

Irena Mlakar

**DJELOVANJE LITIJA U BIPOLARNOM  
POREMEĆAJU**

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2011.

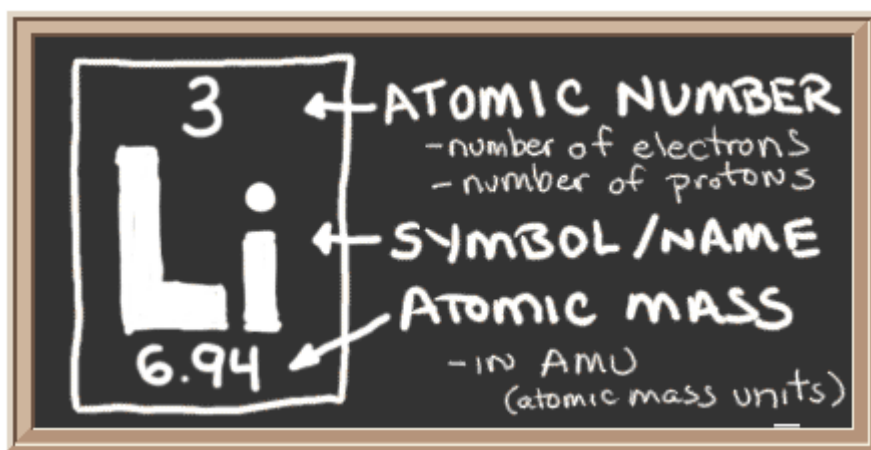
|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD.....                                             | 2  |
| 1.1 LITIJ KAO KEMIJSKI ELEMENT.....                      | 3  |
| 1.2 OTKRÍČE LITIJA.....                                  | 4  |
| 1.3 LITIJ U MEDICINI.....                                | 5  |
| 1.4 BIPOLARNI AFEKTIVNI POREMEĆAJ.....                   | 6  |
| 1.5 NEUROTRANSMITERI I SIGNALNI PUTOVI.....              | 12 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME.....                                | 17 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....                              | 19 |
| 3.1 PRAĆENJE TERAPIJE.....                               | 20 |
| 3.2 SPEKTROMERIJSKE METODE.....                          | 20 |
| 3.2.1 PLAMENA SPEKTROMETRIJA.....                        | 21 |
| 3.2.2 ATOMSKA APSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA.....           | 22 |
| 3.3 ION SELEKTIVNE ELEKTRODE.....                        | 24 |
| 3.3.1 TIPOVI ION SELEKTIVNIH ELEKTRODA.....              | 25 |
| 3.4 KOLORIMETRIJA.....                                   | 26 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVE.....                             | 28 |
| 4.1 APOPTOZA.....                                        | 29 |
| 4.2 MEHANIZAM APOPTOZE.....                              | 30 |
| 4.3 NEUROANATOMSKE PROMJENE U BIPOLARNOM POREMEĆAJU..... | 32 |
| 4.4 LIJEČENJE BIPOLARNOG POREMEĆAJA.....                 | 33 |
| 4.5 LITIJ U LIJEČENJU BIPOLARNOG POREMEĆAJA.....         | 34 |
| 4.6 FARMAKOKINETIKA I TOKSIČNOST LITIJA.....             | 34 |
| 4.7 MEHANIZAM DJELOVANJA LITIJA.....                     | 36 |
| 4.8 ISPITIVANJA UTJECAJA LITIJA NA APOPTOZU.....         | 39 |
| 5. ZAKLJUČAK.....                                        | 44 |

# UVOD

## LITIJ KAO KEMIJSKI ELEMENT

Litij (eng. Lithium) je metal atomskog broja 3 i atomske težine 6,94 g/mol; u periodnom sustavu elemenata ga nalazimo u 1. (IA) alkalnoj grupi metala i 2. periodi.

Neki osnovni podaci (karakteristike) ovog elementa : ionijski radijus 78 pm, atomski radijus 152 pm, kovalentni radijus 123 pm, temperatura tališta 180,54 C (453,69 K), temperatura vrelišta 1342 C (1615 K). Kao i svi alkalni metali, i litij posjeduje jedan valentni elektron u valentnoj ljusci kojeg lako otpušta (oksidira se) formirajući pritom kation. Zbog toga se smatra dobrim vodičem topline i struje, ali i elementom visoke reaktivnosti iako je najmanje reaktivan od ostalih alkalnih metala.



Karakteristično je da posjeduje malu gustoću od 0,534 g/cm<sup>3</sup> (samo radi usporedbe: gustoće vode je 1000 g/cm<sup>3</sup>).

Litij je mekani metal srebrnkaste boje koji se lako reže nožem nakon čega brzo oksidira zbog čega mijenja boju u sivkastu

U Zemljinoj kori litij čini 0,005 % što ga svrstava u prvih 15 najzastupljenijih elemenata Zemlje. Rude u kojima ga nalazimo su petalit, lepidolit i spodumen . Također ga

sadržava i slana voda ; naime , isparavanjem slane vode preostaju otopljene krutine koje uključuju natrijev klorid , kalijev klorid i litijev klorid.

U prirodi postoje dva stabilna izotopa litija : litij-6 (7,42%) i litij-7 (92,58%). Osim stabilnih, otkriveno je i sedam radioaktivnih izotopa litija od kojih su najstabilniji litij-8 sa poluvremenom raspada od 838 ms i litij-9 s poluvremenom raspada od 178 ms. Ostali radioaktivni izotopi imaju poluvrijeme raspada kraće od 8,6 ms. Metoda koja se koristi za separaciju litijevih izotopa poznata je kao laserska separacija izotopa.



**LITIJ NA VLAŽNOM ZRAKU POTAMNI**

## **OTKRIĆE LITIJA**

Petalit ( $\text{LiAlSi}_4\text{O}_{10}$ ) je ruda otkrivena 1800. godine od strane brazilskog kemičara Jose Bonifacio de Andrada e Silva, no znanstvenik kome možemo zahvaliti na otkrivanju novog kemijskog elementa litija je Johan August Arfwedson; naime on je 1817. godine u petalitu otkrio prisutnost tada nepoznatog elementa kojem je potom Jons Jakob Berzelius dodijelio ime «lithos» što prevedeno sa grčkog znači «kamen»; naime, na taj način je htio u imenu zadržati podrijetlo samog litija (ruda, kamen).

No, za izolaciju čistog litija iz njegovih soli nije zaslužan Arfwedson već William Thomas Brande kojem je to pošlo za rukom 1821. godine elektrolizom litijevog oksida. 1855. godine su Robert Bunsen i Augustus Matthiessen uspjeli dobiti veće količine litija elektrolizom litijeva klorida. Otkriće ovog postupka omogućilo je komercijalnu proizvodnju ovog elementa koja je započela 1923. godine u Njemačkoj.

Prva važna primjena litija u povijesti bila je u 2. svjetskom ratu; legure litija i aluminija sa dodacima magnezija izrađene su za potrebe zrakoplovne industrije jer su, pored male gustoće imale vrlo dobra mehanička svojstva i na povišenim temperaturama (posebno čvrstoću).

## **LITIJ U MEDICINI**

1843. godine Alexander Ure uvodi litij u medicinu kao lijek za liječenje urične dijateze tj. gihta (ili ulozi je bolest u kojoj se mokraćna kiselina, koja je razgradni produkt purina, nakuplja u zglobovima kao kristalići, događa se kod povećane sinteze purina tj. primarna hiperuricemija). Litijev urat je najlakše topljiva sol mokraćne kiseline stoga se smatralo kako će dovesti do povećanja ekskrecije mokraćne kiseline te na taj način ublažiti simptome gihta (bol, crvenilo, toplina, natečeni zglobovi, kvрге pod kožom oko zglobova, hipertenzija). U JAMA (Journal of the American Medical Association) je 1880-tih godina objavljen članak prema kojem se smanjuje kristalizacija mokraćne kiseline ako se u otopinu koja sadrži mokraćnu kiselinu doda litij. Osim urata, u 'Britanskoj farmakopeji' iz 1885. godine spomenute su i karbonatne i citratne soli. Brojni znanstvenici bavili su se istraživanjem ovog lijeka. Već 1886. godine Carl Lange, u Danskoj, opisuje prve rezultate uspješnosti liječenja depresija litijem, a 1894. godine njegov brat Fritz opisuje prve rezultate liječenja litijem akutnih depresivnih bolesnika.

Početkom 20. stoljeća litij postaje lijek široke primjene, 'lijek za sve', pa se čak počinje stavljati u pića. Tridesetih godina 20. stoljeća počinju i prva testiranja litijevih soli u liječenju arterijske hipertenzije, a litijeve soli počinju se koristiti kao nadomjestak za natrijev klorid (kuhinjsku sol). No, 1949. godine otkriveni su prvi smrtni slučajevi koji su bili posljedica izrazito toksičnog učinka litija pa se stoga litij odlukom 'komisije za hranu i lijekove' (engl. Food and Drug Administration, FDA) povlači s tržišta Sjedinjenih Američkih Država i zabranjuje svaka njegova uporaba kod ljudi. Već početkom 20. stoljeća su se znanstvenici bavili toksičnim učincima litija (slabost, dijareja, anoreksija, oligurija, poliurija, mišićna slabost), a neki od njih su Clarence A. Good (koji je 1903. izdao 'An experimental study of lithium') i S.A. Cleaveland (1913. izdao 'A case of poisoning by lithium').

Istodobno sa zabranjenjem primjene litija u SAD-u, u Australiji Jon Cade ponovno, nakon već zaboravljenog povoljnog učinka litija u poremećajima raspoloženja, daje litij maničnim bolesnicima rezistentnim na dotadašnju terapiju sa izuzetnim terapijskim uspjehom, ali nažalost ne zadugo jer su nakon nekoliko mjeseci liječenja litijem zbog toksičnih učinaka litija i njegovi bolesnici umrli. Tek šezdesetih godina 20. stoljeća litij ponovno postepeno 'ulazi na mala vrata' u psihijatriju, no ovaj put uz redovne kontrole razine litija u tjelesnim tekućinama i regulaciju doze prema nalazu koncentracije litija u serumu. 1974. godine litijeve soli ponovno su registrirane od strane FDA kao lijek za liječenje poremećaja raspoloženja.

### **BIPOLARNI AFEKTIVNI POREMEĆAJ (manična depresija)**

Bipolarni poremećaj je bolest poremećaja raspoloženja čije je osnovno obilježje dramatična izmjena raspoloženja. Raspoloženje se može mijenjati prema nižem – depresivnijem i prema višem – euforičnom, tj. maničnom. Pritom je važno razlikovati normalne promjene raspoloženja koje su uzrokovane svakodnevnim životnim prilikama od onih koje su psihopatološke. Dakle, oscilacije raspoloženja koje po svojoj jačini, trajanju i nemogućnosti da ih osoba kontrolira odstupaju od svakodnevnih 'životnih' promjena raspoloženja klasificiramo kao poremećaj raspoloženja.

Čimbenici koji sudjeluju u nastanku ovog poremećaja raspoloženja dijele se na biološke, socijalne i psihološke. Sukladno tome se i metode liječenja dijele na biološke,

socijalne i psihološke metode , a biološke (tu se podrazumijevaju psihofarmakološke tj. litij) su metode prvog izbora.

Čimbenici koji su danas najviše istraženi i koji daju najviše odgovora o uzrocima poremećaja raspoloženja su biološki čimbenici. Najčešće se dijele na genetske, neuroendokrine, neurokemijske, neuroatomske i one povezane sa spavanjem.

### **GENETSKI ČIMBENICI**

Brojna istraživanja su pokazala da su ovi čimbenici od velikog značaja. Treba napomenuti da se poremećaji raspoloženja ne nasljeđuju dominantno ili recesivno nego je najvjerojatnije riječ o poligenskim bolestima što znači da nastanku bolesti doprinosi više različitih gena. Geni koji se najčešće spominju su oni na kromosomima 5, 11 i X.

U današnje vrijeme posebno su pod 'povećalom' neuroznanstvenika polimorfizmi gena za serotoninске receptore i transportere te polimorfizmi gena za dopaminske receptore i transportere.

Ova bolest je nažalost visoko nasljedna. Bipolarni poremećaj se javlja kod 25% djece ako je bolestan jedan od roditelja. Ukoliko oba roditelja pate od ovog poremećaja raspoloženja povećana je vjerojatnost da će i dijete oboljeti, a iznosi 50-70%. Rizik za jednojajčane blizance iznosi čak 90%.

Za depresivne poremećaje postoci su ipak niži, na primjer ako jednojajčani blizanac boluje od depresivnog poremećaja vjerojatnost da će drugi jednojajčani blizanac također oboljeti je oko 50% ; a ako je samo jedan roditelj bolestan vjerojatnost je 10%-tna da će i dijete biti bolesno.

### **NEUROENDOKRINI ČIMBENICI**

Endokrini sustav je glavninom reguliran kroz os hipotalamus-hipofiza-ciljana žlijezda. Iz te povezanosti endokrinog i živčanog sustava lako je zaključiti da nam hormoni mogu poslužiti kao periferni pokazatelji neurokemijske funkcije mozga. Tako su hipofizarni hormoni pod utjecajem prvenstveno monoaminergičnih neurona. Drugim riječima, lučenje hormona hipofize nadgledaju serotonin, dopamin i noradrenalin.

Kod bolesnika sa depresivnim poremećajem zanimljiva je os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, a deksametazonski surpresijski test jedan je od najpouzdanijih pokazatelja psihičkih bolesti. To je test koji kod prekomjernog lučenja kortizola ispituje da li se radi o primarnom poremećaju (poremećaj u samoj žlijezdi, npr. prekomjerno lučenje hormona kod tumora žlijezde) ili sekundarnom poremećaju (poremećaj u

kontrolnom mehanizmu lučenja hormona, tj. poremećaj mehanizma kontrole negativne povratne sprege). Test se izvodi tako da se bolesniku daje preparat (deksametazon) koji inhibira lučenje kortikotropina, a time i kortizola. Zatim se mjeri koncentracija hormona. Ako se nakon davanja deksametazona smanji lučenje kortizola ili izlučivanje njegovih metabolita mokraćom, to pokazuje da je kontrolni mehanizam djelatan, a ako takav učinak izostane, to pokazuje da je poremećen kontrolni mehanizam hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Oko 50% bolesnika s depresijom su nesupresori na deksametazonskom testu, tj. unatoč davanju surpresora i dalje će se lučiti prekomjerne količine hormona kortizola dok će vrijednosti adrenokortikotropnih hormona biti snižene.

Također gotovo svaki bolesnik s poremećajem štitne žlijezde ima i neki simptom poremećenog raspoloženja. Slobodni hormoni T3 (trijodtironin) i T4 (tiroksin) povišeni su kod bolesnika s poremećajem raspoloženja. Ipak, za razliku od deksametazonskog testa, TRH test (engl. thyrotropin-releasing hormone test, TRHt) nije toliko specifičan u bolesnika sa depresijom.

## **POREMEĆAJI SPAVANJA**

I kod maničnog i kod depresivnog poremećaja raspoloženja poremećen san je jedan od najznačajnijih tjelesnih simptoma. Tako su u tijekom spavanja posebno izražene elektroencefalografske (EEG je metoda koja mjeri električne aktivnosti mozga) abnormalnosti kod ovakvih bolesnika kao što je dužina NREM (engl. non rapid eye movement-nema sna) i REM (engl. rapid eye movement-nastupa san) faze. Kod osoba oboljelih od depresije EEG pokazuje skraćene i rjeđe REM faze.

## **NEUROTRANSMITERI**

Neurotransmiteri su kemijske tvari koje izlučuju živčane stanice (neuroni) na svojim završecima, a služe za prijenos informacija sljedećoj, susjednoj stanici. Jednostavnije rečeno, to su 'riječi' kojima 'razgovaraju' neuroni. Mjesto na kojem dolazi do prijenosa informacija (neurotransmitora) između dva neurona zove se sinapsa. Ona se sastoji od presinaptičkog djela (akson je dugi nastavak živčane stanice na čijem kraju se nalaze sinaptički mjehurići ispunjeni neurotransmiterima), sinaptičke pukotine i postsinaptičkog djela (dendriti su kraći nastavci neurona odgovorni za primanje informacije). Neurotransmiteri se oslobađaju iz sinaptičkih mjehurića na presinaptičkoj

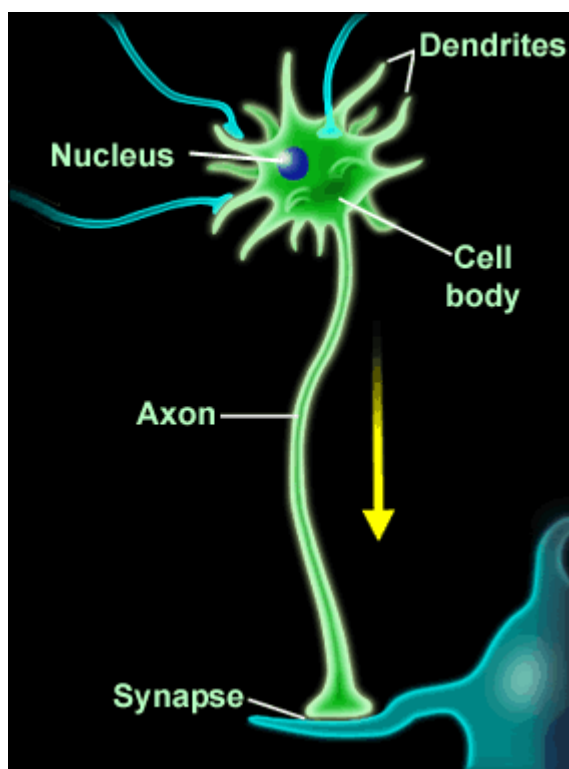
membrani, prelaze u pukotinu i preko nje dolaze do postsinaptičke membrane susjednog neurona. Na taj način neuroni međusobno komuniciraju.

S obzirom na način na koji će djelovati na susjedni neuron, neurotransmitere djelimo na:

- ekscitatorne – glutamat je osnovni i sveprisutni ekscitacijski neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu koji djeluje preko kainatnih receptora (kainat je tvar izolirana iz morske trave) i NMDA receptora (N-metil-D-aspartat). To su receptori koji reguliraju ionske kanale, tako su kanali kontrolirani putem NMDA receptora visoko propusni za  $\text{Ca}^{2+}$ , a blokiraju utok  $\text{Mg}^{2+}$ . Osim glutamata među ekscitatorne neurotransmitere spadaju i aspartat, a moguće i homocisteat (on je zasad upitan).
- inhibitorne - GABA (gama-aminomaslačna kiselina, engl. gamma-aminobutyric acid) je najvažniji inhibitorni neurotransmiter. Nalazimo je poglavito u mozgu osobito u nigrostratinalnom sustavu, a vrlo malo u perifernim tkivima. GABA nastaje iz glutamata djelovanjem enzima dekarboksilaza glutaminske kiseline koji je prisutan isključivo u neuronima mozga koji sintetiziraju GABA-u. Poput glutamata i GABA djeluje na dvije različite vrste receptora: GABA<sub>A</sub> receptore (smješteni postsinaptički; vezani za kloridne kanale čije otvaranje uzrokuje smanjenje ekscitabilnosti stanice, tj. djeluje inhibitorno; ciljna su mjesta benzodiazepina, barbiturata...) i GABA<sub>B</sub> receptore (smješteni su presinaptički i postsinaptički; vezani su za G proteine; presinaptički djeluju tako da smanjuju oslobađanje neurotransmitera inhibicijom kalcijevih kanala, a postsinaptičku podražljivost smanjuju otvaranjem kalijevih kanala; navedena djelovanja posljedica su inhibicije adenilat ciklaze). Osim GABA-e, među inhibitorne neurotransmitere svrstavamo i glicin koji je zastupljen u kralješničnoj moždini i moždanom deblu; on djeluje na vlastite receptore koji su strukturno i funkcijski slični GABA<sub>A</sub> receptorima.
- neuromodulatorne – oni su ujedno monoaminergički (dopamin, serotonin, noradrenalin, adrenalin) i kolinergični (acetilkolin). Ovi neuromodulatorni neurotransmiteri mogu u danom trenutku biti i ekscitatorni i inhibitorni, ovisno o tome koliko kako su stimulirani od strane glutamata. Što znači da u poremećajima raspoloženja smanjenje ili povišenje (ili njihovo pojačano ili smanjeno djelovanje) monoamina može zaista imati za posljedicu poboljšanje ili pogoršanje raspoloženja, ali njihova razina prvenstveno ovisi o koncentraciji i

ekscitatornom djelovanju glutamata preko NMDA receptora ili inhibitornom djelovanju GABA-e. Neuromodulatorni neurotransmiteri ostvaruju svoj učinak vezanjem za stanični receptor koji je pak povezan s G proteinom (protein koji veže GTP) , a on aktivira enzime drugog glasnika : vezanjem neurotransmitora na receptor GDP na G proteinu zamjenjuje se GTP-om i nastaje aktivirani kompleks G protein-GTP koji se povezuje adenilat ciklazom koja pretvara ATP u cAMP; cAMP je drugi glasnik koji aktivira u stanici skupinu enzima cAMP-ovisne protein kinaze koje fosforiliraju stanične proteine, među njima i druge enzime, te ih tako aktiviraju ili inaktiviraju .

Glutamat i GABA djeluju trenutačno, dok se monoaminergični učinak može očekivati i u dužem vremenskom razdoblju.



GRADA NEURONA

Glavna teorija o nastanku depresije je monoaminska hipoteza koju je predložio američki psihijatar profesor Joseph Schildkraut u svome radu 'Kateholaminska

hipoteza afektivnih poremećaja' objavljenom 1965. godine u časopisu 'American Journal of Psychiatry'. On je poremećaje raspoloženja doveo u vezu sa smanjenjem monoamina (serotonin, dopamin, noradrenalin) u slučaju depresije ili povišenjem navedenih neurotransmitera u slučaju manije. Teorija je bazirana na sposobnosti poznatih antidepresiva (tricikličkih i inhibitora MAO monoaminooksidaze) da pospješuju monoaminergičnu transmisiju, te na sposobnosti lijekova, kao što je rezerpin (blokira transmisiju noradrenalina), da izazove depresiju. Istraživanja su, u nekim slučajevima, potvrdila ovu teoriju, dok su se rezultati nekih drugih studija pokazali kontradiktorni.

Dakle, biokemijska ispitivanja oboljelih od depresije ne podupiru posve jasno monoaminsku hipotezu u njezinoj najjednostavnijoj formi.

Iako ova Schildkrautova teorija nije dovoljna za potpuno objašnjenje promjena u depresiji, farmakološka manipulacija monoaminergičnom neurotransmisijom i dalje ostaje najuspješniji terapijski pristup.

Kod poremećaja raspoloženja istraživali su se navedeni neurotransmiteri u moždanom tkivu, cerebrospinalnoj tekućini, plazmi ili mokraći bolesnika. Također su se istraživali i metaboliti monoamina kao 5-hidroksiindolactena kiselina (5-HIAA), 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol (MHPG). Međutim, teško je bez dobre provjere prihvatiti hipotezu o jednom neurotransmitterskom sustavu. Naime, postoje važni dokazi koji upućuju na zaključak da Schildkrautova monoaminska teorija u osnovi stoji, ali ipak postoje neka odstupanja od kojih su najočitija sljedeća :

- niti amfetamin, a niti kokain, iako povećavaju monoaminergičnu transmisiju, nemaju antidepresivne učinke
- neki klinički učinkoviti antidepresivi nemaju učinke koji bi mogli povećati monoaminsku neurotransmisiju
- biokemijske promjene povezane s depresijom su u nekoliko istraživanja bile identične promjenama u bolesnika oboljelih od manije

S druge strane, djelovanje neurotransmitera ovisi i o broju njihovih receptora. Koncentracije neurotransmitera ili njihovih metabolita mogu biti u granicama normale, no ukoliko postoji manjak ili višak receptora za neurotransmitere njihovo djelovanje će se pokazati kao smanjeno ili povećano. Upravo na tome se temelje novija istraživanja djelovanja antidepresiva prema kojima se njihov terapijski učinak na kraju krajeva ostvaruje utišavanjem monoaminskih receptora.

Dakle, psihijatrijski se poremećaji događaju zbog promjena neurotransmitera i njihovih receptora, no čitava 'priča' nije baš tako jednostavna. Naime, konačni rezultat djelovanja neurotransmitera ostvaruje se tek aktivacijom ili inhibicijom drugih glasnika koji naposljetku mijenjaju ekspresiju gena, a time i fenotip. O tome govorimo u nastavku.

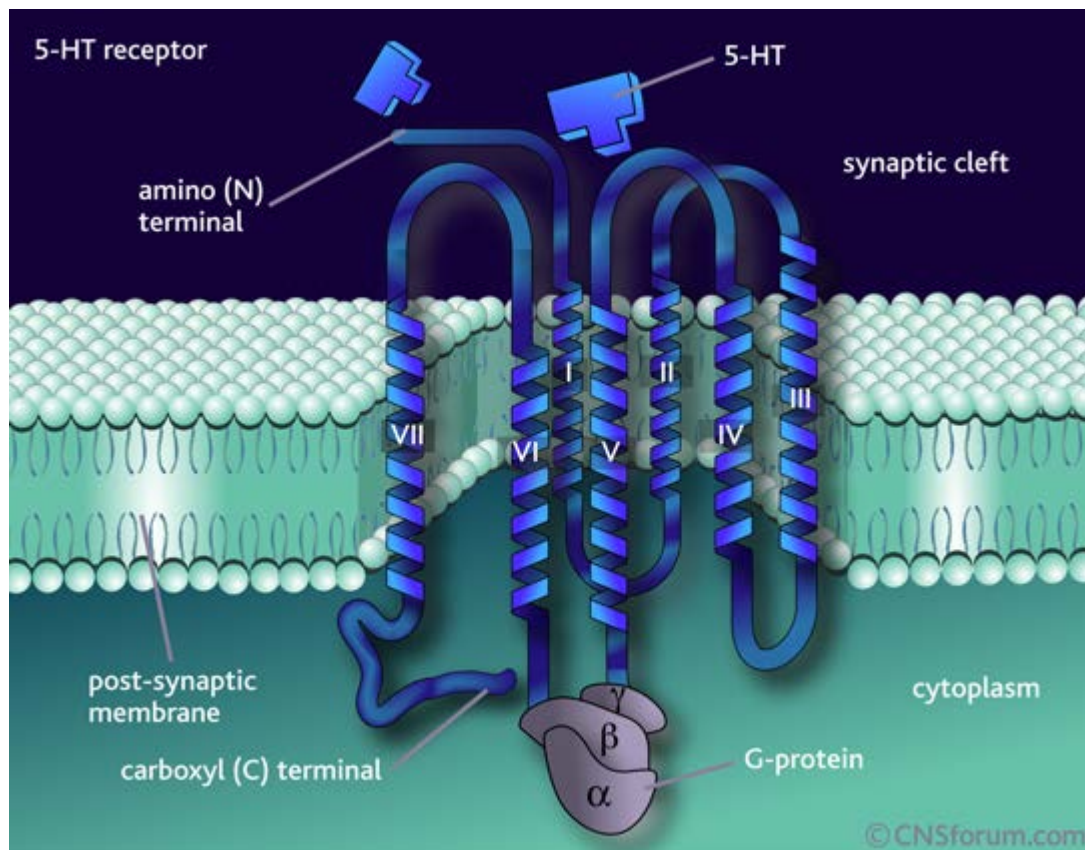
## **NEUROTRANSMITERI I SIGNALNI PUTEVI**

Sve stanice primaju signale i odgovaraju na signale iz svoga okoliša. Signaliziranje se može odvijati putem izravnog dodira dviju stanica i putem izlučenih signalnih molekula. Kod ovog potonjeg načina razlikujemo :

- endokrino signaliziranje – specijalizirane endokrine stanice (stanice žlijezda) izlučuju signalne molekule (hormone) koje se prenose cirkulacijom kako bi stigle do ciljne stanice koja se nalazi na udaljenim mjestima u tijelu (npr. estrogen)
- autokrino signaliziranje – stanica stvara signalnu molekulu koja djeluje na tu istu stanicu (npr. faktori rasta)
- parakrino signaliziranje – stanica otpušta molekulu koja djeluje lokalno na susjedne ciljne stanice (npr. neurotransmiteri)

Neurotransmiteri prenose signale između živčanih stanica ili od živčanih stanica do drugih vrsta ciljnih stanica (kao što su mišićne stanice). Signal za otpuštanje neurotransmitera je pristizanje akcijskog potencijala na živčani završetak. Neurotransmiteri potom difundiraju kroz sinaptičku pukotinu i vežu se za receptore na

površini ciljnih stanica. Budući da su neurotransmiteri hidrofilne molekule pa stoga ne mogu proći kroz staničnu membranu, oni se, za razliku od nekih drugih signalnih molekula koje su hidrofobne, neće vezati za unutarstanične receptore susjednih stanica već za one površinske.



### RECEPTOR VEZAN ZA G – PROTEIN

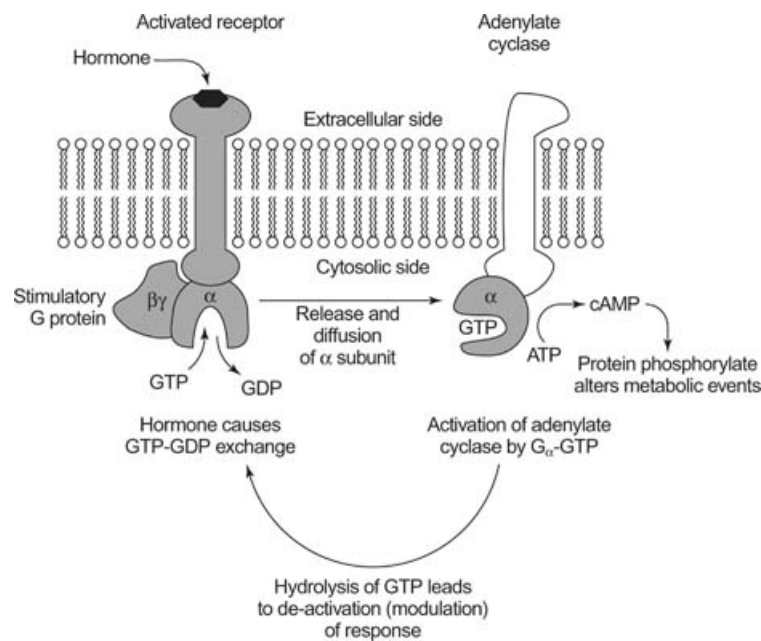
Najveća porodica receptora na površini stanice prenosi signale do unutarstaničnih ciljeva (drugih glasnika ili ionskih kanala) posredstvom proteina koji vežu gvanin-nukleotid nazvanih G-proteinima. Većina tih receptora stimuliraju sustav adenilat-ciklaze ili fosfolipaze C. Identificirano je više od tisuću receptora povezanih s G-proteinima, uključujući i receptore za mnoge neurotransmitere. Receptori su građeni od sedam membranskih alfa uzvojnica koje prolaze kroz membranu. Vezanje neurotransmitera za izvanstaničnu domenu receptora uzrokuje konformacijsku

promjenu receptora. Na taj način je omogućeno vezanje kompleksa neurotransmiter-receptor za G-protein preko citoplazmatske domene receptora. Potom dolazi do disocijacije gvanin-difosfata (GDP) s G-proteina i njegove zamjene s gvanin-trifosfatom (GTP). Takav aktivirani G-protein se zatim povezuje sa adenilat-ciklazom ili fosfolipazom C prilikom čega se aktiviraju drugi glasnici (neurotransmiteri se smatraju prvim glasnicima) :

- adenilat ciklaza – katalizira pretvorbu adenozin-trifosfata (ATP) u ciklički adenozin-monofosfat (cAMP). cAMP je drugi glasnik koji u stanici aktivira enzim cAMP-ovisna protein-kinaza tako da se veže za regulacijske podjedinice enzima i odvaja ih od katalitičkih podjedinica. Slobodne katalitičke jedinice su tada slobodne i enzimski aktivne, te mogu fosforilirati serinske ostatke na ciljnim proteinima i tako ih aktivirati ili inhibirati.
- fosfolipaza C – katalizira hidrolizu membranskog fosfatidil-inozitol-4,5-bifosfata (PIP<sub>2</sub>) kojom nastaju drugi glasnici diacil-glicerol (DAG) i **inozitol**-1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) koji pobuđuju dvije kaskade unutarstaničnog signaliziranja :
  - diacil-glicerol aktivira o kalciju ovisnu protein-kinazu koja potom aktivira druge unutarstanične ciljeve uključujući i transkripcijske faktore te na taj način dovodi do promjena u genskoj ekspresiji i stimulacije stanične proliferacije.
  - Inozitol-1,4,5-trifosfat je mali polarni drugi glasnik koji se otpušta u citosol gdje djeluje tako da potiče otpuštanje kalcijevih iona iz unutarstaničnih spremišta kao što je endoplazmatski retikulum (IP<sub>3</sub> se veže za receptor koji je Ca<sup>2+</sup> kanal reguliran ligandom smješten u membrani endoplazmatskog retikuluma, te omogućuje istjecanje kalcijevih iona u citosol)

Neurotransmisija i njeni učinci ne završavaju oslobađanjem neurotransmitera, njihovim vezanjem na receptore i aktivacijom drugog glasnika. Aktiviran sustav drugog glasnika u konačnici aktivira transkripcijske faktore. To su specifični proteini koji su potrebni RNA-polimerazi (enzim koji katalizira sintezu RNA, odnosno transkripciju gena) za započinjanje transkripcije. Transkripcijski faktori specifični za gene vežu se na slijedove DNA koji kontroliraju ekspresiju određenih gena pa su na taj način odgovorni za gensku ekspresiju. Transkripcijom nastaje ribonukleinska kiselina (RNK) i ,

konačno, procesom translacije stvara se ciljani protein (enzim, receptor, transportni protein, transkripcijski faktor i sl.). Krajnja posljedica neurotransmisije nakon regulacije genske ekspresije i sinteze proteina je preoblikovanje funkcije i morfologije neurona. Te promjene uključuju ojačavanje ili uništavanje sinapsi i dendrita te skraćivanje ili produženje aksona, a ponekad i poticanje stanice na smrt.



Nakon aktivacije transkripcijskih faktora, prvi geni koji se aktiviraju su c-Fos i c-Jun . Oni su geni ranog odgovora (engl. immediate early gene) što znači da njihova transkripcija započinje neposredno nakon stimulacije stanice tj. nakon aktivacije drugog glasnika neurotransmitterom c-Fos i c-Jun su aktivni nakon 15 minuta, a djeluju do jednog sata. Produkti ovih gena su Fos i Jun proteini koji zajedno aktiviraju ili onemogućuju aktivaciju gena kasnog odgovora (djeluju kao transkripcijski faktori).

Geni kasnog odgovora su zapravo specifični geni koji reguliraju specifični odgovor stanice na podražaj. Iz navedenog lako je zaključiti da je cjelokupan živčani sustav vrlo prilagodljiv i podložan promjenama pod utjecajem vanjskih i unutrašnjih promjena, drugim riječima 'plastičan' je i u biokemijskom i u morfološkom smislu. Tijekom čitavog životnog vijeka mijenja se broj dendrita i sinapsi, aksoni se produžuju ili

skraćuju. Ove promjene se događaju sve do nekroze ili apoptoze neurona pod utjecajem neurotransmitera (posebice glutamata) ili djelovanjem hormona (glukokortikoida pod djelovanjem stresa).

Rezultati istraživanja sustava drugog glasnika u bolesnika s poremećajem raspoloženja pokazala su promjene u tom sustavu.



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ispitivanje molekularnog djelovanja litija je započelo tek posljednjih godina. Tim istraživanjima pokušavaju se pojasniti dugotrajni učinci litija, te povezati početne biokemijske promjene koje on izaziva s promjenama raspoloženja u pacijenata koji su na terapiji litijem. Naravno, ta povezanost je omogućena preko kaskadnih reakcija signalnih putova koji je izrazito složen pa stoga postoje mnoge pretpostavke na ovu temu koje su još u postupku dokazivanja. No jedna od mogućih veza između djelovanja litija i stabilizacije raspoloženja je, između ostalih, i sprječavanje indukcija apoptoze u glijalnim i neuronalnim stanicama. Upravo na to je ovaj pregledni rad fokusiran na kao jedan od mogućih patofizioloških mehanizama u pozadini poremećaja raspoloženja.

U istraživačkim radovima koji su ispitivali mogući antiapoptotski učinak litija na apoptozu izazvanu različitim stimulusima, pratila se ekspresija tri ili četiri apoptotska gena : bcl-2, p53, kaspaze-3, i bax. Ipak, kada uzmemo u obzir kompleksnost čitavog procesa apoptoze, pretpostavlja se da postoje i drugi geni koji sudjeluju u toj programiranoj staničnoj smrti na čiju bi ekspresiju litij mogao djelovati. Stoga, još mnogo toga je neistraženo u 'polju litija' te su potrebna daljnja istraživanja kojima bi se dosadašnji zaključci iz in vitro istraživanja dokazala i in vivo metodama.



## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. PRAĆENJE TERAPIJE**

Terapije određenim lijekovima potrebno je individualizirati praćenjem njihove koncentracije u krvi odnosno serumu. Razlozi zbog kojih se prati koncentracija tih lijekova su brojne nuspojave, toksičnost, interakcije, uski terapijski interval, fenotipske razlike. Jedan od lijekova čiju je koncentraciju u serumu potrebno pratiti je i litij. On se daje peroralno u obliku litijeva karbonata. Brzo se i potpuno apsorbira iz probavnog trakta i već nakon 2-4 sata doseže maksimalnu koncentraciju u krvi. Ne veže se na proteine što znači da je sav farmakološki aktivan. Litij ima vrlo uski terapijski interval od 0,6 do 1,2 mmol/L, stoga već kod koncentracije od 1,5 mmol/L može uzrokovati teške toksične poremećaje (nefrotoksičnost, kardiovaskularni poremećaji te hormonalna disfunkcija posebice hormona štitnjače). Simptomi otrovanja su : apatija, pospanost, tromost, tremor, letargija, grčevito trzanje, slabost mišića, ataksija i teškoće u govoru. Zbog navedenih razloga potrebno je uvijek pratiti postignutu koncentraciju litija u krvi. Uzorak se uzima 12 sati nakon doze.

Metode kojima se određuje koncentracija litija u serumu, plazmi ili urinu su : spektrometrijske metode (plamena fotometrija i atomska apsorpcijska spektrofotometrija), ion selektivne elektrode te kolorimetrija.

### **3.2. SPEKTROMETRIJSKE METODE**

To su analitičke metode kojim nam omogućuju dobivanje informacija o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu uzoraka koje analiziramo. Spektrometrijske metode se baziraju na interakciji uzorka i energije, a kao posljedicu te interakcije mjeri se elektromagnetsko zračenje ili zračenje raznih čestica (elektrona, protona, iona). Ove metode razlikujemo na temelju nekoliko parametara, npr. ovisno o nivou na kojem se događa interakcija (atomske i molekulske spektrometrije), ovisno o energiji koja stupa u interakciju s uzorkom (toplinska, kemijska, električna ili zračenje čestica), ovisno o

posljedicama interakcije (apsorpcijske i emisijske spektrometrije) i zračenju koje mjerimo nakon interakcije (zračenje čestica, toplinsko zračenje).

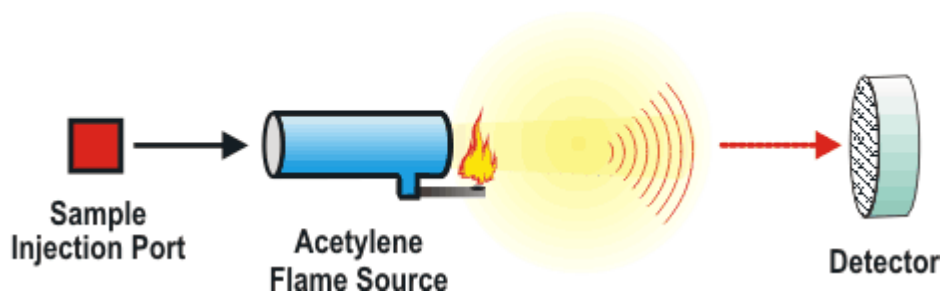
### **3.2.1. PLAMENA SPEKTROMETRIJA (spektrofotometrija, fotometrija)**

Plamena spektrometrija je atomska emisijska metoda za rutinsko određivanje metalnih soli, poglavito metala prve i druge skupine periodnog sustava, dakle uključujući i soli litija. Kvantitativno određivanje tih iona provodi se mjerenjem emisije iz plamena otopina koje sadrže litij (emisija u UV/VIS području elektromagnetnog zračenja).

Kao što sam naziv metode kaže, kao izvor energije ovdje nam služi plamen. Otopine se nasisavaju na plamen koji uzrokuje isparavanje otapala, atomizaciju metala i pobuđivanje valentnih elektrona koji pritom prelaze na viši energentski nivo. U ovom pobuđenom stanju elektroni su nestabilni zbog čega se vraćaju u svoje prethodno, osnovno energetska stanje pritom emitirajući višak energije u obliku zračenja određene valne duljine. Pod konstantnim i kontroliranim laboratorijskim uvjetima intenzitet nastalog zračenja karakteristične valne duljine određenog atoma direktno je proporcionalan broju atoma koji emitiraju to zračenje što je nadalje direktno proporcionalno koncentraciji analita od našeg interesa u datom uzorku.

Alkalijski metali se lako ekscitiraju običnim laboratorijskim plamenikom pri čemu je boja plamena karakteristična za metal koji je prisutan kao kation u otopini. Plamen je usijani plin obojan uslijed emisije vidljive svjetlosti različitih valnih duljina od strane različitih atoma, molekula (e škola kemija sprektroskopija)... Litij pritom boji plamen crveno.

Temperatura plamena varira ovisno o smjesi plina koji sagorijeva. Smjese plinova mogu uključivati acetilen i kisik (kao oksidans) sa najvišom temperaturom sagorijevanja od 3110 °C , te kombinacije prirodnog plina , propana ili vodika sa kisikom ili zrakom kao oksidansima.



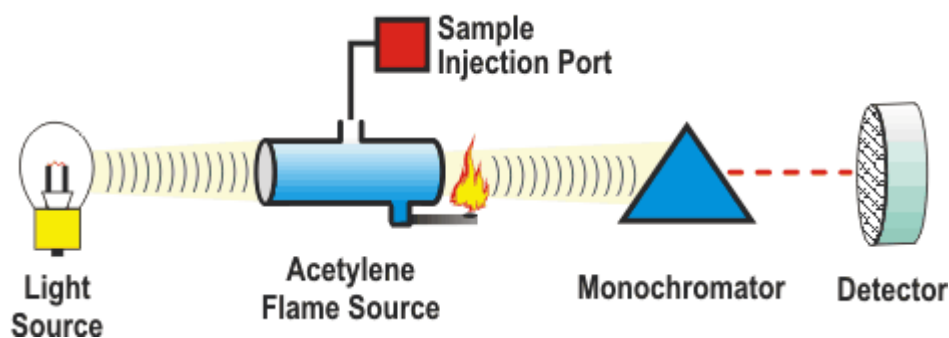
<http://www.etslabs.com/images/methods/7.gif>

### 3.2.2. ATOMSKA APSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA (AAS)

To je analitička metoda koja nam daje informacije o atomima neovisno o molekulskom obliku u kojem se nalaze u ispitivanom uzorku. Atomska apsorpcijska spektrometrija mjeri apsorpciju elektromagnetskog zračenja VIS ili UV područja koje apsorbiraju atomi. Mjeri se razlika intenziteta (smanjenje intenziteta) ulazne i izlazne zrake prije i poslije prolaska kroz atomizirani uzorak. Zraka pogodne valne duljine prolazi kroz oblak atoma koji pritom apsorbira jedan dio energije te ulazne zrake (samo nepobuđeni atomi apsorbiraju dio zračenja) što rezultira pobuđivanjem valentnih elektrona i njihovim prelaskom na više energetske razine. Dio zračenja koje je apsorbirano izravno je proporcionalno broju atoma u oblaku, stoga na ovaj način možemo kvantitativno odrediti sadržaj analita tj. atoma u oblaku atoma.

Komponente atomskog apsorpcijskog spektrofotometra :

- izvor zračenja (žarulja sa šupljom katodom) osigurava elektromagnetsko zračenje određenog, nepromijenjivog intenziteta koje se upućuje na atomizirani oblak analita.
- pretinac za uzorak
- plamenik služi kao izvor plamena (smjesa plina) koji je zaslužan za uklanjanje otapala iz otopine uzorka, razgradnju molekula i prevođenje uzorka u atomizirano stanje (ako nema plamena tada se uzorak uvodi u grafitnoj kiveti – elektrotermalna atomizacija).
- monokromator je optički sustav koji iz svjetlosti različitih valnih duljina izoliraju samo određen raspon valnih duljina koji može biti manji (2 nm) ili veći (20 nm) ovisno o kvaliteti monokromatora.
- detektor



<http://www.etslabs.com/images/methods/6.gif>

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija je osjetljiva, točna, precizna i visoko specifična metoda. Jedan od razloga za navedene prednosti je taj što ne zahtijeva ekscitaciju pa je automatski manje podložna varijacijama temperature plamena i prijenosu energije s jednog atoma na drugi od plamene fotometrije. Visoka specifičnost rezultat je izrazito uske propusnosti korištenog zračenja koje je selektivno apsorbirano od strane atoma. Problem predstavljaju jedino interferencije.

Interferencije u ovoj metodi mogu biti :

- kemijske kada plamen zbog preniske temperature ne može disocirati tj. razgraditi molekule na atome pa ne može doći do apsorpcije zračenja
- ionizacijske kada atomi u plamenu budu ekscitirani umjesto da budu samo disocirani; problem je jer pritom emitiraju zračenje valne duljine koja se mjeri
- interferencija matrice događa se kada je analit otopljen u organskom otapalu jer tada apsorbira 2-5 puta više energije nego kada je otopljen u vodenom otapalu

Razlika između plamene atomske emisijske spektrofotometrije (FAES) i plamene atomske apsorpcijske spektrofotometrije (FAAS) je ta da se kod FAAS energija ekscitacije dobiva u obliku zračenja, dok nam plamen služi za oslobađanje i neutraliziranje atoma u osnovnom energetsom stanju. Kod FAES je obrnuto, uzorak se plamenom atomizira i pobuđuje da bi emitirao karakteristično zračenje. Količina zračenja koja je apsorbirana ili emitirana razmjerna je broju pobuđenih atoma u uzorku, a on ovisi o temperaturi i sastavu plamena, pa je sustav uvijek nužno kalibrirati pomoću standardnih otopina.

Valne duljine litija:

- emisijska plamena spektrofotometrija : 670 nm
- atomska apsorpcijska plamena spektrofotometrija : 270,7 nm

### 3.3. ION SELEKTIVNE MEMBRANSKE ELEKTRODE

One omogućuju potenciometrijsko određivanje aktiviteta nekog iona u otopini u prisustvu drugih iona. To su elektrode koje se koriste u elektroanalitičkoj kemiji i čiji je potencijal ovisan o koncentraciji određene ionske vrste u otopini (Generalić, Eni. "Ion selektivne elektrode." *Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar*. 6 Apr. 2011. KTF-Split. 26 May 2011. <http://glossary.periodni.com>)

Određeni tipovi ion-selektivnih elektroda pokazuju visoki stupanj selektivnosti za određenu vrstu iona u otopini, tj. selektivno su propusne za određene anione ili katione. Upravo ta selektivnost uzrokuje nastanak membranskog potencijala. Dakle, ion-selektivna elektroda poprima različiti potencijal kao odgovor na aktivitet iona u otopini na koje je elektroda selektivna. Aktivitet je djelotvorna koncentracija neke tvari u otopinama elektrolita; jednak je koncentraciji tek u vrlo razrijeđenim otopinama (Generalić, Eni. "Aktivitet." *Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar*. 6 Apr. 2011. KTF-Split. 26 May 2011. <http://glossary.periodni.com> ).

Ion-selektivne membrane imaju osjetljivu membranu koja odvaja ispitivanu otopinu od unutrašnje referentne otopine. Ta tzv. elektrokemijska membrana stvara razliku potencijala između dviju otopina. Kada se elektroda uroni u ispitivanu otopinu, trenutno se uspostavi tok čestica unutar membrane u smjeru otopine koja ima niži aktivitet pokretnih čestica (difuzija). U ispitivanoj otopini, gdje je aktivitet kationa visok, kationi se vežu na površinu membrane što rezultira pozitivnim nabojem membrane. Pozitivno nabijanje membrane dovest će do disocijacije (otpuštanje) kationa sa membrane, ali s unutrašnje strane membrane, tj. kationi se otpuštaju u referentnu otopinu. Referentna otopina također postaje pozitivno nabijena. Taj proces prijenosa iona tj. mase i naboja traje dok se ne uspostavi ravnoteža, a ravnoteža nastupa kada razlika električnog

potencijala membrane bude istovjetna razlici aktiviteta iona s obadrije strane membrane. Ravnotežni potencijal je mjera razlike aktiviteta iona u dvije otopine i svaka promjena aktiviteta rezultirat će proporcionalnom promjenom potencijala. Elektrode reagiraju samo na promjenu aktiviteta slobodnih, nevezanih iona. Ako ionsku jakost otopine održavamo konstantnom, aktivitet iona ovisit će samo o njihovoj koncentraciji.

Ionsku jakost održavamo konstantnom dodatkom elektrolita čiji ioni ne sudjeluju u promatranoj ravnoteži, ali moraju se dodati u velikom suvišku. Dakle, potencijal elektrode ovisit će samo o koncentraciji iona koji se određuje. Potencijal elektrode pada sa smanjenjem koncentracije aniona, a raste sa smanjenjem koncentracije kationa.

### **3.3.1. TIPOVI ION-SELEKTIVNIH ELEKTRODA**

Ion-selektivne membranske elektrode dizajnirane su tako da njihov potencijal ovisi o aktivitetu samo jedne ionske vrste prisutne u potenciometrijskoj ćeliji. Klasificiraju se s obzirom na tip membrane koja je upotrebljena : elektrode s čvrstom membranom i elektrode s tekućom membranom.

- Čvrste membrane ion-selektivnih elektroda mogu biti homogene (od stakla, monokristala ili prešanih kristala nekog spoja) ili nehomogene (priređuju se od smjese aktivnih tvari na inertnom nosaču kao npr. silikonska guma, PVC).  
Staklene elektrode napravljene su od posebno izrađenog stakla koje se sastoji od taline silikon-dioksida sa dodatkom oksida raznih metala. Izrađene su staklene membrane selektivne za razne katione, između ostalih tu je i litijev kation.
- Tekuće membrane ion-selektivnih elektroda pripremaju se iz ionskih izmjenjivača ekstrakcionom tehnologijom. Inertna membrana (filar papir, tekstilni materijal, PVC) može se učiniti selektivnom prema određenom ionu zasićivanjem s organiskim sintetskim ionskim izmjenjivačem otopljenim u nepolarnom otapalu.

Referentna elektroda je elektroda čiji je potencijal poznat i potpuno neovisan o koncentraciji analita. Idealna referentna elektroda :

- mora imati poznat i stalan potencijal, neovisan o sastavu otopine
- mora biti jednostavne izvedbe
- pri prolazu malih struja potencijal se ne smije mijenjati

Kao referentna elektroda u sustavu za mjerenje može se koristiti Ag/AgCl elektroda, zasićena kalomel elektroda, zasićena Hg/Hg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> elektroda. Referentna elektroda ne smije povećavati u ispitivanoj otopini koncentraciju iona koji se određuje...

### 3.4. KOLORIMETRIJA

Kolorimetrija je kvantitativna analitička metoda u kojoj količinu neke tvari mjerimo na osnovi količine boje koja je nastala specifičnom reakcijom. Paralelno s reakcijom provodimo i referentnu reakciju u kojoj se nalaze sve tvari kao i u uzorku osim same tvari koju želimo odrediti. Referentnu reakciju koristimo kao slijepu probu kojom određujemo pozadinsko obojenje, potom mjerenje izražavamo kao razliku apsorbancije uzorka i slijepe probe. Kolorimetrijsko određivanje se temelji na Beer-Lambert-ovu zakonu : apsorbancija (A) razmjerna je umnošku koncentracije tvari u uzorku (c) i duljini puta koji je zraka prošla kroz uzorak (l). Kromofor (dio molekule koji apsorbira vidljivu svjetlost spektra) ima boju koja je komplementarna boji koju apsorbira (tj. žuti kromofor izgleda žuto jer apsorbira zračenje plave boje i stoga ga treba mjeriti u plavom području spektra).

U medicinsko-biokemijskim laboratorijima koncentracija litija mjeri se natašte kolorimetrijskom metodom VITROS Li Slides (hrv. film) koja se temelji na vezanju litija iz uzorka s azo bojom 6-dodecil-6-(2'-hidroksi-5'-(2'-4'-dinitrofenilazo) benzil)-13, 13-dimetil-1, 4, 8, 11-tetraoksaciklotetradekanom. 10 µL pacijentovog uzorka (serum, natrij heparin i EDTA plazma; 12 sati nakon posljednje doze litija) nanese se na film (engl. slide) na kojem se podjednako distribuira (razmaže). Litij iz uzorka se specifično veže na prethodno spomenutu azo boju (**prstenasti ili krunasti eter azo boja**). Vezanjem iona litija na azo boju dolazi do promjene maksimuma apsorbancije boje. Povećanje apsorbancije je proporcionalno koncentraciji litija u uzorku. Intenzitet boje mjeri se **reflektirajućom spektrofotometrijom** nakon 2,3 minute.

Litij + azo boja (400 nm) → obojeni kompleks (600 nm)

Referentni tj. terapijski interval litija je 0,6-1,2 mmol/L, dok se toksičnim koncentracijama smatraju koncentracije iznad 1,5 mmol/L :

- potencijalna toksičnost > 1,5 mmol/L
- teška toksičnost > 2,5 mmol/L

Interferencije kod ove metode uzrokuju sljedeće supstance : metilparaben (150 mg/dL), N-acetilcistein (90 mg/dL, 180 mg/dL), hemoglobin (100 mg/dL). Najmanja koncentracija litija koja se može detektirati ovom metodom (osjetljivost) je 0,20 mmol/L.



## **4. REZULTATI I RASPRAVE**

### **4.1. APOPTOZA KAO UZROK NEURODEGENERATIVNIH PROMJENA U POREMEĆAJIMA RASPOLOŽENJA**

Smrt svake stanice, pa i neurona i glija stanica može biti rezultat nekroze ili apoptoze.

- Nekroza – ili akutna patološka smrt nastaje kao posljedica znatnijeg oštećenja stanice izazvanog različitim kemijskim, biokemijskim, mehaničkim i sličnim oštećenjima. Jako oštećena stanica ne može kontrolirati ravnotežu tekućine i iona te kalcijevi i natrijevi ioni nekontrolirano ulaze u stanicu što rezultira bubrenjem stanice. Posljedično dolazi do puknuća stanične membrane i organela, izlivanja staničnog sadržaja i na taj način do onečišćenja i upalnih promjena okolnog tkiva.
- Apoptoza – ili programirana stanična smrt je normalan, fiziološki oblik stanične smrti nužan za razvoj organizma i održavanje homeostaze, tj. ravnoteže između gubitka i stvaranja stanica normalnog tkiva tijekom cijelog života. U odraslih, programirana stanična smrt je u ravnoteži sa staničnom proliferacijom i održava broj stanica u tijelu konstantnim. Dodatno, apoptoza predstavlja obrambeni mehanizam kojim se oštećene i potencijalno opasne stanice mogu ukloniti za dobrobit cijelog organizma. Primjerice, stanice zaražene virusom često podliježu programiranoj staničnoj smrti kako bi se spriječilo daljnje stvaranje novih virusnih čestica. I drugi oblici oštećenja, poput oštećenja DNK, pobuđuju apoptozu. U ovom potonjem slučaju, programirana stanična smrt može ukloniti stanice koje nose potencijalno štetne mutacije, uključujući i stanice s mutacijama koje mogu dovesti do nastanka karcinoma (nažalost, stanice raka ne umiru apoptozom). Tijekom embrionalnog razvoja, programirana stanična smrt ima

ključnu ulogu u uklanjanju neželjenih stanica iz mnoštva tkiva. Razvoj živčanog sustava u sisavaca je dobar primjer programirane stanične smrti; neuroni se stvaraju u suvišku te se čak do 50% neurona u razvoju ukloni apoptozom, a prežive samo probrani neuroni tj. oni koji su stvorili pravilne veze (sinapse) sa svojim ciljnim stanicama tako da im te stanice mogu lučiti faktore rasta koji nose poruku preživljenja i koče programiranu staničnu smrt neurona. Morfološki, u apoptozi dolazi do bubrenja stanične membrane (fosfolipid fosfatidilserin, koji se normalno nalazi unutar membrane, izlazi na površinu), kromatin se kondenzira, jezgre su piknotične i fragmentirane, stanica se razara u male fragmente obavijene membranom, tj. apoptotična tjelešca, tzv. Kerijeva tjelešca. Apoptotične stanice u tkivima, pa i in vitro, budu fagocitirane od strane fagocitnih stanica (makrofagi i dendriti) koje ih razgrađuju. Fagocitne stanice izlučuju citokine koji inhibiraju upalu, stoga, za razliku od nekroze, u apoptozi neće doći do upalne reakcije okolnog tkiva. Kao što je već navedeno, apoptoza se smatra jednim od vjerojatnih čimbenika u etiologiji neurodegenerativnih procesa u CNS-u u osoba oboljelih od poremećaja raspoloženja. Istraživanje provedeno in vivo na oboljelima od bipolarnog afektivnog poremećaja pokazalo je statistički puno veći broj apoptotičnih stanica (leukocita) na protočnom citometru nego kod zdrave kontrolne skupine. Drugo istraživanje koje je provedeno na postmortalnim uzorcima bolesnika koji su bolovali od velike unipolarne depresije pokazalo je značajno velik broj apoptotičnih stanica u središnjem živčanom sustavu, posebice u području hipokampusa. Znanstvenici koji su sudjelovali u tom znanstvenom projektu vjeruju kako je apoptoza posljedica poremećene hipotalamičko-hipofizno-adrenokortikalne osi u bolesnika s poremećajem raspoloženja.

Katkad isti uzrok u nekom tkivu dovodi do istovremene pojave i nekroze i apoptoze: ukoliko integritet stanice nije ozbiljnije narušen kao što je to u slučajevima lakšeg oštećenja stanica, ona ulazi u program samouništenja (apoptoza); kada su ta oštećenja jaka i nepopravljiva, stanica umire nekrozom. Hoće li doći do apoptoze ili nekroze ovisi i o dugotrajnosti i jačini negativnog djelovanja: u slučajevima kraćeg i slabijeg negativnog djelovanja slijedi apoptoza, a nekroza u suprotnom.

## 4.2. MEHANIZAM APOPTOZE

Apoptoza je kompleksan molekularni mehanizam koji se nadzire pomoću integrirane aktivnosti različitih signalnih puteva od koji neki djeluju tako da potiču staničnu smrt, a neki tako da potiču stanično preživljenje. Apoptotski se mehanizam pojednostavljeno prikazuje kao unutrašnji (mitohondrijski put) i vanjski (receptorski put).

- mitohondrijski put – kao što samo ime govori, u ovom unutrašnjem putu mitohondriji imaju središnju ulogu. Mitohondrijski put započinje stvaranjem pora na mitohondrijskoj membrani kao odgovor na različite podražaje koji potiču staničnu smrt (npr. oštećenje DNK ili manjak faktora rasta). Citokrom c, koji se normalno nalazi u međumembranskom prostoru mitohondrija, kroz pore izlazi u citosol u kojem se veže na protein Apaf-1 i potiče nastanak složenog kompleksa apoptosoma koji čine citokrom c, Apaf-1 (engl. Apoptotic Protease Activating Factor) i kaspaza-9 (kaspaze su porodica proteaza koje izazivaju apoptozu). Kaspaza-9 potom kida i aktivira ostale kaspaze 3 i 7 što u konačnici dovodi do stanične smrti.
- receptorski put – vanjski put apoptoze započinje vezanjem liganada na stanične membranske receptore koji se nazivaju 'receptori stanične smrti' pa se i taj put naziva 'put receptora smrti'. Ti receptori pripadaju receptorskoj porodici tumorskih nekrotizirajućih faktora (engl. Tumor Necrosis Factor, TNF). Više je supstrata koji mogu izazvati aktivaciju vanjskog apoptotskog puta, a oni koji su nama bitni u kontekstu CNS-a su : čimbenik rasta neurona (engl. Neural Growth Factor, NGF), moždani jezgrin čimbenik (engl. Brain Derived Nuclear Factor, BDNF), glutamat itd. Nakon što se vežu za receptor, ligandi potom vežu kaspazu-8 koja sama sebe aktivira autoproteolizom (sama sebe proteolitički cijepa). Jednom aktivirana, kaspaza-8 cijepa i aktivira kaspaze 3 i 7 te započinje kaskadu koja dovodi do stanične smrti.

Iako su načini aktivacije ovih puteva različiti, između njih postoji povezanost, a na kraju, oba puta izazivaju karakteristične biokemijske i morfološke promjene stanice svojstvene apoptozi.

Ključni u regulaciji apoptoze, odnosno preživljenja stanice, su članovi obitelji protein B limfoma tipa 2 (engl. B cell lymphom 2 protein, Bcl-2). Bcl-2 proteini obuhvaćaju proapoptotske proteine (potiču apoptozu: Bax, Bak, Bid, Bad) i antiapoptotske proteine (sprečavaju apoptozu: Bcl-2, Bcl-KL, Mcl-1). Bcl-2 proteini kontroliraju (direktno ili vezivanjem na proapoptotske proteine) propusnost mitohondrija oblikovanjem pora na vanjskoj membrani ili reguliranjem otvaranja i zatvaranja pora za propusnost (engl. permeability pores).

Kaspaze (cistein aspartat specifične proteaze) središnji su izvršitelji apoptoze. U stanicama su inaktivne, a aktiviraju se proteolitički, oligomerizacijom ili cijepanjem od strane drugih kaspaza. Zbog njihovog razornog djelovanja, njihova aktivnost mora biti strogo regulirana jer bi u protivnom stanice nepotrebno umirale. Dosada je otkriveno četrnaest kaspaza. Supstrat na koji djeluju kaspaze, među ostalima, je PARP protein (engl. Poly-(ADP-ribose)-polymerase). Kaspaze na njega djeluju cijepajući ga, stoga se cijepanje ovog proteina koristi kao biljeg apoptoze. Aktivnost kaspaza reguliraju inhibitori apoptotskih proteina, a među nima valja spomenuti survivin koji to čini direktno se vežući za kaspaze 3 i 7 te ih tako inhibira. Zanimljivo je spomenuti da se survivin eksprimira tijekom embriogeneze, ali ne i u odraslih ljudi. Iznimka su stanice tumora kod kojih je ponovno zabilježena značajna ekspresija survivina.

### **4.3. NEUROANATOMSKE PROMJENE U POREMEĆAJIMA RASPOLOŽENJA**

Neuroanatomska istraživanja poremećaja raspoloženja obavljala su se pomoću kompjuterizirane tomografije (CT) kasnijih sedamdesetih i osamdesetih godina 20. stoljeća i pomoću nuklearne magnetske rezonance (NMR) devedesetih godina 20. stoljeća. Istraživači su tada na postmortalnim uzorcima mozga proučavali morfološke promjene. Studije NMR-om pokazuju smanjen frontalni režanj u bolesnika s bipolarnim afektivnim poremećajem u usporedbi s ispitanicima kontrolne skupine. S druge strane, istraživanja CT-om su dala skromnije nalaze, što je dijelom i zbog ograničenja ove

metode u ispitivanju finijih morfoloških promjena CNS-a. Funkcionalno-morfološke metode istraživanja kao SPECT (engl. Single Photon Computer Tomography) i PET (engl. Positron Emission Tomography ) otkrile su ključne etiološke čimbenike poremećaja raspoloženja kao što su smanjena funkcija prečeonog korteksa ili smanjena aktivnost područja limbičkih struktura kod depresije i obrnuto (povećana aktivnost tih istih područja) u maničnoj fazi bipolarnog poremećaja.

Za razliku od navedenih makromorfoloških metoda, postmortalna istraživanja histološkim metodama rezultirala su 'opipljivijim' nalazima. Naime, glija stanice su se donedavno smatrale nevažnima u psihijatrijskim poremećajima, no studije su da su te stanice u bolesnika s bipolarnim afektivnim poremećajem manje gustoće, promijenjene stanične veličine, a i brojčano su manje zastupljene te je volumen stanice povećan. Tako je u prečeonom korteksu (regija u kojoj i SPECT i PET pokazuju promjene) broj glija stanica i do 41% manji od broja u ispitanika kontrolne skupine. Prije se smatralo da su glija stanice samo potporno tkivo CNS-a , a danas se zna da imaju brojne neurotransmitterske receptore. No, ipak se najvažnijom ulogom ovih stanica smatra regulacija metabolizma glutamata (najvažnijeg ekscitatornog neurotransmitera): glija stanice sadrže glutamatni transporter koji 'sakuplja' višak glutamata iz sinaptičke pukotine i sprema ga u glavno spremište glutamata, glija stanice.

U konačnici, promjene u bipolarnom afektivnom poremećaju i depresivnom poremećaju nisu kao u ostalih klasičnih neurodegenerativnih bolesti, gdje je gliozna (proliferacija glija stanica što rezultira ožiljkom na mozgu) ključan patomorfološki nalaz. Istraživači su išli korak dalje i ističu apoptozu kao ključan mehanizam nastanka opisanih promjena u čeonom korteksu bolesnika s poremećajem raspoloženja (ubaciti slike sa str 297 i 298)

#### **4.4. LIJEČENJE BIPOLARNOG POREMEĆAJA**

Lijekovi za liječenje bipolarnog poremećaja, tzv. stabilizatori raspoloženja, upotrebljavaju se kako bi postigli kontrolu nad karakterističnim promjenama raspoloženja koje su glavno obilježje manično-depresivne (bipolarne) bolesti. Litijeve soli su pritom najčešća i standardna psihofarmakoterapija, no kao alternativni lijekovi stabilizirajućeg učinka na raspoloženje se rabe i noviji antiepileptici, poput valproata, karbamazepina i gabapentina, jer imaju manje

nuspojava od litija i dokazanu efikasnost. Primijenjeni profilaktički kod bipolarnih bolesnika, lijekovi stabilizatori raspoloženja djeluju tako da sprječavaju krajnja odstupanja u raspoloženju i reduciraju obje epizode bolesti (i maničnu i depresivnu). S druge strane, ako su primijenjeni za vrijeme akutnog napada, učinkoviti su samo u ublažavanju manične epizode, ali ne i depresivne. U liječenju akutnog maničnog napadaja efikasni su i drugi lijekovi (primjerice antipsihotici) te se smatraju brže djelujućima i znatno sigurnijima. Iz navedenog je lako zaključiti da klinička upotreba litija ostaje uglavnom u domeni profilaktičke kontrole manično-depresivne bolesti.

#### **4.5. LITIJ U LIJEČENJU BIPOLARNOG POREMEĆAJA**

Litijske soli imaju više primjena u liječenju poremećaja raspoloženja:

- one su lijek prvog izbora za stabilizaciju raspoloženja u bolesnika oboljelih od bipolarnog afektivnog poremećaja
- litij se često dodaje antidepresivima kao 'pojačivač' antidepresivnog učinka u bolesnika koji boluju od depresije
- litijske soli imaju i antimanični učinak tako da se kao lijek primjenjuje i u bolesnika sa maničnom kliničkom slikom

Od 70-tih godina 20. stoljeća litij je tretman 'zlatnog standarda' za bipolarni poremećaj. Litij je najstariji i klasični psihostabilizator. Iako svi ljudi s bipolarnim poremećajem ne reagiraju na litij ili ne mogu tolerirati njegove popratne pojave, istraživanja su pokazala da je zahvaljujući litiju smanjena stopa samoubojstva među oboljelima od ovog poremećaja raspoloženja.

#### **4.6. FARMAKOKINETIKA I TOKSIČNOST LITIJA**

Litij se primjenjuje peroralno u obliku soli litij karbonata. Litijeve soli najčešće se proizvode u obliku tableta od 300 mg. Do njegove potpune apsorpcije u gastrointestinalnom traktu doći će nakon osam sati, a već 2-4 sata nakon uzimanja doseže maksimalnu koncentraciju u krvi (poluživot u serumu je 1-1,5 sati). Budući da se u krvi ne veže na proteine, sav je farmakološki aktivan. Nakon apsorpcije litij se distribuira u izvanstaničnoj tekućini, a poseban afinitet pokazuje prema tkivu štitnjače, kostima i bijeloj supstanci mozga. Litijev prelazak moždane barijere je spor, no kada se postigne dinamička ravnoteža, koncentracija litija u cerebrospinalnoj tekućini iznosi 40% od koncentracije u plazmi (dinamička ravnoteža postiže se za 5-6 dana).

Više od polovice peroralne doze izluči se putem bubrega, tj. mokraćom nepromijenjeno za oko 12 sati u početnoj (brzoj) fazi izlučivanja. Ostatak čini litij koji su uzele stanice (štitnjača, kosti...), a on se izlučuje kasnije tijekom 10-14 dana sporom fazom izlučivanja koja znači da se litij, s uobičajenim doziranjem, nakuplja polako tijekom dva tjedna dok ne dosegne ravnotežnu koncentraciju. Nakon što se filtrira glomerulima litij se djelomično reapsorbira u proksimalnim tubulima (pri dehidraciji uslijed povraćanja, proljeva, vrućice ili drugih uzroka intenzivnije se reapsorbira pa lakše nastupa intoksikacija).

Izlučuje se i u mlijeku pa se ne preporučuje njegova primjena kod dojilja. Terapeutske doze litija pokazuju teratogeno djelovanje u prvom trimestru trudnoće, naročito je povećana opasnost od pojave srčanih anomalija.

Litij je klinički učinkovit pri koncentraciji u plazmi od 0,5 do 1 mmol/l. Ukoliko njegova razina u krvi poraste iznad 1,5 mmol/l proizvest će različite toksične učinke : mučnina, povraćanje, proljev, tremor, mentalna konfuzija, povećanje tiroidne žlijezde (ponekad s hipotiroidizmom), dobivanje na težini. Učinci litija na bubrege :

- poliurija sa žeđanjem kao rezultat inhibicije antidiuretskog hormona
- ozbiljno oštećenje bubrežnih tubula može se pojaviti pri produženom liječenju litijem, pa je obavezno kontrolirati funkciju bubrega u bolesnika na dugotrajnoj terapiji litijem. Najčešće se javlja nefrogeni dijabetes insipidus (poremećaj kod kojeg bubrezi stvaraju velike količine razrijeđenog urina jer ne reagiraju na antidiuretski hormon i ne mogu koncentrirati urin), ali se u literaturi spominju i kronični intersticijski nefritis, glomerulopatija malih promjena, bubrežna tubularna acidoza. Najteža nuspojava je kronični intersticijski nefritis s

progresivnim kroničnim zatajenjem bubrega. Liječenje otrovanja litijem ovisi o bubrežnoj funkciji i stupnju otrovanja litijem (DIJALIZA?)

Akutna toksičnost litija za posljedicu ima različite neurološke učinke koji mogu od smetenosti i oštećenja motorike progredirati do konvulzija, kome i smrti kada njegove koncentracije u plazmi dosegnu razine od 3 do 5 mmol/l.

Kao što je prethodno navedeno, terapijski interval litija je vrlo uzak, a nuspojave mogu biti fatalne, stoga je kontinuirano praćenje njegove koncentracije u plazmi neophodno.

Unatoč uspjehu litija kao lijeka za poremećaj raspoloženja, on je i dalje miljama daleko od savršenog lijeka ponajviše zbog velikog broja pacijenata koji ili ne reagiraju adekvatno na lijek ili ne mogu tolerirati brojne nuspojave, ili oboje. Iako postoji sigurnija alternativa, s blažim nuspojavama, kao što su noviji antiepileptici (karbamazepin, valproat, gabapentin), i njihov problem je u slabom odgovoru bolesnika na terapiju ili netolerantnost prema slabijim, ali opet prisutnim nuspojavama.

#### **4.7. MEHANIZAM DJELOVANJA LITIJA**

Još do prethodnog desetljeća se vrlo malo znalo o mehanizmu djelovanja litija. Do značajnih otkrića je došlo tek u proteklih nekoliko godina zahvaljujući značajnom razvitku laboratorijskih tehnika i metoda molekularne biologije pomoću kojih su otkrivene promjene u staničnim membranama i u unutarstaničnim prostorima koje su 'prosvjetlile' mehanizam djelovanja litija. Naime, litij je lijek koji svoj učinak u CNS-u ne ostvaruje prvenstveno djelujući na koncentracije neurotransmitera i njihove receptore, već regulacijom sustava drugog glasnika i pritom posljedično regulira gene ranog odgovora, a time i živčanu plastičnost.

Litij svoj učinak ostvaruje na nekoliko razina, tj. na više elemenata glasničkih puteva:

- na G-proteine
- na adenilat-ciklaze, a posljedično i protein kinaze
- na inozitol-trifosfat
- na glikogen-sintaza kinaza

Dugoročno litij ima učinak na podjedinice G-proteina tako što mijenja njihovu konformaciju što rezultira kočenjem aktivnosti G-proteina i aktivacije drugih glasnika do koje bi normalno došlo u odsutnosti litija. Drugim riječima, litij djeluje tako da smanjuje podražljivost stanice na neurotransmitere.

cAMP kao drugi glasnik djeluje tako da aktivira cAMP-ovisnu protein kinazu, koja potom fosforilira te na taj način regulira aktivnost mnogih proteina uključujući ionske kanale, elemente citoskeleta, transkripcijske faktore i ostale enzime. Jedan od izravnih ciljeva protein kinaze u središnjem živčanom sustavu je transkripcijski faktor CREB koji ima veliku ulogu u dugoročnoj neuroplastičnosti i nizvodni je cilj antidepresiva. Jedan od gena čiju transkripciju potiče CREB je BDNF tj. moždani neurotrofični faktor (engl. brain-derived neurotrophic factor, krajem 2010. godine spominje se kao protein koji može ublažiti 'bol' koja nastaje uslijed loših sjećanja) uključen u preživljenje neurona i sinaptičku plastičnost. Sve više dokaza postoji o tome da su agensi (agents) koji reguliraju cAMP-PK-CREB-BDNF signalnu kaskadu itekako korisni u terapiji depresije. Kronična terapija litijem i valproatom (antikonvulziv) uzrokuje porast razine BDNF-a u mozgu štakora. Učinak litija na signaliziranje cAMP-om je kompleksno, tj. dio istraživanja pokazuje porast bazalne aktivnosti adenilat ciklaze kao posljedicu terapije litijem, ali isto tako i redukciju odgovora na stimulaciju receptora u kliničkim i prekliničkim istraživanjima. Mnoge studije nezavisnih laboratorija pokazale su u prekliničkom modelu (stadiju) smanjenu sposobnost signala da bude propagiran pomoću adenilat ciklaze nakon terapije litijem, a s druge strane bazalna aktivnost adenilat ciklaze pokazala se povećanom.

Utjecaj litija na adenilat ciklazu je inhibitorni što rezultira smanjenim nastajanjem cAMP-a iz ATP-a i reduciranom aktivnošću cAMP-ovisne protein kinaze.

Litijevo djelovanje na razini inozitol-1,4,5-trifosfata očituje se u inhibiciji enzima inozitol-fosfataze koji je zaslužan za cijepanje inozitol-trifosfata na inozitol. Naime, inozitol, koji nastaje na naveden način, se ponovno koristi, tj. reciklira za izgradnju novog inozitol-trifosfata. Ova reciklaža je neophodna za nesmetano odvijanje fosfoinozitolnog signalnog puta u stanicama u kojima inozitol nije na raspolaganju, tj. u stanicama u kojima je to jedini način dobivanja inozitol-trifosfata. Inozitol-fosfataze koje litij inhibira su inozitol-polifosfat-1-fosfataza (IPPaza) i

inozitol-monofosfat-fosfataza (IMPaza). To su enzimi koji sudjeluju u recikliranju i de novo sintezi inozitola. IPPaza djeluje tako da defosforilira inozitol-1,4-bifosfat te tako nastaje inozitol-1-fosfat. Tu nastupa na djelo IMPaza koja uklanja fosfat, a kao produkt reakcije nastaje inozitol. Oba enzima su inhibirana od strane litija, što je potaknulo postavljanje hipoteze o trošenju inozitola kao posljedici djelovanja litija (dokazano je i smanjenje koncentracije još jednog oblika inozitola – mioinozitola) tj. njegovog terapijskog učinka.

Glikogen-sintaza-kinaza-3 (GSK-3) je serin-treonin kinaza, enzim koji katalizira fosforilaciju serinskih i treoninskih aminokiselinskih ostataka ciljnih proteina te ih na taj način inhibira, tj. on je ključni enzim koji je inhibitor mnogih čimbenika rasta stanica CNS-a i čimbenika živčane plastičnosti. Zbog toga što je sastavna komponenta mnogih signalnih puteva, GSK-3 može djelovati na čitav niz unutarstaničnih ciljeva : glikogen sintaza (GSK-3 inhibira glikogen sintazu fosforilacijom), genska transkripcija, sinaptička plastičnost i apoptoza. Iako su svi ovi ciljevi od velike važnosti za normalno funkcioniranje stanica i organizma, znanstvenici u zadnje vrijeme posebno obraćaju pozornost na utjecaj GSK-3 na staničnu otpornost (engl. Cellular resilience) i regulaciju apoptoze. Općenito, povećana aktivnost GSK-3 rezultira je proapoptotičnim učinkom. Proučavanjem izravnog efekta litija na GSK-3 otkriveno je da litij inhibira aktivnost GSK-3 enzima. Na kraju krajeva, litijev terapijski inhibirajući učinak na GSK-3 u poremećajima raspoloženja za posljedicu ima ublažavanje ili potpuno spječavanje apoptoze. Osim kao moguć lijek za liječenje bipolarnog poremećaja, inaktivacija GSK-3 se pokazala korisnom i u liječenju drugih bolesti od kojih su najviše pozornosti privukli dijabetes i Alzheimer-ova bolest.

U terapijskim koncentracijama litij inhibira i fruktoza-1,6-bifosfatazu, fosfoglukomutazu i bifosfat-nukleotidazu :

- fruktoza-1,6-bifosfataza (FBPaza) je enzim uključen u proces glukoneogeneze (sinteza glukoze iz neugljikohidratnih izvora : laktat, glicerol ili glukogenične aminokiseline) u kojem katalizira konverziju (defosforilaciju) fruktoze-1,6-bifosfat u fruktozu-6-fosfat. Inhibicija FBPaze litijem otkrivena je još prije mnogo godina, a novija istraživanja samo potvrđuju ta ranija otkrića.

Ova inhibicija nije baš zanimljiva znanstvenicima jer disfunkcija glukoneogeneze nije od prevelikog značaja za patofiziologiju bipolarnog poremećaja, no inhibitori FBPaze su u procesu razrade kao mogući lijek za dijabetes.

- Bifosfat-nukleotidaza (BPNaza) u sisavaca djeluje na bifosforilirane nukleotide, npr. 3'-fosfoadenozin-5'-fosfat (PAP), tako da uklanja 3'-fosfat grupu pri čemu nastaje adenzin-5'-fosfat (AMP), stoga se ovaj enzim još naziva PAP fosfataza. Sulfotransferaze su enzimi koji kataliziraju prijenos sulfatne skupine sa donora 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfata (PAPS) na različite akceptorske molekule. PAP nastaje uklanjanjem sulfatne skupine sa PAPS-a iz čega je lako zaključiti da PAP djeluje kao inhibitor sulfotransferaze, a inhibicija BPNaze očekivano također inhibira sulfotransferazu. Vrlo je moguće da je razvitak nefrogenog dijabetesa insipidusa u bolesnika koji su na terapiji litijem uzrokovan inhibicijom BPNaze. BPNaza, slično IPPazi, hidrolizira inozitol-1,4-bifosfat, a litij, kao inhibitor oba enzima, sprječava ovu hidrolizu. Stoga je očekivano da će litijeva inhibicija BPNaze imati značajan utjecaj na već spomenutu reciklažu inozitola. Novo otkrivena kristalna struktura BPNaze bi trebala biti od pomoći u razvoju novih inhibitora.
- Fosfoglukomutaza (PGM) je enzim koji tijekom glikogenolize pretvara glukozu-1-fosfat u glukozu-6-fosfat koja ulazi u glikolizu i ciklus pentoza fosfata. Litij je prvotno identificiran kao inhibitor fosfoglukomutaze u štakora i zečeva, a u novije vrijeme i u kvasca i u čovjeka. Uloga PGM-a kao ciljnog enzima litija u liječenju bipolarnog poremećaja je poprilično zanemarena jer nije dokazana upletenost metabolizma glikogena u ovaj poremećaj raspoloženja.

Konačno, litij izaziva mnoge promjene na staničnoj razini trenutačno, a poboljšanja u kliničkoj slici nastaju nakon višednevnog uzimanja i djelovanja litija. Sekundarni učinci, koji nastaju kao rezultat poticanja promjena u drugim glasnicima, kao promjena transkripcije gena za nove proteine ili čimbenike rasta primjerice BDNF, NGF predstavljaju dugotrajne učinke terapije litijem.

#### 4.8. ISPITIVANJA UTJECAJA LITIJA NA APOPTOZU

Do sada je objavljeno samo nekoliko istraživanja koja su se bavila ispitivanjem utjecaja litijevih soli na ekspresiju antiapoptotskih ili proapoptotskih gena. Kod in vitro studija kao istraživački model rabile su se stanične kulture neuroblastoma ili cerebralnih granuliranih stanica. In vivo studije izvodile su se na eksperimentalnim životinjama, pretežito miševima. Istraživanja su dizajnirana tako da se promatrao učinak litija na ekspresiju gena ili citotoksični učinak nakon tretmana litijem ili učinak litija nakon poticanja apoptotskih mehanizama nekim drugim agensom.

Znanstvenici su istraživanjima na stanicama glioblastoma došli do spoznaja da litij u terapijski relevantnom koncentracijskom intervalu uzrokuje povećanje ekspresije gena survivina koji je ključan čimbenik u sprječavanju programirane stanične smrti. Dakle, litij je zaslužan za preživljavanje stanica (u ovom slučaju stanica glioblastoma) tako da putem molekularno-biokemijskih mehanizama mijenja ekspresiju gena survivina. Također je dokazano da predtretman litijem od 3 dana (72 sata) sprječava smanjenje ekspresije gena survivina nakon naknadnog tretmana glutamatom. Pretpostavlja se da litijeve soli na taj način stabiliziraju raspoloženje i preveniraju ponovne mahove promjene raspoloženja. Još jedan zaključak ovog istraživačkog rada bio je da litij nije citotoksičan u terapijski relevantnim koncentracijama.

Učinak litija na stanice hipokampusa ispitivao je Chen sa suradnicima. Istraživanje je provedeno na miševima tretiranim tijekom dva tjedna otopinom litijeva-karbonata. Koncentracija litija u serumu miša bila je oko 1 mmol/l (miševi su dobivali 2,4 g/kg litijeva-karbonata dnevno). Životinje su nakon tretmana uginule (žrtvovane su), te su uzorci hipokampusa analizirani mikroskopom nakon imunohistokemijske obrade ili je iz stanica hipokampusa izdvojen jedan dio proteina kako bi se Western-blottingom odredio sadržaj bcl-2. Western blot (jednodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza) je metoda razdvajanja proteina djelovanjem električnog polja na temelju njihove molekularne mase : određena masa ukupnih staničnih proteina (denaturiranih ili u nativnoj konformaciji) nanosi se na poliakrilamidni gel na kojem se pod utjecajem struje

određenog napona razdvajaju tako da proteini manje mase putuju brže, a veće mase sporije. Tako razdvojeni proteini s gela se prebacuju na membranu pod utjecajem električne struje određena jakosti na kojoj se fiksiraju potom se proteini od interesa detektiraju vezanjem specifičnih antitijela koja uz dodatak supstrata emitiraju svjetlost (kemiluminescencija – oslobađanje energije tijekom kemijske reakcije u obliku elektromagnetnog zračenja), a ti signali se registriraju uz pomoć digitalne kamere (VersaDoc imaging system).

Morfološka analiza hipokampusa pokazala je da životinje tretirane litijem pokazuju veći volumen hipokampusa, gušće stanice hipokampusa i veći broj hipokampalnih stanica u odnosu na kontrolne uzorke koji nisu bili tretirani litijem. Osim toga, otkrivena je i veća koncentracija antiapoptotskog gena Bcl-2 nego u kontrolnih netretiranih uzoraka.

U drugom istraživanju znanstvenici su se bavili ispitivanjem utjecaja litija na stanice čeonog korteksa, odnosno utjecaja litija na ekspresiju antiapoptotskog gena bcl-2. Ispitivanja su provedena na eksperimentalnim životinjama. Rezultati su, kao i u prethodnom istraživanju, pokazali da litij u koncentracijama oko 1 mmol/l tijekom dva tjedna uzrokuje povećanje broja stanica i njihove gustoće, a i otkrivena je povećana ekspresija antiapoptotskog gena bcl-2, samo što je u ovom slučaju riječ o stanicama čeonog korteksa.

Rena Li je sa suradnicima na stanicama neuroblastoma ispitivao utjecaj litija na ekspresiju apoptotskog proteina kaspaze-3. U ovoj studiji cilj je bio otkriti mogući protektivni učinak litija u apoptozi što su rezultati i potvrdili. Dokazano je da litij smanjuje ekspresiju kaspaze-3 i to nakon apoptoze potaknute različitim citostaticima. Konačni rezultat istraživanja Rene Li jest da litij djeluje neuroprotektivno i sprječava povećanje ekspresije apoptotskih gena.

Hennion je sa suradnicima, poput Rene Li, također na stanicama neuroblastoma istraživao neuroprotektivni i antiapoptotski utjecaj litija nakon apoptoze izazvane oubainom (srčani glikozid, kardiotonički steroid). Rezultati su još jedanput potvrdili litijevo antiapoptotsko i neuroprotektivno djelovanje.

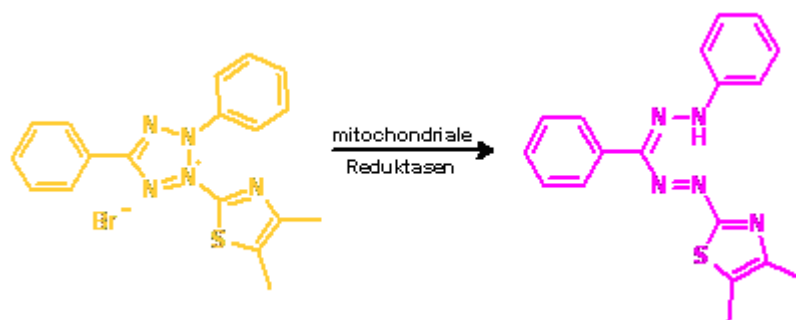
Vrlo zanimljiv istraživački projekt utjecaja litija na molekularne mehanizme apoptoze je ono autora Chena i Chenuanga. Istraživanje je provedeno u dva dijela : u prvom dijelu

pokusa su stanice primarne kulture cerebralnih mišjih stanica tretirane litijem u koncentraciji od 0,5 do 5,0 mmol/l, a u drugom dijelu su stanice nakon predtretmana glutamatom, koji je izazvao porast ekspresije gena p53 i Bax-a te smanjenje ekspresije gena bcl-2, tretirane litijem koji je ublažio navedene promjene izazvane glutamatom. Zaključak ovog istraživanja je da litij povećava ekspresiju antiapoptotskog gena bcl-2, a suprimira ekspresiju gena p53 (tumor-supresorski gen koji djeluje proapoptotski u slučaju nepopravljive oštete DNK).

Španjolak Moroa sa suradnicima u svom istraživanju ispitivao je sprječavanje apoptoze litijem i valproatom nakon izazivanje apoptoze niskim koncentracijama kalija na primarnim kulturama mišjih cerebralnih granuliranih stanica. U ovom projektu posebna se pozornost obraćala na ispitivanje utjecaja litija i valproata na fosfoinozitol i protein-kinazu, a rezultati su pokazali da ih valproat povisuje, dok litij nema takav učinak. Zaključak ovog istraživanja bio je da, iako litij i valproat imaju neuroprotektivno i antiapoptotsko djelovanje, taj učinak ostvaruju različitim mehanizmima. Odnosno, pretpostavlja se da litij svoj antiapoptotski učinak ostvaruje tako da djeluje na antiapoptotske gene. U svojem sljedećem radu ovi isti autori su proširili 'polje' istraživanja tako da su na istim staničnim kulturama i istom modelu dokazali da litij uzrokuje blokiranje aktivacije kaspaze-3.

Nonak sa suradnicima je također na mišjim cerebralnim granuliranim stanicama istraživao utjecaj litija na apoptozu izazvanu antiepilepticima fenitoinom ili karbamazepinom pomoću MTT metode. MTT test je jedan od testova vijabilnosti (sposobnost preživljenja) tj. standardni kolorimetrijski test kojim se mjeri aktivnost enzima dehidrogenaze koji reducira (cijepa tetrazolni prsten) žuti, topivi MTT (dimetiltiatol difenil tetrazolium bromid) u ljubičasti, netopivi formazan, a apsorbancija nastalog obojenja je mjera mitohondrijske aktivnosti, odnosno vijabilnosti stanica.

U ovom istraživanju dokazano je veće preživljavanje stanica predtretiranih litijem. Spomenuti antiepileptici fenitoin ili karbamazepin su izazvali apoptozu na ispitivanim cerebralnim granuliranim stanicama što se manifestiralo kao fragmentacija stanične DNK koju je litij mogao spriječiti.



Prethodno navedena istraživanja su bila izvedena in vitro, a jedno in vivo istraživanje radilo se na laboratorijskim miševima koji su uz uobičajenu prehranu hranjeni i litijevim solima. Za razliku od grupe miševa koji su hranjeni samo aluminijevim pripravcima, koji su jaki neurotoksini, životinje hranjene i litijem pokazale su smanjenu razinu apoptoze u stanicama hipokampusa te manji pad ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2 i manji porast ekspresije proapoptotskog proteina Bax.

## 5. ZAKLJUČAK

Od otkrića do današnjeg dana objavljeni su brojni znanstveni radovi koji su se bavili tematikom litija, njegovim mehanizmom djelovanja, farmakologijom, nuspojavama, znanost je sintetizirala i primjenila i druge lijekove analoge litijevom učinku... Daleko je on od idealnog lijeka, no litij je zadržao 'monopol' kao lijek prvog izbora u liječenju afektivnih poremećaja i dan danas ima svoje mjesto u terapiji psihijatrijskih poremećaja jednako kao i na početku primjene. Tijekom godina spominjali su se i drugi lijekovi kao alternativa litiju kao što su antipsihotici koji uklanjaju simptome sumanutosti i halucinacija, no nakon njihove primjene bolesnicima predstoji opasnost od ulaska u nekontrolirano raspoloženje. Litij je toksičan za bubrege, no antipsihotici za jetru. Unatoč litijevim manama on je još uvijek najbolji lijek koji postoji za stabilizaciju raspoloženja, no za njegov uspjeh potrebna je tzv. individualizacija terapije. Upravo njome se bavi znanstvena grana farmakogenetika. Farmakogenetika je znanost koja se bavi istraživanjima utjecaja nasljedne osnove na odgovore na lijek u populaciji, tj. pomaže u predviđanju individualnog odgovora na lijek. Farmakogenetičkom analizom se utvrđuju genetičke varijacije (polimorfizmi) koji utječu na koncentraciju lijeka u organizmu i odgovor na njega. Te genetičke razlike, koje rezultiraju razlikama u proteinima, uzrokuju da se istom dozom lijeka postignu različite sistemne koncentracije tog lijeka u različitim osoba. Varijacije u sistemnoj koncentraciji lijeka i polimorfizam receptora mogu biti razlog zašto neki bolesnici dobro odgovaraju na lijek, a drugi ne odgovaraju ili zašto je lijek za neke toksičan, a za neke nije.

Farmakogenetika nam je omogućila individualizaciju terapije litijem pomoću koje pacijent može dobiti odgovarajuću mu terapiju za bipolarni poremećaj sa što većim učinkom, a istovremeno što manjim nuspojavama.