

GABA_A receptori: molekularni supstrat za razvoj novih anksiolitika

Dragan Obradović*, Miroslav Savić†, Nenad Ugrešić†, Dubravko Bokonić‡

Medicinski fakultet, *Institut za kliničku farmakologiju, farmakologiju i toksikologiju, †Farmaceutski fakultet, Institut za farmakologiju, Beograd, Vojnomedicinska akademija, ‡Centar za kontrolu trovanja, Beograd

Ključne reči: receptori GABA-A; GABA; benzodiazepini; diazepam; anksioznost.

Key words: receptors GABA-A; gamma-aminobutyric acid; benzodiazepines; diazepam; anxiety.

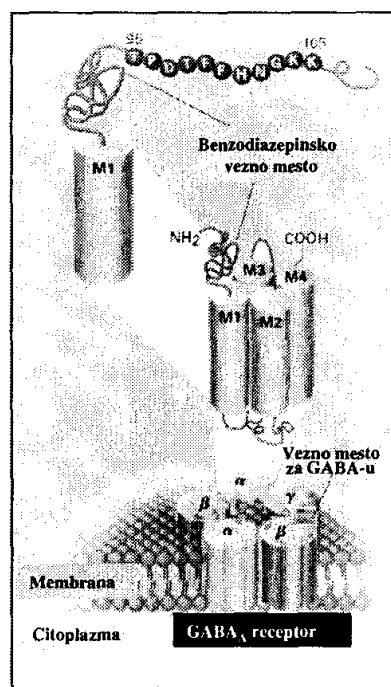
Mehanizam delovanja benzodiazepina, najšire primenjivanih lekova u terapiji anksioznih poremećaja (1–5), utvrđen je 15-ak godina nakon njihovog uvođenja u kliničku praksu šezdesetih godina dvadesetog veka (6, 7). Dodatnih 20-ak godina je proteklo do punog razotkrivanja kompleksne arhitekture benzodiazepinskog receptora, preko kojeg ovi lekovi deluju (8, 9). Pokazalo se da klasični benzodiazepini, kao što je diazepam, svoje efekte ostvaruju omogućavanjem aktivnosti neurotransmitera γ -aminobuterne kiseline (GABA) na jednom broju receptora za GABA-u (benzodiazepin-senzitivni receptori), dok se ne vezuju za preostalu populaciju receptora (benzodiazepin-nesenzitivni receptori) (9). Na kraju dvadesetog veka, primenom tehnologija genetski modifikovanih životinja (10), stekli su se uslovi za početak utvrđivanja korelacije između pojedinih efekata benzodiazepina i njihovog specifičnog molekularnog i neuronskog supstrata (11). Ova izuzetno aktuelna istraživanja će, sada je već izvesno, imati za posledicu razvoj selektivnih lekova koji deluju preko benzodiazepinskog receptora sa novim, suženim profilom dejstava, terapijskih i neželjenih (12).

GABA-ergička neurotransmisija

Funkcionalni status centralnog nervnog sistema (CNS) zavisi, pre svega, od uravnoteženosti ekscitatornih i inhibitornih signala. Inhibitorne signale ostvaruju neurotransmiteri GABA i glicin, pri čemu je GABA glavni inhibitorni neurotransmiter (13). Deluje preko tri klase receptora (GABA_A,

GABA_B, GABA_C) (9, 14), od kojih je aktivacija GABA_A tipa kvantitativno i funkcionalno najznačajnija (15).

GABA_A receptori su heteropentamerni transmembranski proteini (slika 1) koji formiraju jonski kanal selektivno



Sl. 1 – Shematski prikaz GABA_A receptora. Prema Weinbergeru (58)

permeabilan za hloridni anjon (8, 9). Do sada je klonirano 19 podjedinica, kodiranih posebnim genima. Svaka podjedinica ima veliki ekstracelularni N-terminal, četiri hidrofobna transmembranska domena (M1-M4), intracelularnu petlju između M3 i M4 domena, koja sadrži fosforilaciona mesta za protein kinazu A, protein kinazu C i tirozin kinazu, i kratki *ekstracelularni* C-terminal. M2 domeni svake od pet podjedinica su ključni za funkciju i jonsku selektivnost receptora, jer direktno formiraju poru jonskog kanala (16). Podjedinice su svrstane u nekoliko strukturalno povezanih podfamilija koje obuhvataju izoforme visokog stepena homologije (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , ρ_{1-3}). Postoji približno 70%-tna podudarnost sekvence podjedinica iz iste podfamilije, odnosno 30%-tna podudarnost između pojedinih podfamilija (17). Najčešće zastupljena receptorska populacija je agregat sastavljen od dve α , dve β i jedne γ podjedinice. Redi su receptori koji pored dve α i dve β podjedinice sadrže neku drugu, *ne- γ* podjedinicu, a postoje i receptori sastavljeni samo od α i β podjedinica (18, 19). S obzirom na to da dve različite α i/ili β podjedinice mogu da budu prisutne u istom receptoru, u mozgu najverovatnije postoji više od 500 različitih GABA_A receptora (20), iako, teorijski, broj samo onih receptora koji bi sadržavali dve α , dve β i neku od ostalih podjedinica prelazi 2 000 (17). Imunoprecipitaciona ispitivanja pokazuju da je broj glavnih podtipova GABA_A receptora manji od 10, sa kombinacijom $\alpha_1 \beta_2 \gamma_2$ prisutnom u 43%, $\alpha_2 \beta_{2/3} \gamma_2$ u 18% i $\alpha_3 \beta_n \gamma_{2/3}$ u 17% slučajeva (21). Ipak, egzaktnost dobijenih rezultata dovodi u pitanje činjenica da je prisutnost podtipova receptora koji se teže solubilizuju potcenjena u imunoprecipitacionim ispitivanjima (22). S druge strane, opsežna imunocitohemijska istraživanja distribucije 13 najčešćih podjedinica (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ) u mozgu pacova pokazuju da ogromna većina receptora sadrži γ_2 podjedinicu, dok su δ i γ_1 podjedinica ograničene na veoma mali broj područja. U maloj koncentraciji γ_3 podjedinica je difuzno prisutna u celom mozgu. Od α podjedinica α_1 pokazuje najizraženiju imunoreaktivnost i prisutna je praktično u svim moždanim regijama. Ostalih pet α podjedinica su više ograničene na pojedine regije. Poseban značaj za mehanizam delovanja benzodiazepina ima činjenica da veliki procenat GABA_A receptora sadrži ili dve α , podjedinice, ili kombinaciju jedne α_1 i jedne α_2 , α_3 , α_4 , α_5 ili α_6 podjedinice (23).

Većina inhibitornih dejstava GABA-e posredovana je GABA_A receptorima (9). Aktivacija receptora dovodi do promene konformacijskog stanja pripadajućeg jonskog kanala, što za posledicu ima povećanje provodljivosti za hloridni anjon (Cl⁻). Pošto primarni aktivni transport hloridnih jona u većini ćelija nije prisutan, ravnotežni elektrohemijski potencijal za Cl⁻ je obično blizak potencijalu mirovanja membrane (razlika iznosi ± 20 mV), tako da je nastala promena potencijala postsinaptičke membrane mala u amplitudi, češće u smeru hiperpolarizacije (inhibitorni postsinaptički potencijal, IPSP), ali ponekad i hipopolarizujuća. U oba slučaja, međutim, povećanje provodljivosti za Cl⁻, *per se*, formira tzv. put kratkog kola, kojim se ekscita-

torni (natrijumski) protok uravnotežuje hloridnim protokom, što se manifestuje otežavanjem membranske depolarizacije. Prema tome, aktivacija GABA_A receptora smanjuje verovatnoću generisanja akcijskog potencijala u odgovoru na ekscitatorne uticaje na posmatranom neuronu (16).

Modulacija dejstava γ -aminobuterne kiseline na GABA_A receptorima

Pored liganada koji regulišu funkcijsko stanje jonskog kanala u sklopu GABA_A receptora vezivanjem za mesto prepoznavanja endogenog aktivatora GABA-e (kompetitivni agonist muscimol, kompetitivni antagonist bikukulin), veliki broj liganada (benzodiazepini, neurosteroidi, barbiturati, opšti anestetici, alkohol) moduliše aktivnost receptor-skog kompleksa vezivanjem za druga, *alosterna* mesta prepoznavanja (15). Do sada je ukupno prepoznato 14 različitih, strukturalno specifičnih mesta na GABA_A receptoru: 1) mesto vezivanja GABA-e i drugih agonista, kao i kompetitivnih antagonista; 2) pikrotoksinsko mesto u jonskom kanalu; 3) mesto vezivanja barbiturata; 4) mesto vezivanja neuroaktivnih steroida; 5) benzodiazepinsko mesto; 6) mesto vezivanja etanola; 7) stereoselektivna mesta vezivanja inhalacionih anestetika; 8) mesto vezivanja diuretika furosemda; 9) mesto vezivanja Zn²⁺ jona; 10) mesto vezivanja drugih bivalentnih katjona, 11) mesto za La³⁺ jone; 12) mesta vezivanja fosfolipida; 13) mesta za fosforilaciju specifičnim protein kinazama; i 14) mesta uključena u interakciju GABA_A receptora i mikrotubula, koji učestvuju u grupisanju receptora na postsinaptičkim membranama (17).

Benzodiazepini i drugi ne-benzodiazepinski analozi vezivanjem za benzodiazepinsko regulatorno mesto (benzodiazepinski receptor), smešteno na međupovršini između α i γ_2 ili, ređe, γ_3 podjedinice, alosterno povećavaju afinitet GABA-e za receptor, što se manifestuje porastom frekvence otvaranja jonskog kanala u prisustvu date koncentracije neurotransmitera, odnosno porastom efikasnosti tekuće GABA-ergičke neurotransmisije (15, 24-26).

Klasični benzodiazepini, kao što je diazepam, pokazuju komparabilan afinitet za sve GABA_A receptore koji sadrže γ_2 , β i α_1 , α_2 , α_3 ili α_5 podjedinicu (benzodiazepin-senzitivni receptori), dok se ne vezuju za receptore koji sadrže α_4 ili α_6 podjedinicu (benzodiazepin-nesenzitivni receptori). Naime, benzodiazepin-senzitivni receptori poseduju aminokiselinsku reziduu histidina (H) u N-terminalnom delu α -podjedinice kritičnom za interakciju sa molekulom benzodiazepina (na poziciji 101 u α_1 i α_2 podjedinici, odnosno pozicijama 126 i 105 u α_3 i α_5 podjedinicama), dok α_4 i α_6 podjedinice u odgovarajućoj poziciji sadrže reziduu arginina (R) (20, 27). Na jednom GABA_A receptoru postoji samo jedno mesto prepoznavanja benzodiazepina, iako, po pravilu, ovaj proteinski kompleks poseduje dve α podjedinice (28, 29). Naime, i γ podjedinica, određenim aminokiselinskim reziduama, učestvuje u formiranju veznog mesta za benzodiazepine, a smeštena je, najverovatnije, u susedstvu samo jedne α podjedinice, tako da mogućnost ve-

zivanja drugog molekula benzodiazepina preko druge α podjedinice ostaje nerealizovana. S druge strane, GABA se vezuje za receptorsko mesto smešteno na međupovršini α i β podjedinica, koje su zastupljene sa dva para međusobno susednih makromolekula, tako da se dva molekula neurotransmitera mogu vezati za jedan receptorski kompleks. Elektrofiziološka ispitivanja ukazuju da vezivanje molekula benzodiazepina za vezno mesto na GABA_A receptoru dovodi do konformacijskih promena jednog veznog mesta za GABA-u, i to najverovatnije onog u čijem formiranju učestvuje α podjedinica koja je učestvovala i u vezivanju benzodiazepina. Prema tome, zahvaljujući propagaciji konformacijske promene sa α - γ međupovršine (vezno mesto za benzodiazepine) ka susednoj α - β međupovršini (vezno mesto za GABA-u), benzodiazepini bi povećavali afinitet za vezivanje jednog molekula GABA-e. Međutim, konformacijske promene se ne prenose do druge α podjedinice, odnosno veznog mesta za drugu molekulu GABA-e, što bi moglo objasniti činjenicu da benzodiazepini ne mogu sami da otvore receptorski jonski kanal, odnosno, za razliku od barbiturata, ne mogu da deluju u odsustvu GABA-e (29). Vezivanjem za svoje modulatorno mesto barbiturati, takođe, potenciraju efekte GABA-e, ali pri višim koncentracijama deluju i preko drugog veznog mesta nižeg afiniteta i tako direktno aktiviraju GABA_A receptor (15, 30).

Rezultat prikazanog molekularnog mehanizma interakcije benzodiazepina i GABA_A receptora jesu standardni farmakološki efekti benzodiazepina: redukcija anksioznosti, sedacija, indukcija sna, smanjenje mišićnog tonusa, otežavanje motorne koordinacije, suzbijanje konvulzivne aktivnosti, anterogradna amnezija, razvoj zavisnosti (15). Dodatno smanjenje intenziteta potrošnje kiseonika u moždanom tkivu pod dejstvom diazepama (31, 32) i midazolama (33), pokazano u *ex vivo* modelu kod pacova, moglo bi da ima značaja za rezultate dobijene u testovima kognitivne funkcije (34), kao i za objašnjenje protektivnih svojstava benzo-

diazepina kod lečenja trovanja organofosforinim inhibitorima acetilholinesteraze (35).

Prema tome, diazepam i drugi benzodiazepini koji se sa komparabilnim afinitetom vežu i pozitivno modulišu sve GABA_A receptore koji sadrže vezno mesto za benzodiazepine, odlikuju se, sa farmakoterapijskog stanovišta, nedovoljnom selektivnošću dejstva, odnosno njihova primena je opterećena neželjenim dejstvima koja se, usled profila interakcije lek-receptor, ne mogu izbeći. Savremeni pristup ovom problemu jeste 1) otkrivanje molekularnog i neuronskog supstrata pojedinih dejstava benzodiazepina i 2) sinteza novih liganada sa selektivnim afinitetom za pojedine podtipove GABA_A receptora, odnosno veznih mesta za benzodiazepine (36).

Genetski modifikovane životinje u istraživanju farmakoloških dejstava benzodiazepina

Najspecifičniji i istovremeno najsuptilniji pristup u otkrivanju regulatornih elemenata homeostatske kontrole fizioloških funkcija jeste otkrivanje gena koji obezbeđuju sintezu proteina ključnih za pojedine strukturne i regulatorne funkcije. U ovu svrhu u eksperimentnoj farmakologiji mogu se analizovati prirodne varijacije genotipa (npr. soj spontano hiperemocionalnih pacova), izazivati slučajne mutacije primenom hemijskih mutagena i, najsavremenije, koristiti mogućnosti genske tehnologije (10).

Ispitivanje diazepama, kao referentnog benzodiazepina, na genetski modifikovanim životinjama otvara mogućnosti povezivanja pojedinih efekata sa konkretnim podtipom receptora (tabela 1) i, dalje, razvoj selektivnih lekova sa novim, suženim profilom dejstava, terapijskih i neželjenih (27, 37).

Prema poslednjem pristupu, genetska modifikacija se može postići na dva načina: razvojem *transgenih* i *ciljano mutiranih* (eng. *targeted mutant*) životinja. Transgena tehnologija je primenljiva kod miševa, pacova i drugih živo-

Tabela 1.

Farmakološki efekti benzodiazepina i podtipovi GABA_A receptora koji ih posreduju (41–47)

Efekat	Podtip receptora			
	α_1	α_2	α_3	α_5
Sedacija	+	-	-	-
Anksioliza	-	+	-	-
Anterogradna amnezija	+	n.o.	n.o.	n.o.*
Miorelaksacija	-	+	+ [†]	+
Antikonvulzijska aktivnost	+	-	-	-
Hipnoza (EEG promene)	-	n.o.	n.o.	n.o.

+ – farmakološki efekat diazepama izostaje kod miševa sa tačkastom mutacijom u označenoj podjedinici

- – farmakološki efekat diazepama kod mutiranih miševa nije izmenjen u odnosu na divlji soj

n.o. – nije određeno.

* – Testovi sa farmakološki netretiranim miševima sa tačkasto mutiranom (46) i inaktivisanom (55) α_5 subjedinicom ukazuju na značaj GABA_A receptora koji sadrže ovu subjedinicu u regulaciji kognitivnih procesa učenja i pamćenja.

† – Usporedno ispitivanje miorelaksantnog efekta diazepama na α_2 - i α_3 - mutiranim miševima pokazalo je da je efekat primarno posredovan GABA_A receptorima koji sadrže α_2 podjedinicu, a da su za miorelaksantnu aktivnost visokih doza diazepama značajni i receptori koji sadrže α_3 podjedinicu (43).

tinjskih specijesa, a sastoji se u mikroinjektovanju odabrane DNK sekvence u oplodenu jajnu ćeliju. DNK se u skladu sa principima zakona verovatnoće integriše u genom, tako da tkivna distribucija i nivo ekspresije transgenih konstrukata varira od jedne do druge linije životinja. Rezultat ovakvog pristupa je najčešće ekscesivna ekspresija funkcije determinisane stranim genom ali, kao kod ekspresije *antisense* konstrukata, rezultat može biti i gubitak praćene funkcije (10).

Kod pristupa *ciljane mutacije* generišu se ciljani vektori (eng. *targeting vectors*) koji se specifično, homogenom rekombinacijom, integrišu na željenu lokaciju u genomu u embrionalnim matičnim ćelijama miša. Ovako modifikovane ćelije se zatim injektuju u blastociste, čime se mutacija, preko embriona u razvoju, unosi u liniju soja. U slučaju eksperimenta *inaktivacije gena* ciljani gen se onesposobljava uvođenjem markera za rezistenciju na neomicin i/ili isecanjem dela gena, što se označava kao *knockout* tehnologija. *Knockout* mutacije se mogu pratiti u heterozigotnom (procena potencijala ispoljavanja fenotipa) i u homozigotnom stanju (analiza nulnog fenotipa). Zapažene promene u fenotipu služe kao osnova za zaključivanje o normalnoj funkciji ispitivanih gena kod tzv. divljih, *nemodifikovanih* životinja. Ciljane mutacije nisu ograničene na ablacije: suštinski svaka željena izmena, kao što su tačkaste (eng. *point*) mutacije, zamena jednog gena miša drugim, ili zamena gena miša homologim humanin genom može da se unese u genom, i ovakve suptilne izmene se označavaju terminom *knock-in* tehnologija. Tehnologija embrionalnih matičnih ćelija je trenutno primenljiva samo kod miševa (5).

Do sada je stvoreno nekoliko linija miševa sa inaktiviranim pojedinim GABA_A podjedinicama. *Knockout* γ_2 podjedinice je imao letalan efekat, a inaktivacija α_6 podjedinice nije dovela do fenotipskih manifestacija. Nedostatak β_3 podjedinice je produkovao miševе sa epileptičkim fenotipom, dok je ablacija δ podjedinice smanjila senzitivnost na neuroaktivne steroide (27). Miševi sa nedostatkom α_1 podjedinice, normalno prisutne u oko 50% GABA_A receptora, pokazuju intencioni tremor i povećanu osetljivost na konvulzivno dejstvo bikukulina (38). Glavni nedostatak iznetog pristupa je mogućnost kompenzatornih izmena u razvoju i funkciji mozga, uzrokovanih apsolutnim nedostatkom ovih receptora (27).

Prema alternativnom pristupu, tačkaste mutacije α podjedinica GABA_A receptora, kojima se jedna aminokiselinska rezidua histidina zamenjuje argininom, rezultuju rekombinantnim receptorima (α_1 [H101R], α_2 [H101R], α_3 [H126R], α_5 [H105R]), čija je osetljivost na dejstvo GABA-e ostala neizmenjena (39, 40). Budući da su označene rezidue histidina ključne determinante interakcije receptora koji ih sadrže sa benzodiazepinima - formiraju osnovu benzodiazepinskog veznog mesta - moguće je generisati linije miševa u kojih su α_1 , α_2 , α_3 i α_5 podjedinica postale neosetljive na dejstvo diazepama (40). Mutirani receptori pokazuju nivo ekspresije, regionalnu i celularnu distribuciju koja se ne može razlikovati u odnosu na divlji tip miša (27).

Do sada su objavljeni rezultati ispitivanja promena dejstava diazepama na sve četiri rekombinantne linije miševa (α_1 , α_2 i α_3 i α_5 mutirani miševi) (41–47). Logički pristup je bio da će kod svake linije izostati oni efekti diazepama koji su posredovani podtipom receptora koji sadrži mutiranu, diazepam-neosetljivu α podjedinicu (27).

Za procenu sedativnog dejstva, odnosno otkrivanje molekuskog supstrata ovog efekta benzodiazepina, korišćen je *test spontane lokomotorne aktivnosti* kao mera opšte motorne aktivnosti eksperimentalne životinje (48). Inhibitorski efekat diazepama na motornu aktivnost miševa sa genetski modifikovanom α_1 podjedinicom, koja ne može da veže diazepam, nije mogao da se postigne ni pri izuzetno visokoj dozi od 30 mg/kg. (41). Pri nešto drugačijim uslovima testiranja u drugoj laboratoriji, u kojima je došla do izražaja eksplorativna komponente opšte motorne aktivnosti, doza od 3 mg/kg diazepama je uzrokovala značajno povećanje lokomotorne aktivnosti miševa sa genetski modifikovanom α_1 podjedinicom, što su autori protumačili očuvanošću anksiolitičkog efekta, odnosno umanjnjem reakcije neofobije (42). GABA_A receptori koji sadrže α_1 podjedinicu čine oko 60% ukupne populacije GABA_A receptora i, premda prisutni u praktično svim regijama mozga, posebno su izraženi u strijatumu, talamusu i olfaktornom bulbusu (23).

Test pasivnog izbegavanja averzivne draži predstavlja primarni test za procenu dejstva lekova na kognitivnu funkciju (49). Testiranje α_1 mutiranih miševa u ovom modelu pokazalo je izostanak benzodiazepinske anterogradne amnezije: diazepam nije smanjio latentno vreme ponovnog ulaska u tamni odeljak aparata u kome je životinja prethodnog dana doživela neizbeživi električni šok (41). Shodno ovome, za amnezijski efekat benzodiazepina prvenstveno je odgovorna facilitacija efekata posredovanih receptorima koji sadrže α_1 podjedinicu (27).

Procena uticaja diazepama na očuvanost motorne koordinacije izvršena je *rotarod testom*. Miševi sa modifikovanom α_1 podjedinicom nisu bili podložni onesposobljavajućem efektu diazepama na održavanje ravnoteže na rotirajućoj osovinu ni pri primeni doze od 10 mg/kg (41, 42). Međutim, kako je i sedativni efekat benzodiazepina posredovan prvenstveno α_1 podjedinicom, ovim modelom nije moguće sa potpunom sigurnošću utvrditi da li ataksija predstavlja zaseban efekat diazepama ili je, barem delimično, u pitanju manifestacija produbljene sedacije (27).

Uticaj diazepama na očuvanost mišićnog tonusa divljih i genetski modifikovanih miševa je procenjen *testom horizontalne žice* (eng. *horizontal wire test*) (41, 44, 46) i merenjem jačine stiska u *testu vučenja lanca* (eng. *chain-pulling test*) (42). Zapaženo oštećenje refleksa hvatanja u prvom (41) i umanjnje jačine stiska u drugom testu (42), kod miševa sa genetski modifikovanom α_1 podjedinicom, tretiranih diazepamom, ukazuje da miorelaksantni efekat nije posredovan GABA_A receptorima koji sadrže ovu podjedinicu. Od tri preostala tipa benzodiazepin-senzitivnih receptora procenjuje se da najznačajniju ulogu za dejstvo benzodiazepina

na mišićni tonus treba pripisati α_2 podjedinici, koja je gusto distribuirana u kičmenoj moždini (37). Kod α_3 -mutirane linije tek se pri visokoj dozi od 30 mg/kg diazepama zapaža značajno smanjenje miorelaksantnog dejstva u odnosu na divlju liniju i upravo segment miorelaksantnog efekta diazepama, posredovan α_3 -receptorima, mogao bi da učestvuje u njegovom rezidualnom efektu kod α_2 -mutirane linije (44). Da je miorelaksantni efekat diazepama posredovan neuronskim sklopovima koji obuhvataju više tipova GABA_A receptora potvrdio je nalaz da je kod α_5 (H105R) mutiranih miševa ovaj efekat značajno slabiji u odnosu na divlju liniju, najverovatnije usled prisutstva α_5 GABA_A receptora na motoneuronima i zadnjim rogovima kičmene moždine (45). Hipoteza o relativnom značaju α_2 podjedinice za miorelaksantni efekat benzodiazepina nije u skladu ni sa, u narednom poglavlju prikazanim, rezultatima koje je sa selektivnim ligandom L-838417 dobila McKernan sa saradnicima (42).

U testu delovanja na *toničku konvulzivnu aktivnost izazvanu pentilentetrazolom* utvrđeno je da se antikonvulzivni efekat diazepama, značajnim delom, ali ne i potpuno, zasniva na vezivanju za GABA_A receptore koji sadrže α_1 podjedinicu (41).

Od desetak validnih testova za procenu anksiolitičkog dejstva lekova (50, 51) u ispitivanjima molekuskog supstrata anksiolitičkog dejstva benzodiazepina korišćeni su *test uzdignutog lavirinta u obliku znaka plus* (eng. *elevated plus-maze test*) (41–43), *test izbora između svetla i tame* (eng. *light-dark choice test*) (41, 43) i *test preneraženja potenciranog strahom* (eng. *fear-potentiated startle*) (42). Poređenje dejstava diazepama na prirodne i genetski modifikovane miševe je pokazalo da je anksiolitički efekat benzodiazepina posledica omogućavanja aktivnosti GABA_A receptora koji sadrže α_2 podjedinicu, a koji čine 15% ukupne populacije GABA_A receptora i koji predominiraju u strukturama odgovornim za obradu emocionalnih stimulusa, a najizraženije u centralnom nukleusu amigdale (27). Pored toga, receptori koji sadrže α_2 podjedinicu su gusto eksprimirani na inicijalnim segmentima aksona projekcionih ćelija cerebralnog korteksa i hipokampusa, na taj način modulišući aktivnost ovih neurona (15, 17). S druge strane, strukture koje eksprimiraju α_3 podjedinicu: retikularno-aktivacijski sistem (noradrenergički, serotonergergički i dopaminergergički neuroni) i bazalni prozencefalon (holinergergički neuroni), nisu specifično uključene u anksiolitički efekat benzodiazepina, koji postoji i pri onemogućavanju vezivanja diazepama za ovu podjedinicu (27, 43). I inače, linija α_3 mutiranih miševa, generalno, nije pokazala značajne razlike u bihevioralnim testovima u odnosu na divlju liniju (43).

Imunohistohemijsko, elektrofiziološko i bihevioralno ispitivanje linije α_5 -mutiranih miševa utvrdilo je da, za razliku od ostale tri linije modifikovanih životinja, α_5 (H105R) miševi pokazuju *deficit* mutiranih receptora, eksprimiran na nivou piramidnih ćelija hipokampusa, i to u populaciji ekstrasinaptičkih receptora (46). I dok, sa aspekta

farmakološkog fenotipa, efekti diazepama, praćeni u testovima sedativnog, anksiolitičkog i antikonvulzivnog dejstva, nisu izmenjeni u odnosu na divlju liniju (kao što je već navedeno, jedino je zapažena uloga α_5 GABA_A receptora u miorelaksantnom dejstvu diazepama), prvi put je utvrđena razlika u fiziološkom fenotipu mutiranih miševa. Visoko specifično, u populaciji farmakološki netretiranih, α_5 -mutiranih miševa, raste, u odnosu na divlju liniju, reakcija imobilnosti (eng. *freezing*) u jednom od tri korišćena testa kondicioniranja strahom. U pitanju je procedura kod koje pojavi bezuslovne draži (električno, bolno draženje šapica) prethodi uslovljavajući zvučni signal i *pauza tokom l s* (eng. *trace fear conditioning*), za razliku od druge dve paradigme, gde izostaje pauza između dve draži (eng. *delay fear conditioning*) ili uslovljavajuće draži i nema (eng. *contextual fear conditioning*) (52). Pojava se može dovesti u kauzalnu vezu sa imunohistohemijski pokazanim deficitom receptora u hipokampusu, jer je poznato da je upravo *trace* kondicioniranje oblik asocijativnog učenja zavisano od hipokampusa (53, 54). Odnosno, ekstrasinaptički α_5 GABA_A receptori bi mogli da predstavljaju molekulski supstrat za obradu vremenski diskontinuiranih stimulusa na nivou hipokampusa (46). O značaju α_5 GABA_A receptora hipokampusa u kontroli kognitivnih procesa govori i nalaz da miševi sa inaktivisanom α_5 podjedinicom (*knockout* tehnologija) značajno bolje izvode paradigmu prostornog učenja u vodenom lavirintu (eng. *water maze test*) u odnosu na divlju liniju, dok nisu zapažene razlike u drugim testovima učenja i memorije za čije izvođenje nije od primarnog značaja funkcija hipokampusa, niti u testovima anksioznosti (55).

Praćenjem dejstava diazepama na *EEG aktivnost* divljih i genetski modifikovanih miševa utvrđeno je da tipični benzodiazepinski „otisak“ na EEG zapis nije, primarno, posledica aktivacije GABA_A receptora koji sadrže α_1 podjedinicu, odnosno da su *sedativni i hipnotički efekat benzodiazepina posredovani različitim molekuskim i neuronskim supstratom* (45). Drugim rečima, na osnovu sadašnjeg stanja istraživanja hipnotički efekat benzodiazepina i njegov EEG korelat mogli bi da se razdvoje od sedativnog dejstva.

Perspektive razvoja novih liganada za benzodiazepinske receptore

Eksperimentalni ligand koji trenutno pokazuje najselektivniji anksiolitički profil nosi oznaku L-838417 (37, 42). U pitanju je ligand za benzodiazepinsko vezno mesto nebenzodiazepinske strukture, koji se sa komparabilnim afinitetom veže za GABA_A receptore koji sadrže α_1 , α_2 i α_3 podjedinicu, a sa tri puta manjim afinitetom za receptora koji sadrže α_5 podjedinicu. S druge strane, pokazuje izraženu selektivnost efikasnosti na pojedinim podtipovima receptora. Modulatorni efekat na dejstvo GABA-e na receptorima koji sadrže α_1 podjedinicu izostaje (ponaša se kao neutralizujući alosteri modulator (17) ili, manje precizno,

kompetitivni antagonist), dok pozitivno moduliše efekte na receptorima koji sadrže α_2 , α_3 i, u manjoj meri, α_5 podjedinice (parcijalni pozitivni alosterični modulator, odnosno parcijalni agonist). Usled ovakvog profila modulacije GABA-ergičke neurotransmisije, L-838417, u širokom rasponu doza, ne smanjuje spontanu lokomotornu aktivnost divljeg soja miševa (zapravo, zapaža se povećanje aktivnosti, koje može da se objasni anksiolitičkim dejstvom), ne utiče onesposobljavajuće na izvođenje rotarod testa i ne umanjuje snagu stiska eksperimentne životinje: shodno tome, ligand ne izaziva sedaciju, ne oštećuje motornu koordinaciju i ne deluje miorelaksantno. Istovremeno, antikonvulzivna aktivnost u uslovima konvulzija izazvanih pentilentetrazolom je prisutna u značajnoj meri. Konačno, u dva testa za procenu anksiolitičkog dejstva lekova, testu uzdignutog lavirinta u obliku znaka plus i testu preneraženja potenciranog strahom ovaj ligand benzodiazepinskih receptora pokazuje anksiolitički efekat, komparabilan sa efektom diazepama (42).

Drugi ligand za benzodiazepinsko vezno mesto značajne selektivnosti u vezivanju i aktivisanju podtipova GABA_A receptora takođe je ne-benzodiazepinske strukture i označen je kao SL651498 – 6-fluoro-9-metil-2-fenil-4-(pirolidin-1-il-karbonil)-2,9-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-on. SL651498 pokazuje visok afinitet vezivanja za GABA_A receptore koji sadrže α_1 i α_2 podjedinicu, intermedijerni za α_3 i nizak afinitet za α_5 podjedinicu. S druge strane, ovaj ligand je puni agonist na receptorima koji sadrže α_2 i α_3 podjedinicu, a parcijalni agonist na receptorima sa α_1 i

α_5 podjedinicom. Posledično, SL651498 uzrokuje anksiolitičke i miorelaksantne efekte u rasponu doza višestruko nižem (1–10 mg/kg, ip) od onog neophodnog za izazivanje mišićne slabosti, ataksije, sedacije i anterogradne amnezije (30–100 mg/kg, ip) (56).

Imajući u vidu i primere već poznatih relativno selektivnih α_1 liganada (abekarnil, zolpidem, zaleplon) i parcijalnih agonista (bretazenil, imidazenil), jasno je da se selektivnost liganada za benzodiazepinske receptore može postići selektivnim afinitetom, selektivnom efikasnošću ili, najrealnije, optimalnom kombinacijom ova dva osnovna svojstva interakcije ligand - receptor (27). U prilog ovakvom pristupu govori i činjenica da se, kod genetski modifikovanih linija, kvalitet bihevioralnih efekata može menjati i posle primene liganada sa inverznom agonističkom aktivnošću (57). Tako, jedinjenje Ro 15-4513, koje povećava lokomotornu aktivnost i potencira konvulzijsku aktivnost u divljoj liniji miševa nakon primene kod α_1 (H101R) linije pokazuje standardne efekte agonista, hipolokomotornu i antikonvulzijsku aktivnost. Klasični β -karbolinski inverzni agonist, DMCM, gubi prokonvulzivnu aktivnost kod α_1 (H101R) miševa (47).

U zaključku, profilisana bihevioralna ispitivanja na genetski modifikovanim sojevima životinja omogućiće razvoj novih lekova sa većom specifičnošću delovanja, za terapiju anksioznih poremećaja i drugih psihijatrijskih i neuroloških stanja u čijoj etiologiji i patogenezi učestvuje GABA-ergički sistem (12, 58).

L I T E R A T U R A

1. Shader RI, Greenblatt DJ. Use of benzodiazepines in anxiety disorders. *N Engl J Med* 1993; 328(19): 1398–405.
2. Nutt DJ, Malizia AL. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br J Psychiatry* 2001; 179: 390–6.
3. Smith TA. Type A gamma-aminobutyric acid (GABA_A) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. *Br J Biomed Sci* 2001; 58(2): 111–21.
4. Gorman JM. Treatment of generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 2002; 63 Suppl 8: 17–23.
5. Sramek JJ, Zarotsky V, Cutler NR. Generalised anxiety disorder: treatment options. *Drugs* 2002; 62(11): 1635–48.
6. Costa E, Guidotti A, Mao CC. Evidence for the involvement of GABA in the action of benzodiazepines. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1975; (14): 113–30.
7. Haefely W, Kulcsar A, Möhler H, Pieri L, Polc P, Schaffner R. Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1975; (14): 131–51.
8. Sieghart W. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 1995; 47(2): 181–234.
9. Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, et al. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 1998; 50(2): 291–313.
10. Rudolph U, Mohler H. Genetically modified animals in pharmacological research: future trends. *Eur J Pharmacol* 1999; 375(1–3): 327–37.
11. Benson JA, Löw K, Keist R, Möhler H, Rudolph U. Pharmacology of recombinant γ -aminobutyric acid_A receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated α -subunits. *FEBS Lett* 1998; 431(3): 400–4.
12. Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300(1): 2–8.
13. Bloom FE. Neurotransmission and the central nervous system. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological

- Basis of Therapeutics, 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 293–320.
14. *Bormann J*. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(1): 16–9.
 15. *Mehra AK, Ticku MK*. An update on GABA_A receptors. *Brain Res Rev* 1999; 29(2–3): 196–217.
 16. *Cherubini E, Conti F*. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci* 2001; 24(3): 155–62.
 17. *Chebib M, Johnston GA*. GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem* 2000; 43(8): 1427–47.
 18. *Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH*. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* 1992; 12(3): 1040–62.
 19. *Fritschy JM, Möhler H*. GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* 1995; 359(1): 154–94.
 20. *Sieghart W*. Unraveling the function of GABA_A receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(11): 411–3.
 21. *McKernan RM, Whiting PJ*. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 1996; 19(4): 139–43.
 22. *Sigel E, Kannenberg K*. GABA_A-receptor subtypes. *Trends Neurosci* 1996; 19(9): 386.
 23. *Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G*. GABA_A receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 2000; 101(4): 815–50.
 24. *Teuber L, Wajjens F, Jensen LH*. Ligands for the benzodiazepine binding site – a survey. *Curr Pharm Des* 1999; 5(5): 317–43.
 25. *Sigel E*. Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA_A receptors. *Curr Top Med Chem* 2002; 2(8): 833–9.
 26. *Charney DS, Mihic SJ, Harris RA*. Hypnotics and sedatives. In: *Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG*, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 399–427.
 27. *Rudolph U, Crestani F, Mohler H*. GABA_A receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22(4): 188–94.
 28. *Williams DB, Akabas MH*. Benzodiazepines induce a conformational change in the region of gamma-aminobutyric acid type A α_1 subunit M3 membrane-spanning segment. *Mol Pharmacol* 2000; 58(5): 1129–36.
 29. *Williams DB, Akabas MH*. Evidence for distinct conformations of the two α_1 subunits in diazepam-bound GABA_A receptors. *Neuropharmacology* 2001; 41(5): 539–45.
 30. *Amin J, Weiss DS*. GABA_A receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* 1993; 366(6455): 565–9.
 31. *Obradović D, Andjelković D*. The influence of GABAergic neurotransmitter system on the oxygen consumption in the hypothalamus of the rat. *Jugoslav Physiol Pharmacol Acta* 1988; 24 (Suppl 6): 313–4.
 32. *Obradović DI, Bokonjić DR, Savić MM, Andjelković DS, Ugrešić ND, Stojiljković MP*. GABA-benzodiazepine receptor complex in brain oxydative metabolism regulation. *Pharmacol Res* 2002; 46: 149–54.
 33. *Obradović DI, Savić MM, Andjelković DS, Ugrešić ND, Bokonjić DR*. The influence of midazolam and flumazenil on rat brain slices oxygen consumption. *Pharmacol Res* 2003; 47(2): 127–31.
 34. *Obradović D, Andjelković D, Bokonjić D, Ružić D, Stojiljković MP*. Correlation of the effect of diazepam on active avoidance learning and on oxygen consumption in rat frontal cortical slices. *Jugoslav Physiol Pharmacol Acta* 1995; 31: 259–63.
 35. *Bokonjić D, Rosić N*. Anticonvulsive and protective effects of diazepam and midazolam in rats poisoned by highly toxic organophosphorus compounds. *Arh Hig Rada Toksikol* 1991; 42(4): 359–65.
 36. *Wisden W, Stephens DN*. Towards better benzodiazepines. *Nature* 1999; 401(6755): 751–2.
 37. *Mohler H, Crestani F, Rudolph U*. GABA_A receptor subtypes: a new pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1(1): 22–5.
 38. *Kralic JE, Korpi ER, O'Buckley TK, Homanics GE, Morrow AL*. Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor alpha1 subunit knock-out mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302(3): 1037–45.
 39. *Wieland HA, Luddens H, Seeburg PH*. A single histidine in GABA_A receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* 1992; 267(3): 1426–9.
 40. *Kleingoor C, Wieland HA, Korpi ER, Seeburg PH, Kettenmann H*. Current potentiation by diazepam but not GABA sensitivity is determined by a single histidine residue. *Neuroreport* 1993; 4(2): 187–90.
 41. *Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM*, et al. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Nature* 1999; 401(6755): 796–800.
 42. *McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR*, et al. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A receptor α_1 subtype. *Nat Neurosci* 2000; 3(6): 587–92.

43. *Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, et al.* Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 2000; 290(5489): 131–4.
44. *Crestani F, Low K, Keist R, Mandelli M, Mohler H, Rudolph U.* Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. *Mol Pharmacol* 2001; 59(3): 442–5.
45. *Tobler I, Kopp C, Deboer T, Rudolph U.* Diazepam-induced changes in sleep: role of the α_1 GABA_A receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(11): 6464–9.
46. *Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, et al.* Trace fear conditioning involves hippocampal α_5 GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(13): 8980–5.
47. *Crestani F, Assandri R, Tauber M, Martin JR, Rudolph U.* Contribution of the α_1 GABA_A receptor subtype to the pharmacological actions of benzodiazepine site inverse agonists. *Neuropharmacology* 2002; 43(4): 679–84.
48. *Kelley AE.* Locomotor activity and exploration. In: *Van Haaren F*, editor. *Methods in behavioral pharmacology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 1993. p. 499–518.
49. *Porsolt RD, McArthur RA, Lenegre A.* Psychotropic screening procedures. In: *Van Haaren F*, editor. *Methods in behavioral pharmacology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 1993. p. 23–51.
50. *Menard J, Treit D.* Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23(4): 591–613.
51. *Holmes A.* Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25(3): 261–73.
52. *Schindler CW.* Classical conditioning. In: *Van Haaren F*, editor. *Methods in behavioral pharmacology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 1993. p. 53–79.
53. *Paulsen O, Moser EI.* A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABA-ergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1998; 21(7): 273–8.
54. *Wallenstein GV, Eichenbaum H, Hasselmo ME.* The hippocampus as an associator of discontinuous events. *Trends Neurosci* 1998; 21(8): 317–23.
55. *Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cuthliff R, Sur C, et al.* Enhanced learning and memory and altered GABA-ergic synaptic transmission in mice lacking the α_5 subunit of the GABA_A receptor. *J Neurosci* 2002; 22(13): 5572–80.
56. *Griebel G, Perrault G, Simiand J, Cohen C, Granger P, Depoortere H, et al.* SL651498, a GABA(A) Receptor Agonist with Subtype-Selective Efficacy, as a Potential Treatment for Generalized Anxiety Disorder and Muscle Spasms. *CNS Drug Rev* 2003; 9(1): 3–20.
57. *Sarter M, Bruno JP, Berntson GG.* Psychogenic properties of benzodiazepine receptor inverse agonists. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 156(1): 1–13.
58. *Weinberger DR.* Anxiety at the frontier of molecular medicine. *N Engl J Med* 2001; 344(16): 1247–9.

Rad je primljen 3. IV 2003. god.