



Gimnazija Kranj

Gimnazija Kranj, Koroška cesta 13, 4000 Kranj

Mikrokinetika delovanja lokalnih anestetikov z aplikacijo na kokainu

Interdisciplinarno področje (kemija, biologija, fizika, matematika)

Avtor:

Patricija Zupan

Mentorstvo:

Petra Košir, Gimnazija Kranj

Janez Mavri, Kemijski inštitut

Kranj, februar 2024

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici in svoji profesorici biologije, dr. Petri Košir, Gimnazija Kranj, za dolge in plodne diskusije o teoriji prenosa živčnega signala. Velika zahvala gre tudi prof. dr. Janezu Mavriju, Kemijski inštitut, ki je pomagal pri teoretski farmakologiji monoaminergičnega sistema in Vladimirju Smrkolju, Medicinska fakulteta, za debate o zgradbi živčnega vlakna in prehodu lokalnih anestetikov čez membrano. Hvala tudi Nejcu Umeku, Medicinska fakulteta, za razpravo o anesteziologiji in Jakobu Kralju, Fakulteta za matematiko in fiziko, za vso potrpežljivost, prijaznost in pomoč.¹

¹ Vse slike in tabele so citirane na koncu raziskovalne naloge.

Kazalo vsebine

Zahvala.....	2
Kazalo vsebine	3
Kazalo slik	4
Kazalo tabel.....	4
Povzetek.....	5
Abstract	5
1. Uvod	7
1.1. Raziskovalna vprašanja.....	7
1.2. Hipoteze	7
2. Teoretični del	8
2.1. Zgradba živčnih celic	8
2.2. Mirovni membranski potencial (MMP).....	9
2.3. Prenos živčnega signala vzdolž aksona in dogajanje v sinapsi	9
2.4. Struktura lokalnih anestetikov	11
2.5. Lokalna anestezija v zobozdravstvu in kirurgiji.....	12
2.5.1. Lidokain	12
2.5.2. Kokain kot lokalni anestetik	13
2.5.2.1. Farmakologija kokaina	14
2.5.2.1.1. Inhibicija od napetosti odvisnega Na^+ kanala.....	14
2.5.2.1.2. Inhibicija dopaminskega transporterja	15
2.5.2.1.3. Inhibicija ponovnega prevzema adrenalina.....	15
2.5.2.1.4. Stranski učinki	16
2.5.3. Protoniranje kokaina	17
2.5.4. Fizikalno-kemijske lastnosti kokaina.....	17
2.6. Porazdelitveni koeficient oktanol/voda	18
3. Metode	20
3.1. Prehod kokaina preko membrane in potencial srednje sile	20
3.2. Difuzija in difuzijska enačba	21
3.2.1. Približna enačba za čas difuzije	22
4. Rezultati	24
4.1. Prehod kokaina preko membrane in izračuni z uporabo potenciala srednje sile.....	24
4.2. Izračun hitrosti difuzije	28
5. Razpravljanje.....	33
5.1. Uporabnost raziskovalnega dela: nova metoda ekstrakcije kokaina.....	33
5.2. Možnost nadaljnjih raziskav.....	34
6. Zaključek	35
7. Seznam literature.....	36

Kazalo slik

Slika 1: zgradba nevrona	8
Slika 2: struktura sinapse	8
Slika 3: potovanje živčnega impulza vzdolž aksona	10
Slika 4: dogajanje v sinaptični špranji.....	10
Slika 5: Zgradba amidoestrov in amidoamidov.....	11
Slika 6: Skeletna formula lidokaina	12
Slika 7: Napis na steklenici, kjer je bila shranjena raztopina kokaina za lajšanje zobobola iz leta 1885	13
Slika 8: Mesto vstopa lokalnega anestetika.....	14
Slika 9: zgradba Schwannove celice	15
Slika 10: vazokonstrikcija.....	16
Slika 11: izgled tkiva pri vazokonstrukciji.....	16
Slika 12: Shema protoniranja molekule kokaina.....	17
Slika 13: Prehod delcev iz polarnega v nepolarno topilo.	19
Slika 14: Shema izračuna porazdelitvenega koeficienta.....	19
Slika 15: Skica količine proste energije (ni narisana v merilu) kot funkcija reakcijske koordinate	25
Slika 16: Potek računanja deleža kokaina v aksoplazmi, membrani in ekstracelularni tekočini .	26
Slika 17: Skica prehoda kokaina čez membrano pri fizioloških pogojih in količina, ki se nahaja v posameznem delu celice [%]	27
Slika 18: Skica prehoda kokaina čez membrano pri vnetem tkivu in količina kokaina v posameznih delih [%]	28
Slika 19: Primer PMF profila	32
Slika 20: Graf, ki kaže koncentracijo lokalnega anestetika	32
Slika 21: Slika našega postopka pridobivanja kokaina	34

Kazalo tabel

Tabela 1: fizikalne in kemijske lastnosti kokaina	18
Tabela 2: razdalja in približno potreben čas za potovanje molekul O ₂ z difuzijo	23

Povzetek

V raziskavi smo razvili teoretski model, ki je omogočil vpogled v prehod lokalnih anestetikov skozi zunano membrano nevronov. S pomočjo tega modela smo pridobili pomembne ugotovitve o teh anestetikih v odvisnosti predvsem od pH vrednosti. Naš cilj je bil simulirati hitrost prehajanja anestetika skozi membrano. Uporabili smo enačbo Smoluchowskega (5), ki nam je numerično simulacijo omogočila in dala informacijo, da lokalni anestetik kokain prehaja skozi membrano z izjemno hitrostjo (2, 4, 15, 18, 33). To lahko pripisemo njegovi lipofilnosti, ki omogoča, da se molekula laže prebije skozi hidrofobno membrano Schwannove celice (1, 5, 8). Naši rezultati so pokazali, da se kokain v tej membrani tudi najbolj zadržuje. Na splošno se lokalni anestetiki v neutralnem stanju raje zadržujejo v celičnih membranah v primerjavi z vodno raztopino. V kislem okolju z nizko pH vrednostjo pa se le-ti protonirajo, zato se raje nahajajo zunaj celice.

V nadaljevanju smo se posvetili določitvi količine kokaina, ki bi se nahajala znotraj celice, v membrani ter zunaj celice, če bi ga vbrizgali v bližino živčne celice. Opazili smo, da Schwannove celice igrajo ključno vlogo pri zadrževanju lokalnih anestetikov v tkivu. Te celice delujejo kot svojevrstni rezervoar za anestetike, kar ima pomemben vpliv na trajanje anestezije. Kapaciteta Schwannovih celic in prisotnost drugih hidrofobnih delov tkiva so pomembni dejavniki, ki vplivajo na dolžino delovanja anestetikov.

To smo raziskovali pri različnih pH vrednostih, saj so vneta tkiva običajno kisla (2). Presenetljivo smo ugotovili, da razlike v količini kokaina glede na vneto in zdravo tkivo niso bile tako velike, kot smo pričakovali. Kljub spremembam pH se količina kokaina v celici in membrani ni bistveno spremenila.

Kjučne besede: lokalni anestetik, pH vrednost, Schwannove celice, acidoza, difuzija, kokain

Abstract

In this study, we developed a theoretical model that provided insights into the passage of local anesthetics through the outer membrane of neurons. With the use of this model, we have obtained important findings about these anesthetics depending mainly on the pH value. Our aim was to simulate the rate of passage of anaesthetic through the membrane. Using Smoluchowski's equation (5), which allowed numerical simulation. We found out that the local anesthetic cocaine passes through the membrane with an extraordinary rate (2, 4, 15, 18, 33). This can be attributed to its lipophilicity, which allows the molecule to penetrate more easily through the hydrophobic membrane of Schwann cells (1, 5, 8). Our results showed that cocaine is also the most retained in this membrane. In general, neutral local anesthetics are preferred to be retained in cell membranes as opposed to an aqueous solution. However, in an acidic environment with a low pH, they are protonated and prefer to be located outside the cell.

We also focused on determining the amount of cocaine that would be inside the cell, inside the membrane, and outside the cell if the doctor injected it near a nerve cell. We have observed that Schwann cells play a key role in retaining local anesthetics in the tissue. These cells serve as a kind of reservoir for anesthetics, which has a significant impact on the duration of anesthesia. The capacity of Schwann cells and the presence of other hydrophobic parts of the tissue are important factors affecting the duration of action of anesthetics.

We were investigating that at different pH values, as inflamed tissues are usually acidic (2). Surprisingly, we found that the differences in the amount of cocaine in terms of inflamed and healthy tissue were not as large as we expected. Despite the change in pH, the amount of cocaine in the cell and membrane did not change significantly.

Keywords: local anesthetic, pH value, Schwann cells, acidosis, diffusion, cocaine

1.Uvod

Pri raziskovanju smo se osredotočili na prehod molekul lokalnega anestetika kokaina skozi membrano Schwannove celice. Lokalni anestetiki so snovi, ki za omejeno območje začasno prekinejo prenos živčnih impulzov po živčnem sistemu, zaradi česar tkivo postane neobčutljivo na zunanje dražljaje (21). To se zgodi, ker blokirajo natrijev kanal in s tem preprečijo depolarizacijo membrano. Klinična praksa je pokazala, da je njihov učinek odvisen od vrednosti pH - če je ta nižja (v vnetem tkivu), so manj učinkoviti (27). Obstajače stališče je, da anestetik začne delovati, ko preide membrano nevrona. Na hitrost vpliva poleg pH ekstracelularne tekočine še pK_a anestetika. Vendar pa način prehoda od vstopnega mesta do tarčne celice še ni popolnoma znan. Nekatere raziskave pravijo, da je za prehod anestetika celična membrana zanemarljiva energijska ovira (5). Klinične raziskave niso preveč zanesljive zaradi različnih spremenljivk, zaradi katerih so rezultati vedno precej raznoliki. To pa je motivacija za raziskovalno delo.

Naš namen je bil razviti model prehoda anestetika in simulirati hitrost skozi membrano živčne celice. Zanimal nas je torej čas, potreben za prehod anestetika čez membrano nevrona. Poleg tega pa smo se ukvarjali tudi z vplivom vnetega tkiva na trajanje anestezije.

1.1. Raziskovalna vprašanja

1. Zanima nas, kako hitro po vnosu lokalni anestetik onesposobi živčno celico.
2. Zanima nas, če se količina kokaina v zdravem tkivu in vnetem tkivu precej razlikuje, ko ga vbrizgamo v tkivo.
3. Zakaj pri lokalni acidozni lokalni anestetik deluje slabše?

1.2. Hipoteze

1. Ker je prehod lokalnega anestetika preko zunanje membrane nevrona zelo hiter, celico onesposobi v manj kot sekundi.
2. Količina anestetika se v zdravem tkivu in vnetem tkivu razlikuje. V zdravem tkivu se ga nakopiči veliko več kot v vnetem.
3. Pri vnetem tkivu anestetik deluje slabše, ker se ga več protonira zunaj celice. Zaloge v lipidnih delih so tako manjše in ga zato hitreje odplavlja iz ekstracelularne tekočine, zaradi česar je anestezija krajša.

2. Teoretični del

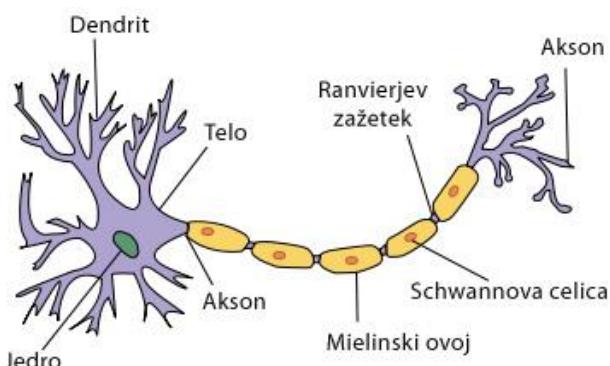
2.1. Zgradba živčnih celic

Osnovna celica živčnega sistema je nevron. Nevroni oddajajo in sprejemajo kemijske in električne signale (1, 25). Imajo celično telo, ki vsebuje celično jedro in druge organele ter dolge, vitke izrastke, imenovane dendriti in aksoni. Dendriti sprejemajo signale iz drugih nevronov in jih prenašajo v celično telo. Aksoni, ki so daljši, prenašajo signale od celičnega telesa do drugih nevronov ali ciljnih celic.

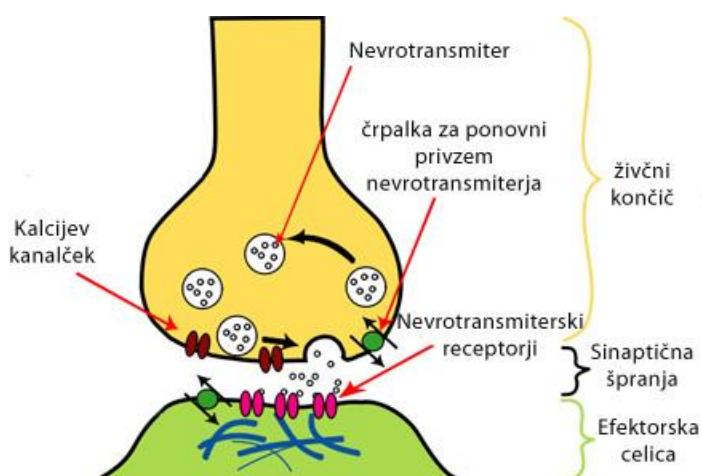
Aksoni so lahko dolgi od nekaj centimetrov do več kot enega metra. Obdani so z mielinsko ovojnico, ki je zgrajena iz navite zunanje membrane Schwanovih celic. Schwannove celice so tipično 40-krat ovite okoli aksona, njihov premer je okoli $2 \mu\text{m}$. Med dvema Schwannovima celicama se nahaja Ranvierjev zažemek, kar omogoča hitro, skokovito prevajanje živčnih impulzov vzdolž aksona. Mielizirani aksoni prevajajo hitreje kot nemielizirani (5).

Sinapsa je stik med dvema živčnima celicama, prek katerega se z živčnimi prenašalci prenašajo živčni impulzi. Sinaptična špranja med dvema živčnima celicama je tipično velika 200 \AA (angstromov) oz. $0.02 \mu\text{m}$ (1, 5, 25).

Slika 1 kaže zgradbo nevrona, slika 2 pa strukturo sinapse.



Slika 1: zgradba nevrona



Slika 2: struktura sinapse

2.2. Mirovni membranski potencial (MMP)

MMP je električni potencial (električna napetost), ki obstaja preko membrane živčne celice, ko leta ni vzdražena. MMP je posledica razlike v koncentraciji ionov na obeh straneh membrane in neenake prepustnosti membrane za različne ione (membrana je izbirno prepustna). Na zunanjji strani membrane je višek pozitivnih nabojev, na notranji pa negativnih, pravimo, da je membrana polarizirana. Znotraj celice prevladujejo veliki negativno nabiti beljakovinski anioni in K^+ , zunaj celice pa Na^+ in Cl^- . MMP lahko izmerimo, znaša - 70 mV. MMP vzdržuje K-Na črpalka, ki z aktivnim transportom (proti gradientu) prenaša iz celice Na^+ ione, v celico pa K^+ ione. Napetostno uravnavani Na^+ in K^+ kanali so zaprti.

2.3. Prenos živčnega signala vzdolž aksona in dogajanje v sinapsi

Prenos živčnih signalov je proces, pri katerem se električni signali prenašajo vzdolž živčne celice iz ene živčne celice v drugo ali iz živčne celice v mišico ali žlezo. Prenos teh elektrokemičnih potencialov imenujemo tudi prenos akcijskih potencialov (1, 6). Ta proces je bistvenega pomena za delovanje živčnega sistema, saj telesu omogoča, da se odziva na dražljaje in uskljuje različne telesne funkcije (35).

Akcijski potencial je hitra prehodna spremembra membranskega potenciala (depolarizacija, repolarizacija) preko membrane aksona živčne celice, ki se pojavi in širi po nevronih. Omogoča prenos informacij, zato je temeljna enota komunikacije (1, 5, 6).

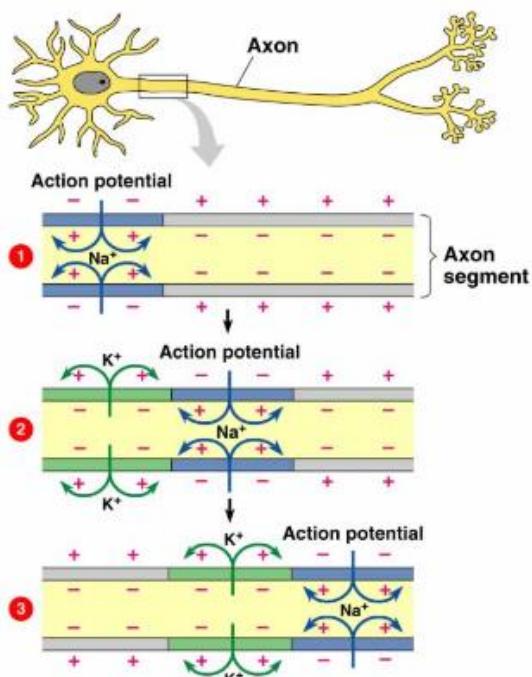
Akcijski potencial nastane ob zadostnem kemičnem ali fizičnem dražljaju (spremembri napetosti na vsaj -55 mV, kar predstavlja prag vzdraženosti), ki aktivira ionske kanale v celični membrani. To ionom zaradi koncentracijskega gradiента omogoči vstop v celico ali izstop iz nje. Pojavlji se razlika v električnem naboju med notranjostjo in zunanjostjo – iz negativne postane pozitivna (+30mV). Temu procesu rečemo depolarizacija, ki sproži širjenje akcijskega potenciala po nevronu (1, 6, 10, 14, 19).

Ko depolarizacijski val prehaja vzdolž nevrona, povzroči odprtje K^+ kanalov (Na^+ kanali se med tem zaprejo). K^+ s pospešeno difuzijo izstopi iz celice, razlika med notranjostjo in zunanjostjo celice ponovno postane negativna. Procesu rečemo repolarizacija. Ker se K^+ kanali zaprejo z zamudo, postane notranjost bolj negativna kot v mirovanju, temu procesu pa rečemo hiperpolarizacija (1, 31).

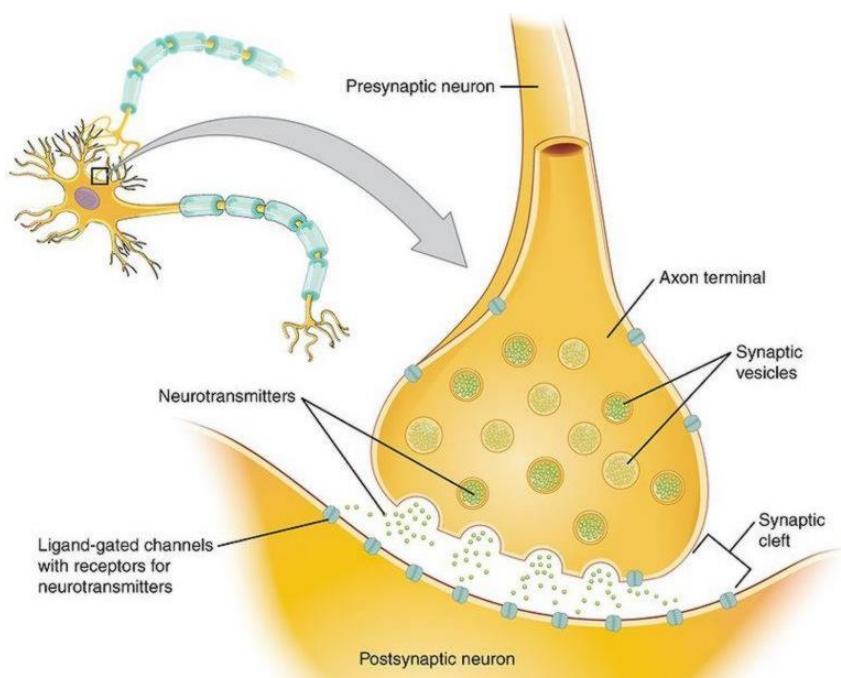
Mirovni membranski potencial z ustreznou razporeditvijo ionov (več K^+ znotraj, več Na^+ zunaj) ponovno vzpostavi Na^+ - K^+ črpalka, ki vrača K^+ v celico, Na^+ pa iz celice.

Ko impulz doseže konec celice, se nevrotransmiterji sprostijo v sinaptično špranjo. To omogoča prenos informacij med nevroni in komunikacijo med različnimi deli živčnega sistema (24, 25, 34).

Slika 3 kaže prenos živčnega signala vzdolž aksona, slika 4 pa dogajanje v sinapsi.



Slika 3: potovanje živčnega impulza vzdolž aksona



BetweenMates.com

Slika 4: dogajanje v sinaptični špranji

Akcijski potencial, ki prispe do živčnega končiča presinaptične celice, povzroči eksocitozo - vezikli z nevrottransmiterji se zlijejo z membrano presinaptične celice in sprostijo nevrottransmiterje v

sinaptično špranjo. Molekule nevrotransmiterjev z difuzijo pridejo do membrane postsinaptične celice, kjer se vežejo na specifične receptorske beljakovine.

Vezava nevrotransmiterjev na receptorske beljakovine povzroči odprtje Na^+ kanalčkov na membrani postsinaptrične celice. Zato skozi membrano stečejo Na^+ ioni in povzročijo depolarizacijo membrane postsinaptične celice.

Živčni impulz nastane le takrat, ko v celico vstopi dovolj Na^+ ionov, da je dosežen prag vzdraženosti. Močnejši kot je dražljaj, več nevrotransmiterjev se sprosti v presinaptični celici, več kanalov se odpre, večja je depolarizacija dendritskega dela. Močnejša depolarizacija dendritskega dela povzroči večje število akcijskih potencialov v določenem času (frekvenca) na aksonu. Jakost dražljaja se torej odraža v številu akcijskih potencialov (živčnih impulzov) v določenem času.

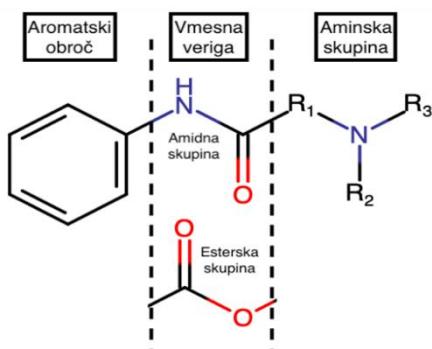
Nekateri nevrotransmiterji postsinaptično celico vzburijo, torej povzročijo depolarizacijo, drugi povzročijo, da se težje vzburi kot sicer (povzročijo hiperpolarizacijo). Ista vrsta transmitterja lahko na nekatere receptorske molekule deluje pospeševalno, na druge pa zaviralno. Tako je od receptorske celice v posinaptični celici odvisen odgovor celice.

2.4. Struktura lokalnih anestetikov

Lokalni anestetiki so sestavljeni iz aminske skupine, ki je z vmesno verigo povezana z aromatskim obročem. Aromatska skupina je lipofilna (hidrofobna), aminska skupina pa hidrofilna. Različne vrste lokalnih anestetikov imajo nekatere posebnosti v aminski ali aromatski skupini, ki povzročajo različno učinkovitost zdravil (5, 24).

Lokalne anestetike delimo na aminoamide in aminoestre. Pri aminoamidih je aromatska struktura na vmesno verigo vezana z amidno vezjo, pri aminoestrih pa se aromatska skupina in vmesna veriga povezujeta z estrsko vezjo. Med obema skupinama je več razlik, med drugim različen način presnove (5, 10, 21, 27). V plazmi se z encimi presnavljajo estrski lokalni anestetiki, ki niso obstojni v raztopini in predstavljajo povečano tveganje za preobčutljivostne reakcije. V jetrih citokromi presnavljajo amidne lokalne anestetike, ki so v raztopini zelo obstojni.

Slika 5 kaže razliko med zgradbo amidoestrov in amidoamidov.



Slika 5: Zgradba amidoestrov in amidoamidov

Predstavnika amidnih lokalnih anestetikov sta bupivakain in lidokain, medtem ko sta estrska lokalna anestetika kokain in prokain.

2.5. Lokalna anestezija v zobozdravstvu in kirurgiji

Lokalna anestezija je zelo pogost postopek, uporabljen v kirurgiji, še posebej v zobozdravstvu. Če zobozdravnik meni, da lahko zobozdravstveni poseg ali poseg na mehkih tkivih povzroči bolečino ali jo poskuša ublažiti, tipično uporabi lokalno anestezijo (26).

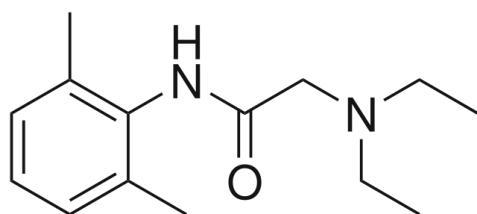
Lokalni anestetiki se običajno injicirajo v tkivo okoli območja, ki ga je treba anestezirati. Zdravilo začne delovati v nekaj minutah in lahko traja več ur, odvisno od vrste uporabljenega anestetika in odmerka (9, 27). Na splošno so varni in učinkoviti, vendar imajo lahko neželene učinke, kot so slabost, bruhanje, omotica in alergijske reakcije (24).

V kirurgiji se lokalni anestetiki prav tako uporabljajo za omrtvičenje okolice kirurškega mesta, da se zmanjša bolečina, ki jo pacient čuti med in po posegu. Uporablja se jih pri spinalnem bloku in pri zdravljenju postoperacijske bolečine. Uporablja se več vrst lokalnih anestetikov, npr. lidokain in mepivakain. Poleg lokalnih anestetikov je mogoče uporabiti tudi druge vrste anestezije, sistemsko anestezijo, ki deluje na celo telo ali regionalno anestezijo, ki deluje le na določen del telesa (npr. spinalni blok) (22).

2.5.1. Lidokain

Lidokain je bil prvi sodobni lokalni anestetik, sintetiziran leta 1943. Od takrat so razvili tudi ostale anestetike: bupivakain, mepivakain, artikain in druge. Vsak od njih ima svoje značilnosti, prednosti in omejitve ter se uporablja, kadar je za to indiciran. Njihova izbira je odvisna od vrste posega, lokacije, trajanja anestezije ter individualnih značilnosti pacienta (21).

Skeletno formulo lokalnega anestetika lidokaina kaže slika 6.



Slika 6: Skeletna formula lidokaina

2.5.2. Kokain kot lokalni anestetik

Kokain je snov z biološkim učinkom, ki ga pridobivajo iz listov koke, rastline, ki izvira iz Južne Amerike. V uporabi je bil daleč pred sintezo ostalih lokalnih anestetikov. Po njem so posegali starci Inki v Andih v Južni Ameriki že pred prihodom Špancev. Uporabljali so ga začelo kot poživilo, anestetik ter sredstvo za izboljšanje vzdržljivosti in zmogljivosti. Listi koke so žvečili, da bi dobili energijo ter zmanjšali lakoto in utrujenost (3, 11, 19, 21, 23).

Leta 1859 ga je iz listov koke izoliral Albert Niemann. Klinični posegi so takrat potekali brez anestezije in Carl Koller je kokain uporabil pri operaciji ter opazil anestetični učinek. Začel ga je uporabljati v očesni kirurgiji. Zanimanje za kokain je naraslo, kmalu pa je začelo veliko pacientov med operacijami umirati zaradi prevelikih odmerkov. Mathew Hall je prvi uporabil kokain v zobozdravstvu. Napisal je članek o tej drogi, a je spregledal njen zasvojilnost. Tudi sam se je trudil, da bi se zasvojenosti znebil. V Združenih državah Amerike so bile leta 1885 na voljo kapljice kokaina za lajšanje zobobola (10, 12, 19, 21, 23, 26).

Leta 1863 je pariški kemik Angelo Mariani zvaril kokainsko vino in ga prodajal pod imenom Vin Mariani. Pijača je hitro postala zelo priljubljena predvsem med kulturno srenjo. Ameriški farmacevt John Stith Pemberton je leta 1886 ustvaril Coca-Cola – pijačo iz kokaina in sladkega sirupa. Postala je zelo priljubljena, vendar je podjetje leta 1903 kokain umaknilo iz svojih izdelkov, kar je bilo po vsej verjetnosti posledica strožjih predpisov. Pemberton je prav tako ustvaril svojo verzijo kokinega vina. V začetku 20. stoletja so izdelovali tudi antiseptične bonbone s kokainom. Priporočali so jih pri vnetem grlu, kašlu in hripavosti ter za vse, ki so morali veliko govoriti. Leta 1914 so kokain z zakonom prepovedali (13, 23).

V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je postala priljubljena kristalizirana oblika droge – crack kokain, ki ga tipično kadijo. Bil je cenejši kot kokain in bolj zasvajajoč (11, 19, 23, 29).

Na sliki 7 vidimo napis s steklenice, v kateri so bile shranjene kokainske kapljice za lajšanje zobobola.



Slika 7: Napis na steklenici, kjer je bila shranjena raztopina kokaina za lajšanje zobobola iz leta 1885

Kokain se je v zgodovini pogosto uporabljal v medicini in se še danes uporablja v otorinolaringologiji, pri operacijah nosu in solzovoda. Ker je močan lokalni anestetik, ki omrtviči področje, kamor ga nanesemo, in hkrati vazokonstriktor, ki povzroči krčenje žil, se pogosto uporablja pri operacijah nosu, kjer je visoko zaželjena hkratna anestezija in vazokonstrikcija. Za

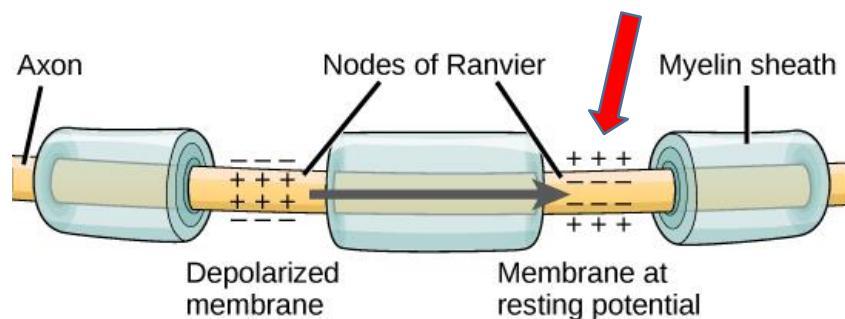
posege se tipično uporablja zelo razredčena raztopina in količina uporabljenega kokaina je tako majhna, da nima večjega psihotropnega efekta (29).

Za povečanje teže ga preprodajalci drog mešajo z različnimi snovmi, najpogosteje s sodo bikarbono in lidokainom (29, 30).

2.5.2.1. Farmakologija kokaina

Kokain inhibira (zaustavlja) od napetosti odvisen natrijev kanal, inhibira ponovni prevzem adrenalina, poleg tega pa še dopaminski transporter. To pomeni, da se koncentracija dopamina v dopaminergičnih nevronih v centralnem živčnem sistemu poveča, zato povzroča prijeten občutek. Dopaminergični nevrone se nahajajo le v centralnem živčnem sistemu, medtem ko so od napetosti odvisni natrijevi kanali na aksonih vseh tipov nevronov (5, 10, 21, 28). Kokain povzroči, da se koncentracija dopamina, serotoninu in noradrenalina v možganih poveča. Ti nevrotransmiterji imajo v telesu številne funkcije. Skrbijo za občutek sreče, samozavesti in navdušenja, preprečujejo utrujenost in povečujejo zmogljivost. To so razlogi, zaradi katerih ljudje kokain uporabljajo v rekreativne namene (29).

Noradrenalin, dopamin in serotonin pomagajo uravnavati tudi krvni talk, telesno temperature in srčni utrip, raven sladkorja v krvi, razpoloženje in telesno težo, spanje.



Slika 8: Mesto vstopa lokalnega anestetika

Na sliki 8 puščica kaže mesto, kamor vstopi lokalni anestetik skozi membrano in iz notranje strani inhibira (zamaši) natrijev kanal.

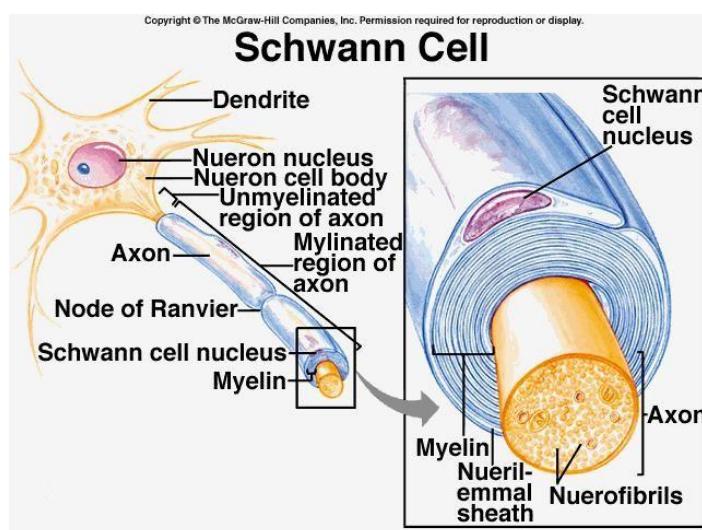
2.5.2.1.1. Inhibicija od napetosti odvisnega Na^+ kanala

Ko nastane živčni impulz, se odprejo napetostno odvisni natrijevi kanali in omogočijo pretok natrijevih ionov v celico, kar povzroči spremembo električnega potenciala v celični membrani. Sprememba električnega potenciala sproži sproščanje nevrotransmiterjev, ki prenašajo informacije med nevroni (5, 6).

Ko se nevrotransmiterji sprostijo, se vežejo na receptorje na drugih nevronih in prenesejo impulz do teh celic. Ta proces prenosa impulza z enega nevrona na drugega imenujemo nevrotransmisija in je bistveni del delovanja živčnega sistema, saj omogoča hitro sporočanje informacij med različnimi deli telesa.

Pri delovanju kokaina ima ključno vlogo njegov vstop skozi Ranvierjev zažemek, ki se nahaja med dvema Schwannovima celicama. Ko kokaín vstopa v celico, prehaja skozi membrano in večina ga tam ostane. Ko pride v celico, se veže na napetostno odvisne natrijeve kanale in jim prepreči, da bi se odprli, kar blokira pretok natrijevih ionov v celico, prepreči prenos živčnih impulzov in začasno onemogoči delovanje nevrona (1, 5, 8).

Slika 9 prikazuje zgradbo Schwannove celice.



Slika 9: zgradba Schwannove celice

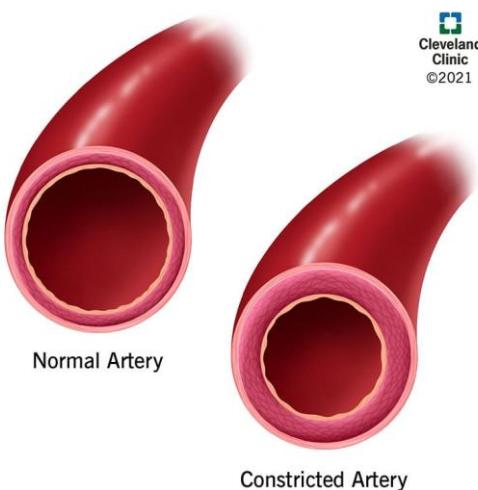
2.5.2.1.2. Inhibicija dopaminskega transporterja

Kokain deluje tako, da v dopaminergičnih nevronih v centralnem žičnem sistemu zavira ponovni privzem nevrotransmiterjev, v glavnem dopamine, deloma pa tudi adrenalina in noradrenalina. To povzroči kopiranje teh nevrotransmiterjev v sinaptični špranji, zaradi česar se poveča aktivnost postsinaptičnih dopaminskih receptorjev. Povišan nivo dopamine v sinapsi je odgovoren za občutke sreče, samozavesti, vznemirjenja, preprečuje utrujenost, uravnava telesno temperaturo, krvni tlak, srčni utrip, itd. Ker se zaradi kokaina začne zadrževati v sinapsi, ima kokain psihotropni efekt (5, 29).

2.5.2.1.3. Inhibicija ponovnega prevzema adrenalina

Na periferiji kokain zavira tudi ponovni privzem adrenalina, hormona, ki se sprošča kot odziv na stres in povečuje srčni utrip, krvni tlak in pretok krvi v mišice. To povzroči vazokonstrikcijo ali zožitev krvnih žil, kar lahko privede do povišanega krvnega tlaka in drugih kardiovaskularnih učinkov. Vazokonstrukcija znatno zmanjša krvavenje pri kirurških posegih (5, 9, 10).

Razliko med normalno in zoženo žilo kaže slika 10, izgled tkiva pri vazokonstrikciji pa slika 11.



Slika 10: vazokonstrikcija



Slika 11: izgled tkiva pri vazokonstrikciji

2.5.2.1.4. Stranski učinki

Kokain je relativno varna droga. Kronično jemanje lahko vodi do nekroze nazalnega septuma, ki je posledica vazokonstrikcije. Srčni infarkt je nevaren za starejše uživalce s pridruženimi kardiovaskularnimi patologijami. Ob redni uporabi srčna mišica lahko izgubi elastičnost in se ne more več krčiti, kar lahko privede do srčnega popuščanja in posledično do odpovedi srca. Poleg tega redno uživanje kokaina nekoliko poveča tveganje za depresijo ali druge psihične motnje (anksioznost, obsedenost, psihozu) in skrajno duševno odvisnost. Druga tveganja vključujejo možansko kap (5, 11, 29, 30).

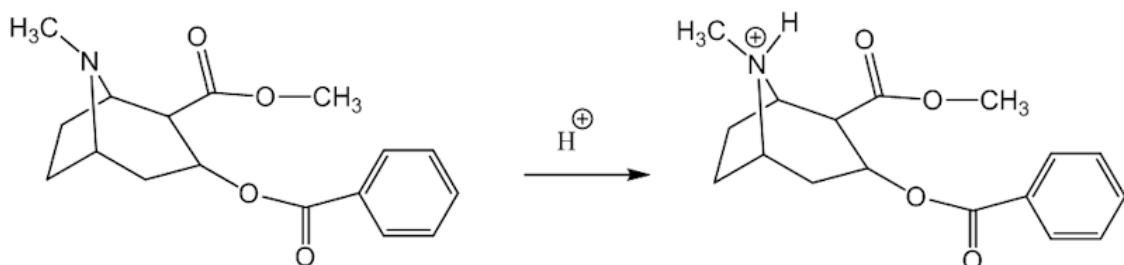
Za kokain je značilen hiter začetek delovanja (30-45 sekund) in kratko trajanje delovanja (30-90 minut, nekateri učinki trajajo 1-4 ure). Tipični učinki vključujejo večjo samozavest, občutek večje duševne in telesne zmogljivosti, večjo sposobnost koncentracije, evforijo, povečan krvni talk in srčni utrip, izgubo apetita, krčenje žil, disinhibicijo (zmanjšan nadzor nad mislimi in vedenjem). Poznejše redoziranje je pogosto (30).

2.5.3. Protoniranje kokaina

Protonacija je kemijski proces kjer molekula prevzame proton iz kisle vodne okolice. Razumevanje protonacije kokaina je ključno pri preučevanju njegove biološke aktivnosti, farmakokinetike in njegovih interakcij z natrijevim kanalom. Gre za proces dodajanja protona (H^+) molekuli kokaina. Ta reakcija lažje poteče v kislem okolju. Zaradi protonacije postane molekula kokaina bolj polarna, kar poveča njeno topnost v vodi ali drugih polarnih topilih. Ko je kokain protoniran, se lažje absorbira v krvni obtok, saj postane bolj hidrofilen, kar pomeni, da ima bolj ugodno hidratacijsko energijo (5) in se zato bolje raztopi v polarnem topilu. To vpliva na njegovo hitrost delovanja, absorpcijo v telesu in vezavo na ciljne receptorje (2, 16, 27).

Neprotoniran kokain pa ima raje nepolarno okolico. To pomeni, da se raje raztopi v maščobah, membranah in drugih nepolarnih okoljih, kot v vodnem mediju, kar je pomembno za razumevanje njegove porazdelitve v telesu.

Reakcija protoniranja kokaina je prikazana na sliki 12.



Slika 12: Shema protoniranja molekule kokaina

2.5.4. Fizikalno-kemijske lastnosti kokaina

Kokain je alkaloid z bazičnimi lastnostmi. V obliki proste baze je netopen v vodnem okolju ter ima vrelišče 187 °C. Njegova ionizirana hidrokloridna sol pa se zlahka raztopi v vodi in je zelo stabilna pri visokih temperaturah. V tabeli 1 so prikazane nekatere fizikalne in kemijske lastnosti obeh oblik kokaina (5, 19).

Tabela 1: fizikalne in kemijske lastnosti kokaina

Oblika kokaina	Kokain hidroklorid	Kokain v obliki proste baze
drugo ime	kokainski prah	crack
molekulska formula	$C_{17}H_{22}CINO_4$	$C_{17}H_{21}NO_4$
tališče	195 °C	98 °C
vrelišče	-	187 °C
topnost v vodi	1,66 g/ml	1.7×10^{-3} g/mL
pKa (pri 15 °C)	-	8.61
P_{O/W}	-	$10^{2.31} = 204$
Log P	-	2,31

$P_{O/W}$ je porazdelitveni koeficient oktanol/voda. Pove nam, da je koncentracija kokaina v oktanolu 204-krat večja kot v vodi. Kokain se torej raje nahaja v celični membrani.

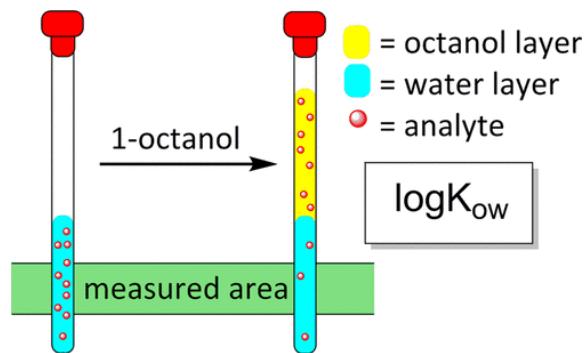
2.6. Porazdelitveni koeficient oktanol/voda

Kako hidrofobna je spojina, določa porazdelitveni koeficient oktanol/voda. To je razmerje med koncentracijo določene spojine v vodi kot polarnem topilu in oktanolu kot nepolarnem topilu. Porazdelitveni koeficient se uporablja za izračun proste energije pri prehajanju snovi iz polarnega v nepolarno topilo in obratno. Je izjemno pomemben parameter, ki se uporablja v farmakokinetiki in toksikologiji za opis porazdelitve spojine v telesu (2, 7, 32).

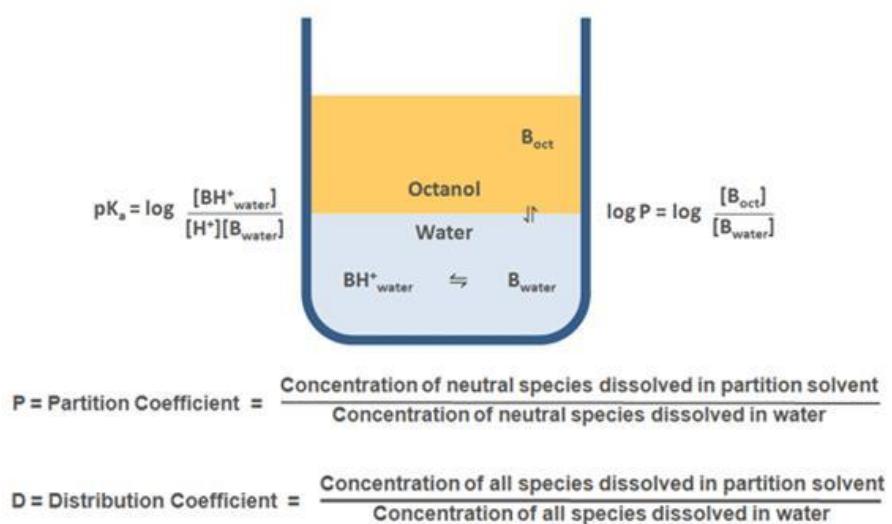
Določi se ga z merjenjem koncentracije spojine v oktanolu in v vodi. Izračuna pa se ga kot razmerje med koncentracijo spojine v oktanolu in koncentracijo spojine v vodi. V oktanol se bo bolj porazdelila spojina z visokim porazdelitvenim koeficientom, v vodo pa se bo bolj porazdelila spojina z nizkim porazdelitvenim koeficientom.

Koeficient nam napove, kako se bo spojina porazdelila med različnimi tkivi in organi glede na njihovo lipidno vsebnost. Spojine z visokim porazdelitvenim koeficientom so običajno bolj topne v lipidih, zato se lažje razporedijo v tkivih z visoko lipidno vsebnostjo, kot so na primer možgani in jetra. Spojine z nizkim porazdelitvenim koeficientom pa so bolj topne v polarnih topilih, zato se porazdelijo v tkiva z manjšo vsebnostjo lipidov (npr. pljuča) oziroma ostajajo v plazmi.

Slika 13 prikazuje prehod delcev iz polarnega v nepolarno topilo, slika 14 pa izračun porazdelitvenega koeficiente.



Slika 13: Prehod delcev iz polarnega v nepolarno topilo.



Slika 14: Shema izračuna porazdelitvenega koeficienta.

3. Metode

V naši raziskavi smo delo izvedli *in silico*, torej z uporabo računalnika. Prvega raziskovalnega vprašanja smo se lotili z numeričnim reševanjem enačbe Smoluchowskega. Izdelali smo graf in iz grafa samega, torej iz simulacije, ocenili čas prehoda. Ni se ga dalo namreč analitično izračunati. Oceniti pa nismo mogli dejanskega časa, ampak le red velikosti prehoda.

Enako smo tudi na drugo in tretje vprašanje odgovorili z metodami fizikalne kemije. Izračunali smo količino kokaina v ekstracelularni tekočini, v membrani in v aksoplazmi. Iz rezultatov smo potem sklepali, zakaj pri acidozi deluje slabše.

3.1. Prehod kokaina preko membrane in potencial srednje sile

Zaradi hidrofobnosti molekule kokain lahko prehaja skozi lipidni dvosloj membran živčnih celic (1, 17, 36). Skozi Ranvierjev zažemek vstopi v membrano, kjer ga večina ostane (5, 8). Ko pride v celico, začasno onesposobi funkcijo nevrone, saj iz notranje strani inhibira natrijev kanal (19, 21, 32). To povzroči začasno blokado prenosa živčnih signalov. Poleg tega se ga velika količina nabere v Schwannovih celicah, membranah ostalih celic in okoliškem adipoznem tkivu.

Zanimalo nas je, kolikšna količina kokaina bi se nahajala v ekstracelularni tekočini, v mebrani in v aksoplazmi celice, če bi ga zdravnik vbrizgal na operacijsko mesto (2. raziskovalno vprašanje). Naši raziskovalni metodi sta bili računanje in analiziranje podatkov. Za izračun smo uporabili program, napisan v programskem jeziku Python. Razvil ga je kolega Jakob Kralj. Pri tem smo uporabili enačbi za izračun proste energije in enačbo Boltzmannove porazdelitve.

Prosto energijo vzdolž reakcijske koordinate, ki jo dobimo iz eksperimentalnih podatkov in s simulacijami molekularne dinamike, imenujemo potencial srednje sile, tudi PMF (angleško: potential of mean force). Omogoča razumevanje osnovne energetike in termodinamike sistema, med drugim pa je pomemben tudi za študij vezave učinkovin (2, 17, 36).

Za izračun PMF se običajno uporablajo simulacijske tehnike, kot sta umbrella sampling in termodinamska perturbacija. Ta metoda vključuje obsežno vzorčenje konfiguracijskega prostora sistema v kontekstu molekularnih simulacij, pri čemer se vzorce pridobi s pomikom sistema vzdolž izbrane reakcijske koordinate z uporabo virtualnega potenciala. Nato se na podlagi pridobljenih vzorcev izračuna povprečni potencialni profil, ki predstavlja PMF.

Večnivojska simulacija PMF za prenos ionizabilne zvrsti presega nivo te naloge. Zato smo PMF konstruirali iz eksperimentalnih podatkov.

$$\Delta G = k_B T \cdot \ln(10) \cdot (pK_a - pH)$$

$$\Delta G_m = - k_B T \cdot \ln(K)$$

$$P_i = e^{-G_i/kT} / \sum e^{-G_j/kT}$$

V teh enačbah je G prosta energija, k_B Boltzmannova konstanta, T konstantna temperatura, \ln naravni logaritem. K je $P_{O/W}$ oz. ravnotežna konstanta oktanol/voda. P je delež kokaina, e je baza naravnega logaritma, ki ima vrednost 2,71...

3.2. Difuzija in difuzijska enačba

Difuzija je proces, pri katerem se molekule premikajo v smeri padajočega koncentracijskega gradienta oz. z območja z višjo koncentracijo na območje z nižjo koncentracijo snovi. Je posledica naključnega gibanja delcev, ki se trkajo in spreminja smer, dokler se snov enakomerno ne porazdeli v prostoru (2, 5, 15, 18).

Difuzijo snovi lahko predvidevamo z difuzijsko enačbo, ki je parcialna diferencialna enačba (33). V treh dimenzijah je difuzijska enačba:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \nabla^2 C$$

v eni dimenziji pa:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

V tej enačbi $\frac{\partial C}{\partial t}$ predstavlja spremembo koncentracije snovi C v času t , D difuzijski koeficient, ki opisuje hitrost difuzije snovi, $\nabla^2 C$ pa Laplaceov operator koncentracije, ki izraža koncentracijski gradient in opisuje, kako se koncentracija spreminja v prostoru. x je razdalja, ki jo snov prepotuje.

Difuzijska enačba nam pomaga razumeti, kako se koncentracija snovi zaradi difuzije spreminja v času in prostoru. Na levi strani enačbe imamo spremembo koncentracije snovi v času, medtem ko desna stran opisuje, kako hitro se koncentracija spreminja v prostoru zaradi naključnega gibanja delcev.

Vendar pa difuzija ni omejena le na prenos delcev v smeri koncentracijskega gradienta. Tudi drugi dejavniki lahko vplivajo na gibanje molekul, kar povzroči difuzijo v nasprotni smeri. En tak primer je prisotnost bolj ugodnega okolja za delce (5). Na primer, vemo, da se molekule kokaina raje nahajajo znotraj celične membrane in v aksoplazmi, kjer imajo nižjo prosto energijo v primerjavi z ekstracelularno tekočino. V tem primeru se poleg koncentracijskega gradienta kot gonilna sila difuzije pojavlja tudi kemijski potencial, ki ga najdemo v enačbi Smoluchowskega, različici difuzijske enačbe, ki smo jo uporabili pri analizi širjenja kokaina v različnih delih celice (4). V eni dimenziji je enačba Smoluhowskega:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla \cdot \left[D \cdot (\nabla u + \frac{1}{k_B T} \cdot (u \cdot \nabla \mu)) \right]$$

V tej enačbi je $\frac{\partial C}{\partial t}$ sprememba koncentracije snovi u v času t, ∇ gradient, D difuzijski koeficient, k_B Boltzmanova konstanta, T konstantna temperatura, u koncentracija snovi in μ kemijski potencial.

Difuzijski koeficient za kokain v vodi je približno $11 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ (eksperimentalno določeno) (4).

Enačbo smo rešili numerično z metodami končnih razlik. Program, napisan v programskem jeziku Python, se nahaja spodaj pri rezultatih, razvil ga je Jakob Kralj.

3.2.1. Približna enačba za čas difuzije

Pri preučevanju difuzije je koristno oceniti čas, ki ga snov potrebuje za difuzijo na dani razdalji. To nam pomaga razumeti, koliko časa traja potovanje molekul in ionov. Difuzijski čas je odvisen od temperature, koncentracije molekul, velikosti molekul in lastnosti snovi, v kateri poteka difuzija. Za računanje časa, potrebnega za difuzijo, lahko uporabimo statistično oceno Brownovega gibanja. Brownovo gibanje je naključno gibanje delcev zaradi njihovega nenehnega trkanja z molekulami v okolini, zaradi česar se gibljejo neurejeno v vse smeri (5, 20).

$$t \approx \frac{x^2}{D}$$

V tej enačbi je t čas, potreben za difuzijo, x je razdalja, ki jo morajo prepotovati molekule, D pa je difuzijski koeficient.

Difuzija je pasivna oblika transporta in tabela 2 kaže, da je za daljše razdalje prepočasna za fiziološke procese. V tabeli 2 lahko vidimo vrednosti difuzijskega časa, ki se navezujejo na difuzijo O_2 . Vidimo lahko, da so difuzijski časi za daljše razdalje precej dolgi, zato za velike večcelične organizme samo difuzija ni dovolj za oskrbo presnovno aktivnih celic globoko v tkivih. V ta namen imajo razvit kardiovaskularni sistem za prenos hranič v vse celice telesa. Pri sesalcih je obtočni sistem tak, da nobena celica ni več kot približno $10\mu\text{m}$ oddaljena od kapilare. To zagotavlja pravilno prehrano in odstranjevanje odpadkov za vse celice telesa (20).

Tabela 2: razdalja in približno potreben čas za potovanje molekul O₂ z difuzijo

Razdalja	Približno potreben čas
10 nm	23.8 ns
50 nm	595 ns
100 nm	2.38 µs
1 µm	238 µs
10 µm	23.8 ms
100 µm	2.38 s
1 mm	3.97 min
1 cm	6.61 h
10 cm	27.56 dni

Če bi imeli podano razdaljo med mestom injeciranja in živčno celico, bi s pomočjo difuzijskega koeficiente za kokain v vodi, katerega eksperimentalno določena vrednost je približno $11 \cdot 10^{-9}$ m²/s lahko izračunali, koliko časa bi molekule kokaina potovale od mesta injeciranja do živčne celice. Posledično bi lahko izračunali tudi točen čas do začetka delovanja anestetika.

4. Rezultati

4.1. Prehod kokaina preko membrane in izračuni z uporabo potenciala srednje sile

Želeli smo ugotoviti, koliko kokaina bi bilo prisotnega v ekstracelularni tekočini, membrani in aksoplazmi celice, če bi ga zdravnik vbrizgal v bližino živca. Za izračun smo uporabili programski jezik Python in se poslužili enačbe Boltzmannove porazdelitve.

Skica spodnjega grafa prikazuje prosto energijo, ki jo imajo molekule kokaina v ekstracelularni tekočini, membrani in aksoplazmi, t.j. citoplazma znotraj aksona. Podatke na skici smo dobili s pomočjo te enačbe:

$$\Delta G = k_B T \cdot \ln(10) \cdot (pK_a - pH)$$

$$k_B T = \text{Boltzmannova konstanta} \cdot \text{konst. temperatura} = 0,59 \text{ kcal/mol}$$

$$\ln(10) = 2,303$$

$$0,59 \text{ kcal/mol} \cdot 2,303 = 1,36 \text{ kcal/mol} \text{ (enote v nadaljevanju niso napisane zaradi preglednosti)}$$

$$pH_1 = 7,1 \text{ (znotraj celice)}$$

$$pH_2 = 7,4 \text{ (zunaj celice)}$$

$$G_1 = 1,36 \cdot (pK_a - pH_1)$$

$$G_2 = 1,36 \cdot (pK_a - pH_2)$$

$$\Delta G = G_1 - G_2$$

$$\Delta G = 1,36 \cdot (pK_a - pH_1) - (1,36 \cdot (pK_a - pH_2))$$

$$\Delta G = 1,36 \cdot pK_a - 1,36 \cdot pH_1 - 1,36 \cdot pK_a + 1,36 \cdot pH_2$$

$$\Delta G = -1,36 \cdot pH_1 + 1,36 \cdot pH_2$$

$$\Delta G = 1,36 \cdot (pH_2 - pH_1)$$

$$\Delta G = 0,59 \text{ kcal/mol} \cdot 2,303 \cdot (7,4 - 7,1) = 0,408 \text{ kcal/mol}$$

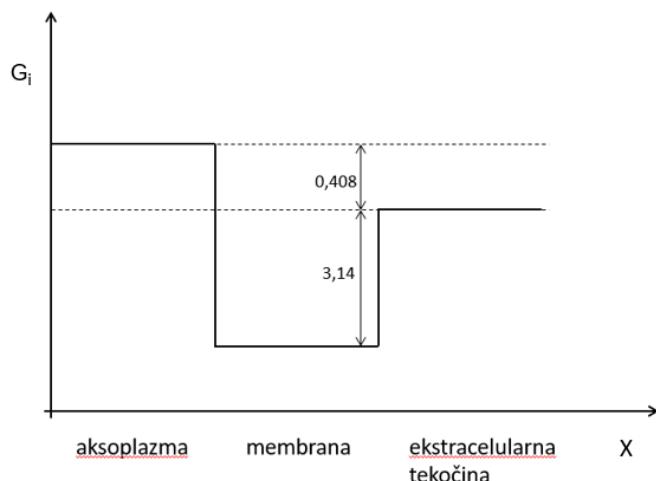
Razlika med prosto energijo molekul zunaj in znotraj celice je 0,408 kcal/mol. Prosto energijo molekul v membrani pa dobimo z enačbo:

$$\Delta G_m = -k_B T \cdot \ln(K)$$

$$K = P_{O/W} = \text{ravnotežna konstanta oktanol/voda} = 204$$

$$\Delta G_m = -0,59 \text{ kcal/mol} \cdot \ln(204) = -3,14 \text{ kcal/mol}$$

Razlika med notranjostjo celice in membrano celice pa je 3,14 kcal/mol.



Slika 15: Skica količine proste energije (ni narisana v merilu) kot funkcija reakcijske koordinate

G_i – prosta energija, ki smo jo izračunali [kcal/mol]

X – os, ki poteka čez membrano

Sedaj smo poznali le razliko potencialov, zato smo se odločili, da bo G_i v membrani 0 kcal/mol:

$$G_e = 3,14 \text{ kcal/mol} + 0,408 \text{ kcal/mol}$$

$$G_m = 0 \text{ kcal/mol}$$

$$G_a = 3,14 \text{ kcal/mol}$$

Delež kokaina v ekstracelularni tekočini, membrani ali aksoplazmi celice pove enačba Boltzmannove porazdelitve, ki smo jo na koncu pomnožili s 100, da smo dobili deleže v odstotkih:

$$P_i = e^{-G_i/kT} / \sum e^{-G_i/kT}$$

$$P_i = \text{delež kokaina}$$

$$e = 2,71\ldots \text{ (konstanta)}$$

$-G_i$ = potencial

kT = Boltzmannova konstanta · konst. teperatura = 0,59 kcal/mol

$$\sum e^{-G_i/kT} = \text{vsota vseh } e^{-G_i/kT}$$

V nadaljevanju smo si pomagali s programskim jezikom Python in izračunali deleže v odstotkih:

```
In [2]: g1 = 3.14
g2 = 0
g3 = 3.14 + 0.408
kT = 0.59

Out[2]: 0.59

In [3]: f(G_i) = exp(-G_i/kT)
Out[3]: f (generic function with 1 method)

In [4]: k = f(g1) + f(g2) + f(g3)
Out[4]: 1.0073281812919004

In [5]: p1 = f(g1)/k
p2 = f(g2)/k
p3 = f(g3)/k

Out[5]: 0.00242757907741697

In [9]: p1*100
Out[9]: 0.48472906502441254

In [10... p2*100
Out[10]: 99.27251302723388

In [11... p3*100
Out[11]: 0.242757907741697

In [ ]:
```

Slika 16: Potek računanja deleža kokaina v aksoplazmi, membrani in ekstracelularni tekočini

In [2] : definirali smo vse G_i in kT

Out [2] : ni relevantno

In [3] : $f(x) = e^{-G_i/kT}$

Out [3] : definirali smo funkcijo

In [4] : izračunali smo $\sum e^{-G_i/kT}$

Out [4] : računanje enačbe P_i (prvi del)

In [5] : izračunali smo $e^{-G_i/kT}/\sum e^{-G_i/kT}$ za ekstracelularno tekočino, mebrano in aksoplazmo

Out [5] : računanje enačbe P_i (drugi del)

In [9], In [10] in In [11] : množili smo s 100, da smo dobili odstotke

Out [9], Out [10] in Out [11] : dobili smo rezultate

Na zgornji način smo določili količine kokaina, ki bi se nahajale zunaj živčne celice, v membrani ter v notranjosti, če bi ga zdravnik uporabil med operacijo na zdravem tkivu, ki ne bi bilo vneto oz. zakisano. Osredotočili smo se predvsem na vpliv pH vrednosti okolja na anestetike. V vnetih tkivih je le-ta nižja, kar lahko vpliva na njihovo učinkovitost. Zato smo izračune naredili pri nižji pH vrednosti, da bi pridobili vpogled v morebitne razlike v količini kokaina glede na okolje s spremenjeno pH vrednostjo. S tem smo žeeli razjasniti, kako acidozna vpliva na porazdelitev kokaina v različnih delih celice (drugo in tretje raziskovalno vprašanje).

Legenda:

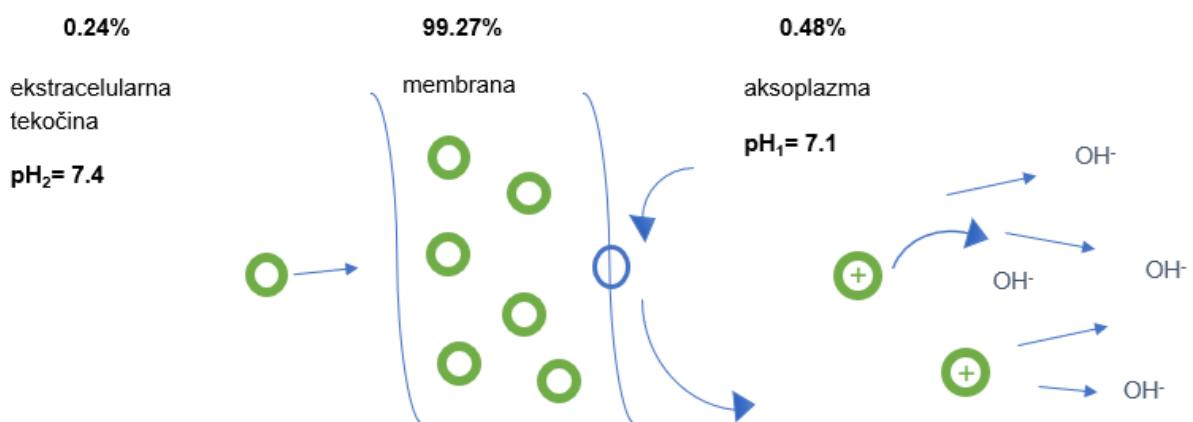
○ ... molekule nevtralnega kokaina

⊕ ... protoniran kokain

OH^- ... hidroksidni ion (predstavlja bolj kislo okolje)

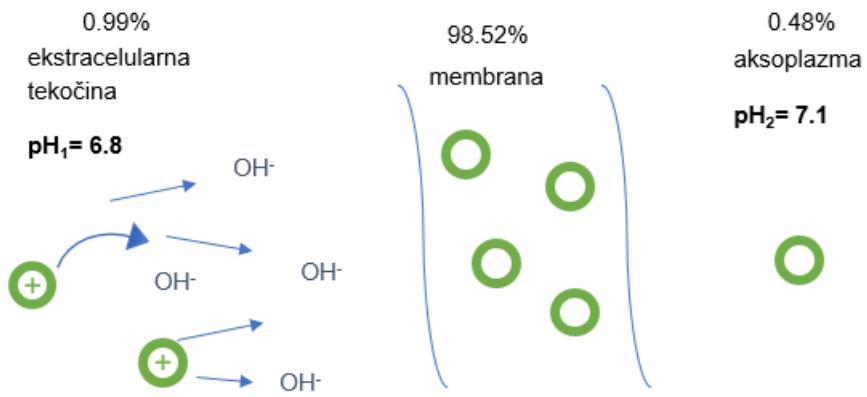
→ ... pot molekul kokaina (kam prehajajo)

Za prikaz kislega okolja smo hidroksidni ion uporabili zato, ker se kokain v notranjosti celice protonira, torej sprejme H^+ ion od H_2O , ki se nahaja v celici, in tako nastanejo hidroksidni ioni, ki potem poskušajo nevtralizirati okolje.



Slika 17: Skica prehoda kokaina čez membrano pri fizioloških pogojih in količina, ki se nahaja v posameznem delu celice [%]

Vnetna tkiva, ki imajo nižjo pH vrednost, vplivajo na delovanje kokaina kot anestetika. Zaradi kislega okolja se kokain protonira že zunaj celice. To povzroči, da se manjši delež kokaina prebije do aksona, kar lahko zmanjša njegov anestetični učinek. Ko smo določali deleže kokaina v vnetem tkivu, smo uporabili enak pristop kot pri zdravem tkivu. S pomočjo izračunov smo ugotovili, kako se kokain razporedi med različnimi deli celice in kako kislo okolje vpliva na to porazdelitev.



Slika 18: Skica prehoda kokaina čez membrano pri vnetem tkivu in količina kokaina v posameznih delih [%]

V membrano pride manjši delež kokaina zato, ker ga kapilare v živcu hitreje odplavljajo.

4.2. Izračun hitrosti difuzije

Z numeričnimi metodami fizikalne kemije smo rešili enačbo Smoluchowskega. Kodo, tipičen profil med simulacijo in število, kako hitro gre lokalni anestetik skozi membrano, je kolega Jakob Kralj napisal v programu Python, vidimo pa jo na spodnji sliki. Čas prehoda je ocenjen iz grafa samega – ne da se ga namreč analitično izračunati. Ocenila pa nisva dejanskega časa prehoda, ampak red velikosti prehoda – prehod je reda nanosekunda.

Koda računa rešitev enačbe Smoluchowskega s pomočjo metode končnih razlik, ki za odvod uporabi približek razlike dveh točk, ki sta si skupaj dovolj blizu, tako da preposto izračuna koeficient premice med njima. Enočba Smoluchowskega poleg tega vključuje še potencial srednje sile. Ta v tem primeru matematično opredeli težnjo hidrofobnega lokalnega anestetika, da bi bil v prav tako nepolarni membrani. To je opredeljeno z izračunom energije; kot drugje v naravi prav tako tukaj snov teži k temu, da bi bila v stanju z najmanj energije (zato je v membrani PMF definiran kot -1) (38).

```

import numpy

from matplotlib import pyplot


L = 1 #dolžina v poljubnih enotah

J = 100 #količino točk, na katero je razkosana dolžina


T = 100 #čas v poljubnih enotah

N = 100000 #število časovnih korakov


N_druck = 1000 # število korakov, na katero se izpisuje statistika


D = float(1.) / float(100.) #koeficinet difuzije

kT=1 # bolzmanov konstanta pomnožena s temperaturo


DIRICHLET = True #ali bomo uporabljali konstanten robni pogoj


dx = float(L)/float(J-1) # razlika v x med dvema točkama

x_grid = numpy.array([j*dx for j in range(J)])


dt = float(T)/float(N-1) # razlika med dvema časovnima korakoma

t_grid = numpy.array([n*dt for n in range(int(N/N_druck))])


pmf = [0 if x<int(J/2-10) or x>int(J/2+10) else -1 for x in range(J)] #potencial srednje sile - membrana je na -1, ostalo je 0


no_high = 15

U = numpy.array([0.1 for i in range(no_high,J)] + [2. for i in range(0,no_high)])


def d_dx(array, index): #izračunaj odvod

    return (array[index+1]-array[index-1])/(2*dx)

def d2_dx2(array, index): #izračuanj drugi odvod

    return (array[index+1]-2*array[index]+array[index-1])/(dx**2)


pmf_new = [0 for i in range(len(pmf))] #mesto za poglajen pmf

```

```

smooth = 5 #število ponovitev poglavjanja

#spodnja koda pogladi pmf, tako, da ni prehodi niso preveč ostri, kar bi privedlo do ogromnih odvodov, kar bi lahko uničilo
simulacijo

for i in range(smooth):

    for j in range (1,len(pmf)-1):

        pmf_new[j] = (pmf[j-1]+pmf[j+1]) / 2

    pmf = [a for a in pmf_new]

#ker se pmf ne spreminja, lahko odvode pmf izračunamo kar v naprej

damju = numpy.array([0]+[d_dx(pmf,i) for i in range(1,J-1)]+[0])

d2amju = numpy.array([0]+[d_dx(damju,i) for i in range(1,J-1)]+[0])

print(damju)

print(d2amju)

#za lažje računanje konstante združimo skupaj v dva člena

alpha = D*dt/(dx**2)

beta = D*dt/(2*kT*dx)

print(alpha, beta)

#koncentracijo shranimo v U

U_record = []

U_record.append(U)

i_total = numpy.sum(U)

U_new = [0 for i in range(len(U))]

#za vsak korak izračunamo novo koncentracijo s pomočjo enačbe smolohovskega

for ti in range(1, N):

    for i in range(1,J-1):

        U_new[i] = U[i] + (

            alpha * (U[i-1] - 2 * U[i] + U[i+1]) +

            beta * 2*dx* ( U[i] * d2amju[i] ) +

            beta * (U[i+1] - U[i-1]) * damju[i]

```

```

    )

# upošrevamo pogoje na robu

if DIRICHLET:

    U_new[0] = U[0] + alpha * (2 * U[1] - 2 * U[0])

    U_new[-1] = U[-1] + alpha * (2 * U[-2] - 2 * U[-1])

#prenesemo nov U v star U pred naslednjim izvajanjem

U = [a for a in U_new]

#izpisovanje

if (ti % N_druck) == 0:

    U_record.append(U)

    m_balance = numpy.sum(U)/i_total

    print(f"(t={ti}, MB={m_balance})")

#prikaz grafov

pyplot.ylim((0., 2.1))

pyplot.xlabel('x')

pyplot.ylabel('concentration')

pyplot.plot(x_grid, U)

pyplot.show()

U_record = numpy.array(U_record)

numpy.savetxt("urecord.out",U_record,fmt='%1.4e')

fig, ax = pyplot.subplots()

pyplot.xlabel('x')

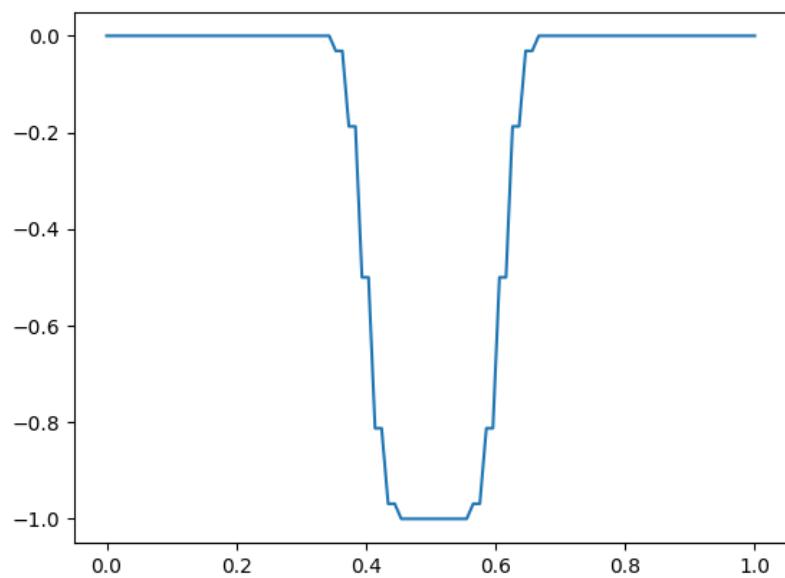
pyplot.ylabel('t')

heatmap = ax.pcolor(x_grid, t_grid, U_record, vmin=0., vmax=1.2)

pyplot.show()

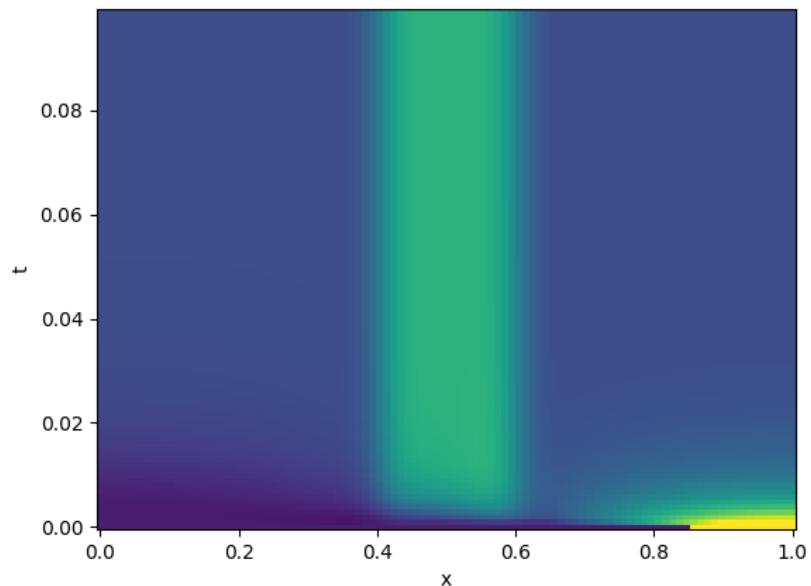
```

Tu pa je prikazan primer PMF profila:



Slika 19: Primer PMF profila

Končni rezultat teh izračunov je spodnji prikaz, ki ima na y osi prikazan čas, na x osi pa pozicijo v x prostoru. Z barvami je prikazana koncentracija lokalnega anestetika. Graf je brez enot, saj so bile te poljubno izbrane.



Slika 20: Graf, ki kaže koncentracijo lokalnega anestetika

5. Razpravljanje

V tej raziskavi smo se osredotočali predvsem na prehod anestetika čez membrano celice (1, 2, 5, 8, 17, 36). Precej nas je zanimal tudi vpliv acidoze na učinkovitost lokalne anestezije.

Prvo hipotezo, torej da je prehod lokalnega anestetika preko zunanje membrane nevrona zelo hiter, ter da zato potrebuje manj kot sekundo, da onesposobi živčno calico, potrjujemo. S pomočjo metod fizikalne kemije smo izdelali graf ter ugotovili, da molekula kokaina dobesedno pade skozi membrano. Čas, ki ga potrebuje, je reda nanosekunda, torej ji membrana ne predstavlja velike ovire, pač pa še pripomore k hitrejšemu prehodu, saj predstavlja lipidno okolje, v katerem se neprotonirane molekule kokakina raje nahajajo (5, 15, 18).

Drugo hipotezo, ki pravi, da se količina anestetika v zdravem tkivu in vnetem tkivu razlikuje ter da se ga v zdravem tkivu nakopiči veliko več kot v vnetem, potrjujemo. Ugotovili smo, da acidoza zmanjša učinkovitost lokalnih anestetikov zaradi protonacije molekul zunaj membrane, kar povzroči zmanjšanje koncentracije anestetikov v lipofilnih delih membrane (2, 5). Nekoliko se zmanjša sposobnost kopiranja v membrani Schwannove celice (5,8). To omogoča kapilarom v živcu, da prej odplaknejo anestetik iz ekstracelularne tekočine, kar zmanjšuje njegovo učinkovitost (5). Potrjujemo torej tudi tretjo hipotezo, ki pravi, da pri vnetem tkivu anestetik deluje slabše, ker se ga več protonira v ekstracelularni tekočini in da so zaloge v lipidnih delih manjše ter ga zato hitreje odplavlja.

Zna pa se zgoditi, da je odplakovanje lokalnih anestetikov s kapilarami tako učinkovito, da koncentracija v aksoplazmi ne doseže mejne koncentracije in anestezije ni. Povečana cirkulacija je lahko posledica vazodilacije, ki jo inducira alkohol. Klinična praksa kaže, da je lokalna anestezija pri alkoholiziranih pacientih manj učinkovita (37).

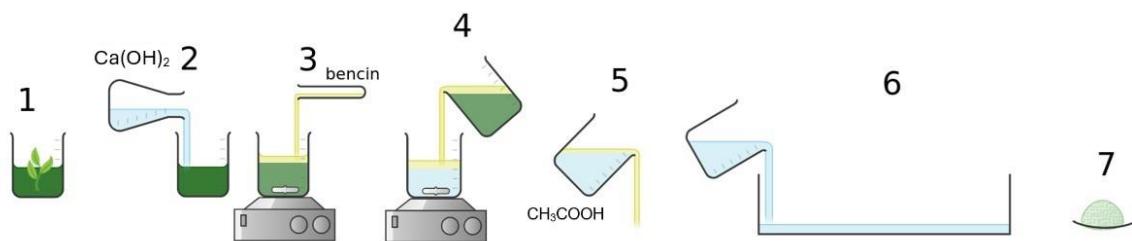
V raziskavi smo prav tako obravnavali vpliv koncentracije anestetika na trajanje delovanja anestezije (5). Ugotovili smo, da uporaba manjše količine raztopine z večjo koncentracijo anestetika omogoča daljše delovanje, vendar zahteva natančnejše injeciranje. Po drugi strani pa bolj razredčena raztopina z nižjo koncentracijo ponuja večjo verjetnost za uspešno oblitje živca.

Raziskovali smo tudi difuzijo in čas, ki ga potrebuje anestetik, da pripotuje do nevorna (2, 5, 15, 18, 20, 33). Videli smo, da difuzija ni primeren način transporta na daljše razdalje in da imajo sesalci v ta namen razvit kardiovaskularni sistem (20). Tako smo prišli do ugotovitev, da debelejši živec anestetik anestezira počasneje, saj mora prepotovati daljšo razdaljo (5).

5.1. Uporabnost raziskovalnega dela: nova metoda ekstrakcije kokaina

Razumevanje kislinsko-baznega ravnotežja v povezavi s porazdelitvijo nepolarno topilo – voda je dalo idejo, kako bi lahko z bolj ekološkimi postopki bolje ekstahirali kokain. Postopki predelave kokaina se med seboj bistveno ne razlikujejo: najprej se posušenim kokinim listom doda vodo in apno, da dobimo kokainsko pasto. Tej se prilije organsko topilo, po navadi bencin. Molekule kokaina potujejo v bencin, ki se ga potem loči od zmesi. Ta bencin s kokainom potem postavijo na tropsko sonce, da izhlapi (29). Pri tem v ozračje prehajajo ogljikovodiki, kar ni dobro okolju prijazno. Poleg tega so v večini postopkov uporabljeni nevarne kemikalije.

Naš način pridobivanja kokaina pa bi se rahlo razlikoval od zgoraj opisanega: posušenim kokinim lisotm bi dodali bazo (npr. $\text{Ca}(\text{OH})_2$), da bi se na ta način prepričali, da nobena molekula nebi bila protonirana. V to mešanico bi dodali bencin – molekule kokaina bi zopet potovale v bencin. Nato pa bi mešanici dolili kislino (npr. CH_3COOH), da bi se kokain protoniral in potoval v kislino, saj vedno potuje h kislemu okolju. V bencinu ga nebi nič ostalo in na ta način bi lahko bencin uporabili večkrat. Kokain s kislino pa bi postavili na sonce, da bi kislina izhlapela in dobili kristale čistega kokaina. Postopek bi bil potencialno uporaben za ekstrancijo ostalih ionizabilnih učinkovin v farmacevtski industriji.



Slika 21: Slika našega postopka pridobivanja kokaina

5.2. Možnost nadaljnih raziskav

V nadaljnih raziskavah bi bilo smiselno eksperimentirati *in vivo* in na ta način pridobiti še več podatkov o prehodu anestetikov čez membrano, potrebovanem času ter začetku delovanja anestezije. Vendar pa bi bilo tako eksperimentiranje dokaj zahtevno, saj bi bilo prisotnih mnogo motečih dejavnikov, zaradi česar bi bili podatki lahko netočni. Dosedanje predstavljeno delo bo prispevalo k razumevanju delovanja lokalne anestezije s kokainom na molekularnem nivoju. To delo ima tudi velik vpliv na odločitev za moj študij, ki bo dentalna medicina.

6. Zaključek

V naši raziskavi smo pridobili nekatere ugotovitve o vedenju lokalnega anestetika kokaina v odvisnosti predvsem od polarnosti topila in pH vrednosti (2, 5). Ugotovili smo, da je njegov prehod čez membrano zelo hiter in znaša nekaj nanosekund. Membrana torej ne povzroča velike ovire pri prehodu. Ugotovili smo tudi, da v neutralnem stanju kaže kokain preferenco do celičnih membran, v kislem okolju z nizko pH vrednostjo pa se protonira že zunaj celice in se ga v membrano razporedi manj. Membrano prehaja hitro, saj je hidrofobna molekula (20). Skladišči se pretežno v Schwannovi celici, ki je sestavljena predvsem iz lipidov, kar ima pomemben vpliv na trajanje anestezije (8).

Poglobili smo se tudi v prosto energijo molekul in posledično nas je zanimalo, kolikšna količina kokaina se nahaja v ekstracelularni tekočini, membrani in aksoplazmi, ko po injeciranju pride do živčne celice. Izračunali smo jo s pomočjo metod fizikalne kemije. Račune smo napravili za tkivo pri fizioloških pogojih in za vneto tkivo. Ugotovili smo, da se količina ne razlikuje preveč, kjub temu, da anestetik pri vnetem tkivu deluje slabo in je njegovo trajanje krajše. Kokain se v kislem okolju namreč protonira zunaj membrane, zato ga kapilare v živcu hitreje odplavlja in posledično ga manjša količina vstopi v membrano. Ukvarjali smo se tudi z difuzijo in časom potovanja molekul, kot tudi nekateri drugi raziskovalci (5, 15, 18, 20).

Model, ki smo ga razvili, je omogočil vpogled v prehod lokalnih anestetikov skozi zunanjou membrano nevronov. Čeprav se je izkazal za učinkovitega, je še vedno le poenostavljen model. Kljub temu pa obstajajo možnosti za izboljšave, zlasti z večjim številom eksperimentalnih podatkov. Učinkovito bi bilo eksperimentiranje na živih ljudeh, česar pa etična komisija gotovo ne bi odobrila v doglednem času za namene šolskih tekmovanj, zato zadeva ostaja odprta.

Spoznali smo, da je kokain dober lokalni anestetik tudi zato, ker povzroči vazokonstrikcijo, ki je med posegom zaželena. S tem ko skrči žile, zmanjša krvavitev in kapilarom prepreči svoje odplakovanje, kar zopet vpliva na dolžino anestezije (10). Poleg vsega pa smo spoznali sestavo živcev, prehod živčnega signala prek aksona, ukvarjali smo se s protonacijo molekul in električnim potencialom celične membrane (25), raziskali, za kakšne namene so v preteklosti uporabljali kokain (3, 11 - 13, 19, 21, 23, 26, 29) in prišli do nove, okolju prijaznejše metode pridobivanja te psihoaktivne snovi.

7. Seznam literature

1. Berne, R. M., Levy, M. N., B. M. Koeppen in B. A. Stanton (*ur.*) (1998). *Physiology* (4. izdaja). St Louis: Mosby Inc.
2. Kavčič, H., Umek, N., Vintar, N. in Mavri J. (2021). Local anesthetics transfer relies on pH differences and affinities toward lipophilic compartments. *J Phys Org Chem* 2021, 34(12), e4275. Pridobljeno s <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/poc.4275>
3. Drug Enforcement Admin 8701 Morrisette Drive, Springfield, VA 22152, United States. (1991). Coca Cultivation and Cocaine Processing: An Overview. United States of America: Drug Enforcement Administration.
4. Oung, S. W., Kremer, N., Ben Amara, S., Zaidi, A. in Koslowski, T. (2022). Protonation and orientation: a computational approach to cocaine diffusion through a model membrane. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 24(23), 14219-14227. Pridobljeno s <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/CP/D2CP01140A#!divAbstract>
5. V. Smrkolj, osebna komunikacija, 9. avgust 2023
6. Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, M. J., Flower, J., R.. (2007). *Rang & Dale's Pharmacology* (6. izdaja). China: Elsevier.
7. Cumming, H. in Rücker, C. (2017). Octanol–Water Partition Coefficient Measurement by a Simple 1H NMR Method. *ACS Omega*, 2(9), 6244-6249. Pridobljeno s <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.7b01102>
8. Krishnapur, P. (21. julij 2023). *Schwann Cells: Specialized Cells that Support Nerve Function*. Pridobljeno 17. december 2022 s <https://www.assaygenie.com/blog/schwann-cells>
9. Milam, S. B. in Giovannitti, J. A. (1984). Local Anesthetics in Dental Practice. *Dental Clinics of North America*, 28(3), 493-508. Pridobljeno s <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011853222022285>
10. Giovannitti, J. A., Rosenberg, M. B. in Phero, J. C. (2013). Pharmacology of Local Anesthetics Used in Oral Surgery. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*, 25(3), 453-465. Pridobljeno s [https://www.oralmaxsurgery.theclinics.com/article/S1042-3699\(13\)00040-X/fulltext](https://www.oralmaxsurgery.theclinics.com/article/S1042-3699(13)00040-X/fulltext)
11. National Institute on Drug Abuse; National Institutes of Health; U.S. Department of Health and Human Services. (2021). *Cocaine DrugFacts*. Pridobljeno 18. december 2022 s <https://nida.nih.gov/publications/drugfacts/cocaine>
12. Redman, M. (2011). Cocaine: What is the Crack? A Brief History of the Use of Cocaine as an Anesthetic. *Anesthesiology and Pain Medicine*, 1(2), 95-97. Pridobljeno s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4335732/>
13. Panorama, B. M. (7. april 2014). *Kapljica s kokainom na dan, da prezene kašelj stran*. Pridobljeno 18. december 2022 s <https://old.delo.si/druzba/panorama/kapljica-s-kokainom-na-dan-da-prezene-kaselj-stran.html>
14. Dr.Samanthi. (12. marec 2019). *Difference Between Polarised and Non Polarised Cells*. Pridobljeno 22. december 2022 s <https://www.differencebetween.com/difference-between-polarised-and-non-polarised-cells/>
15. Cell - Membrane Transport, Osmosis, Diffusion | Britannica (b. d.). Na *Britannica*. Pridobljeno 23. december 2022 s <https://www.britannica.com/science/cell-biology/Transport-across-the-membrane#ref313705>
16. National Center for Biotechnology Information (2023). *PubChem Compound Summary for CID 21635054, Cocaine(1+)*. Pridobljeno 17. julij 2023 s https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cocaine_1
17. Li, J.-L. (17. julij 2007). *The Potential of Mean Force*. Pridobljeno 18. julij 2023 s https://w3.iams.sinica.edu.tw/lab/jlli/thesis_andy/node15.html
18. The Editors of Encyclopaedia Britannica. (28. junij 2023). *Diffusion | Definition & Examples | Britannica*. Pridobljeno 19. julij 2023 s <https://www.britannica.com/science/diffusion>

19. Roque Bravo, R., Faria, A. C., Brito-da-Costa, A. M., Carmo, H., Mladěnka, P., Dias da Silva, D. in Remião, F. (2022). Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern. *Toxins*, 14(4), 278. Pridobljeno s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9032145/#B27-toxins-14-00278>
20. Diffusion Time Calculator - PhysiologyWeb (b. d.). Na *PhysiologyWeb*. Pridobljeno 19. julij 2023 s https://www.physiologyweb.com/calculators/diffusion_time_calculator.html
21. Local Anesthetics: Introduction and History, Mechanism of Action, Chemical Structure (22. december 2022). Na *eMedicine*. Pridobljeno 17. julij 2023 s <https://emedicine.medscape.com/article/873879-overview#aw2aab6b4>
22. Lokalna anestezija - Regionalna anestezija (17. december 2021). Na *Szaim*. Pridobljeno 17. julij 2023 s <https://www.szaim.org/lokalna-anestezija/>
23. Cocaine (21. avgust 2018). Na *HISTORY*. Pridobljeno 18. december 2022 s <https://www.history.com/topics/crime/history-of-cocaine>
24. Lokalni anestetiki – Medicinski slovar (1. avgust 2022). Na *Medicinski slovar*. Pridobljeno 17. julij 2023 s <https://www.medicinskislovar.com/lokalni-anestetiki/>
25. Vidmar, G. (27. april 2009). *Živčni sistem – delitev, zgradba in delovanje živčnega sistema*. Pridobljeno 17. december 2022 s <https://www.cenim.se/wellness/zivcni-sistem/>
26. Lokalna anestezija v zobozdravstvu (28. julij 2018). Na *Revija za moje zdravje*. Pridobljeno 17. julij 2023 s <https://www.revijazamojezdravje.si/lokalna-anestezija-v-zobozdravstvu/>
27. Lokalni anestetik (24. oktober 2018). Na *Wikipedija, prosta enciklopedija*. Pridobljeno 17. julij 2023 s https://sl.wikipedia.org/wiki/Lokalni_anestetik
28. Lokalni anestetiki v oftalmologiji (b. d.). Na *Moje-lece.si*. Pridobljeno 17. julij 2023 s <https://www.moje-lece.si/slovar/lokalni-anestetiki-v-oftalmologiji.html>
29. Več o kokainu – Kokain.si (b. d.). Na *Kokain.si*. Pridobljeno 17. julij 2023 s <https://www.kokain.si/o-kokainu/?kategorija=vec-o-kokainu>
30. Kokain (22. januar 2018). Na *DrogArt*. Pridobljeno 17. julij 2023 s <https://www.drogart.org/droge/1193/kokain.html>
31. Hyperpolarization (biology) (13. oktober 2022). Na *Wikipedia*. Pridobljeno 22. december 2022 s [https://en.wikipedia.org/wiki/Hyperpolarization_\(biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Hyperpolarization_(biology))
32. Octanol-water partition coefficient (25. november 2022). Na *Wikipedia*. Pridobljeno 23. december 2022 s https://en.wikipedia.org/wiki/Octanol-water_partition_coefficient
33. Difuzijska enačba (15. marec 2023). Na *Wikipedia, prosta enciklopedija*. Pridobljeno 19. julij 2023 s https://sl.wikipedia.org/wiki/Difuzijska_ena%C4%8Dba
34. The Action Potential (b. d.). Na *TeachMePhysiology*. Pridobljeno 8. avgust 2023 s <https://teachmephysiology.com/nervous-system/synapses/action-potential/>
35. Electric potential (article) (b. d.). Na *Khan Academy*. Pridobljeno 8. avgust 2023 s <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/physical-processes/electrostatics-1/a/electric-potential>
36. Potential of mean force (24. julij 2023). Na *Wikipedia*. Pridobljeno 8. avgust 2023 s https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Potential_of_mean_force&oldid=1166950335
37. M. J. Čufer, osebna komunikacija, 22. avgust 2023.
38. J. Kralj, osebna komunikacija, 15. november 2023.
39. Logotip Gimnazije Kranj na naslovnici. Pridobljeno 17. december 2022 s <https://www.gimkr.si/pic/gimnazija-kranj-fb.png>
40. Slika 1: Zgradba nevrona. Pridobljeno 17. december 2022 s <https://www.cenim.se/UserFiles/image/zivcni-sistem/nevron.jpg>
41. Slika 2: Struktura sinapse. Pridobljeno 17. december 2022 s <https://www.cenim.se/UserFiles/image/zivcni-sistem/sinapsa.jpg>
42. Slika 3: Potovanje živčnega signala po aksonu. Pridobljeno 7. avgust 2023 s <https://www.semanticscholar.org/paper/Neuropsychology-of-accelerated-long-term-forgetting-Hoefejizers/21c63895df015c3a664c05de5b118d038b86bcde>

43. Slika 4: Dogajanje v sinaptični špranji. Pridobljeno 18. december 2022 s <https://pic.weblogographic.com/img/science-nature-2017/difference-between-chemical-and-electrical-synapse.jpg>
44. Slika 5: Zgradba amidoestrov in amidoamidov. Pridobljeno iz osebne zbirke Vladimirja Smrkolja, 9. avgust 2023
45. Slika 6. Skeletna formula lidokaina. Pridobljeno 3. avgust 2023 s <https://sl.m.wikipedia.org/wiki/Slika:Lidocaine.svg>
46. Slika 7. Napis na steklenici, kjer je bila shranjena raztopina kokaina za lajšanje zobobola iz leta 1885. Pridobljeno 18. december 2022 s <https://old.delo.si/images/slike/picture/20140407/Panorama-kokain-tablete-za.jpg>
47. Slika 8: Mesto vstopa lokalnega anestetika. Pridobljeno iz osebne zbirke dr. Janeza Mavrija.
48. Slika 9: Zgradba Schwannove celice. Pridobljeno 7. avgust 2023 s <https://socratic.org/questions/in-human-anatomy-what-is-the-purpose-of-the-schwann-cells#227265>
49. Slika 10: Vazokonstrikcija. Pridobljeno 19. december 2022 s <https://my.clevelandclinic.org/-scassets/images/org/health/articles/21697-vasoconstriction-illustration>
50. Slika 11: Izgled tkiva pri vazokonstrikciji. Pridobljeno 19. december 2022 s https://dimensionsofdentalhygiene.com/wp-content/uploads/2013/07/0713_local-750x350.jpg
51. Slika 12: Shema protoniranja molekule kokaina. Pridobljeno 17. julij 2023 s <https://www.chm.bris.ac.uk/motm/cocaine/extraction.gif>
52. Tabela 1: Fizikalne in kemijske lastnosti kokaina. Pridobljeno 7. avgust 2023 s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9032145/table/toxins-14-00278-t001/>
53. Slika 13: Prehod delcev iz polarnega v nepolarno topilo. Pridobljeno 17. december 2022 s https://pubs.acs.org/cms/10.1021/acsomega.7b01102/asset/images/medium/ao-2017-011026_0004.gif
54. Slika 14: Shema izračuna porazdelitvenega koeficiente. Pridobljeno 17. december 2022 s <http://bienta.net/wp-content/uploads/Log-D.jpg>
55. Tabela 2: Razdalja in približno potreben čas za potovanje molekul O₂ z difuzijo. Pridobljeno 19. julij 2023 s https://www.physiologyweb.com/calculators/diffusion_time_calculator.html
56. Slika 15: Skica količine proste energije (ni narisana v merilu) kot funkcija reakcijske koordinate. Skica lastne izdelave.
57. Slika 16: Potek računanja deleža kokaina v aksoplazmi, membrani in ekstracelularni tekočini. Elektronska kopija dokumenta lastne izdelave.
58. Slika 17: Skica prehoda kokaina čez membrano pri fizioloških pogojih in količina, ki se nahaja v posameznem delu celice [%] Skica lastne izdelave.
59. Slika 18: Skica prehoda kokaina čez membrano pri vnetem tkivu in količina kokaina v posameznih delih [%]. Skica lastne izdelave.
60. Slika 19: Primer PMF profila. Pridobljeno iz osebne zbirke Jakoba Kralja, 20. november 2023
61. Slika 20: Graf, ki kaže koncentracijo lokalnega anestetika. Pridobljeno iz osebne zbirke Jakoba Kralja, 20. november 2023
62. Slika 21: Slika našega postopka pridobivanja kokaina. Skica lastne izdelave.