. 2006. Dublin, International League Against Epilepsy.
<http://www.ilae-epilepsy.org/Visitors/Centre/ctf/CTFtable3.cfm> (april 2010)

Jyoti Biswas S., Pathak S. 2004. Assessment of the genotoxic and cytotoxic potential of an anti-epileptic drug, phenobarbital in mice. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 563: 1-11

Kržan M. 2001. Funkcija Astrocitov. *Zdravniški vestnik*, 70: 553-9

Kržan M., Schwartz JP. 2006. Histamine Transport in Neonatal and Adult Astrocytes. *Inflammation Research*, 55: Supplement I: S36-7

Lancelin F., Franchon E., Kraoul L., Garciau I., Brovedeni S. 2007. Therapeutic drug monitoring of levetiracetam by high performance liquid chromatography with photodiode array ultraviolet detection: preliminary observations on correlation between plasma concentration and clinical response in patients with refractory epilepsy. *The drug Monitoring* 29: 576-83

Lemke L.T., Williams D.H., Roche V.F., Zito S.W. 2008. Foyes principles of medicinal chemistry. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore USA

Moussavi S., Chatterji S., Verdes E. 2007. Depression, chronic diseases and decrements in health: results from World Health Surveys. *The Lancet* 370: 851-858

Nestler EJ., Hyman SE., Malenka RC. 2001. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. New York, McGraw-Hill Companies, Inc: 176-211

Papler T., Pečavar B. 2007. Vpliv antidepresivnih zdravil na privzem histamina v astrocite. Študentsko raziskovalno delo, Medicinska fakulteta

Ribarič S. 2009. Temelji patološke fiziologije. UL MF Inštitut za patološko fiziologijo. Ljubljana. Lifferra picta: 273-275

Rang HP., Dale MM., Ritter JM., Flower RJ. 2007. Rand and Dale's Pharmacology, 6th edition, Philadelphia, Elsevier Limited: 829 str.

Randall DJ., Burggren W., French K. 2002. Eckert animal physiology : mechanisms and adaptations, New York, W.H. Freeman and Company: 120 str.

Radtke A.R. 2001. Pharmacokinetics of levetiracetam. Epilepsia, 42:24-27

Slovenski medicinski e-slovar. 2004. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Lek

Solomon EP., Berg LR., Martin DW. 2002. Biology. 6th Edition, USA, Thomas Learning Inc: 836-883

Whysner J., Ross P. M., Williams G. M. 1996. Phenobarbital Mechanistic Data and Risk Assessment. Pharmacology & Therapeutics, 71:153-191

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici dr. Mojci Kržan za veliko strokovne pomoči, nasvetov, moralno podporo in temeljit pregled diplomske naloge.

Posebej se zahvaljujem tudi strokovni sodelavki Jožici Košir za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela diplome.

Hvala mojim staršem, ki so mi študij omogočili.

Hvala ostalim domačim, prijateljem in sošolcem za nasvete in pomoč tekom študija.

Hvala Nini za pomoč pri prevodih in Gregorju za vso podporo in pomoč pri računalniških težavah.