

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Uroš B. Pecikoza

**ISPITIVANJE EFEKATA, MEHANIZAMA DEJSTVA I  
INTERAKCIJA ESLIKARBAZEPIN ACETATA I  
METFORMINA U EKSPERIMENTALNIM MODELIMA  
BOLA**

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Uroš B. Pecikoza

**EXAMINATION OF THE EFFECTS, MECHANISMS OF  
ACTION AND INTERACTIONS OF ESLICARBAZEPINE  
ACETATE AND METFORMIN IN EXPERIMENTAL  
PAIN MODELS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

**Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmakologiju, Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta**

**MENTOR:**

---

Dr Maja Tomić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

Dr Radica Stepanović-Petrović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Ana Micov, docent  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Sonja Vučković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

**U Beogradu, \_\_\_\_\_**

## **Ispitivanje efekata, mehanizama dejstva i interakcija eslikarbazepin acetata i metformina u eksperimentalnim modelima bola**

### **SAŽETAK**

Bol je kompleksno senzorno iskustvo koje ima jasnu zaštitnu ulogu, ali pod određenim uslovima može da postane hronično stanje koje značajno narušava kvalitet života. Postojeći analgetici, iako nesumnjivo korisni u terapiji različitih bolnih stanja, neretko su nedovoljno efikasni ili bezbedni. Zato postoji potreba za razvojem novih ili otkrivanjem efikasnih kombinacija postojećih analgetika kako bi se poboljšala terapija bola.

Ciljevi ovog rada su bili ispitivanje efekata, mehanizama dejstva i interakcija dva potencijalna alternativna analgetika, antiepileptika eslikarbazepin acetata (ESL) i antidijabetika metformina u modelima inflamatornog i neuropatskog bola.

Efekti ESL i metformina su ispitani u modelima inflamatornog trigeminalnog, visceralnog i somatskog bola, kao i modelu bolne dijabetesne neuropatije. Mehanizmi dejstva ESL u modelu trigeminalnog bola su ispitani farmakološkim pristupom, korišćenjem antagonista receptora značajnih za modulaciju bola. Vrsta interakcije između ESL/metformina i analgetika u modelima inflamatornog i neuropatskog bola je utvrđena izoblografskom analizom.

ESL i metformin su pokazali efikasnost u svim korišćenim modelima inflamatornog bola i u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Utvrđeno je da ESL ublažava trigeminalni bol posredstvom serotoninskih  $5\text{-HT}_{1B/1D}$ ,  $\alpha_2/\beta_1$ -adrenergičkih, muskarinskih,  $\text{CB}_1/\text{CB}_2$  kanabinoidnih i opioidnih receptora. ESL i metformin stupaju u aditivne ili sinergističke interakcije sa različitim analgeticima u modelima inflamatornog i neuropatskog bola.

Efikasnost ESL i metformina u modelima bola bi mogla da ukaže na njihovu potencijalnu kliničku primenu kao analgetika. Dodatno, poznavanje mehanizama dejstva ESL može doprineti uspešnoj primeni ovog leka u terapiji bola. Na kraju, oba leka stupaju u povoljne interakcije sa postojećim analgeticima. Ovaj nalaz ukazuje na potencijalno bolju efikasnost i/ili bezbednost kombinovane u odnosu na monoterapiju, kao i koji analgetici bi mogli biti povoljan izbor za lečenje bola kod ljudi koji već primenjuju ESL/metformin zbog komorbiditeta.

**Ključne reči:** alternativni analgetici, eslikarbazepin acetat, metformin, inflamatorni bol, neuropatski bol, trigeminalni bol, bolna dijabetesna neuropatija, modulacija bola, izoblograska analiza

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmakologija



## **Examination of the effects, mechanisms of action and interactions of eslicarbazepine acetate and metformin in experimental pain models**

### **ABSTRACT**

Pain is a complex sensory experience, which has a clear protective role, but under certain circumstances pain can become a chronic condition that significantly impairs the quality of life. Existing analgesics, although undoubtedly useful in the treatment of various painful conditions, are often insufficiently effective or safe. Therefore, there is a need to develop new drugs or to discover effective combinations of existing drugs in order to improve pain therapy.

The objectives of this study were to investigate the effects, mechanisms of action, and interactions of two potential alternative analgesics, the antiepileptic eslicarbazepine acetate (ESL) and the antidiabetic metformin in models of inflammatory and neuropathic pain.

The effects of ESL and metformin were examined in models of inflammatory trigeminal, visceral and somatic pain, as well as in a model of painful diabetic neuropathy. The mechanisms of action of ESL in the model of trigeminal pain were examined by a pharmacological approach, using antagonists of different receptors important for pain modulation. The type of interaction between ESL/metformin and analgesics in models of inflammatory and neuropathic pain was determined using isobolographic analysis.

ESL and metformin were effective in all models of inflammatory pain that were used, as well as in the model of painful diabetic neuropathy. ESL was found to relieve trigeminal pain by activating serotonin 5-HT<sub>1B/1D</sub>,  $\alpha_2/\beta_1$ -adrenergic, muscarinic, CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> cannabinoid and opioid receptors. ESL and metformin interacted in an additive or synergistic manner with different analgesics in models of inflammatory and neuropathic pain.

The efficacy of ESL and metformin in pain models may indicate their potential clinical application as analgesics. In addition, knowledge of the mechanisms of action of ESL may contribute to the successful use of this drug in the treatment of pain. Finally, both drugs interact favorably with existing analgesics. This finding indicates potentially better efficacy and/or safety of combination therapy compared to monotherapy, as well as which analgesics could be a favorable choice for the treatment of pain in people already using ESL/metformin due to comorbidities.

**Key words:** alternative analgesics, eslicarbazepine acetate, metformin, inflammatory pain, neuropathic pain, trigeminal pain, painful diabetic neuropathy, pain modulation, isobolographic analysis

**Academic expertise:** Pharmacy

**Major in:** Pharmacology

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Bol – definicija, osnovni pojmovi i klinički značaj .....	1
1.2. Nocicepcija .....	3
1.3. Descendentna modulacija bola .....	7
1.3.1. Uloga serotonina i serotoninских receptora u modulaciji bola .....	8
1.3.2. Uloga noradrenalina i adrenergičkih receptora u modulaciji bola .....	9
1.3.3. Uloga acetilholina i holinergičkih receptora u modulaciji bola .....	10
1.3.4. Uloga endokanabinoida i kanabinoidnih receptora u modulaciji bola .....	11
1.3.5. Uloga endogenih opioda i opioidnih receptora u modulaciji bola.....	12
1.4. Alternativni analgetici .....	14
1.4.1. Eslikarbazepin acetat.....	17
1.4.2. Metformin.....	19
<b>2. Ciljevi rada</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Materijal i metode</b> .....	<b>26</b>
3.1. Eksperimentalne životinje .....	26
3.2. Eksperimentalne supstance .....	27
3.3. Priprema i primena algogenih supstanci .....	28
3.4. Priprema i primena aktivnih supstanci .....	28
3.5. Priprema i primena receptorskih antagonista .....	29
3.6. Eksperimentalni modeli bola .....	29
3.6.1. Model inflamatornog trigeminalnog bola.....	29
3.6.2. Model inflamatornog visceralnog bola.....	32
3.6.3. Model inflamatornog somatskog bola.....	32
3.6.4. Model bolne dijabetesne neuropatije.....	35
3.7. Analiza vrste interakcije između dva leka – izoblografska analiza .....	39
3.8. Analiza dužine trajanja antihiperalgezijskog dejstva lekova i kombinacija lekova .....	41
3.9. Rotarod test.....	42
3.10. Statistička analiza .....	42
<b>4. Rezultati</b> .....	<b>44</b>
4.1. Efikasnost ESL u eksperimentalnim modelima bola .....	44
4.1.1. Efekat ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola .....	44

4.1.2. Efekat ESL u modelu inflamatornog visceralnog bola .....	46
4.1.3. Efekat ESL u modelu bolne dijabetesne neuropatije .....	46
4.1.4. Uticaj ESL na motoriku eksperimentalnih životinja .....	48
4.2. Ispitivanje mehanizama dejstva ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola .....	49
4.2.1. Uticaj antagoniste serotoninskih 5-HT <sub>1B/1D</sub> receptora na antinociceptivni efekat ESL .....	49
4.2.2. Uticaj antagonista adrenergičkih receptora na antinociceptivni efekat ESL .....	50
4.2.3. Uticaj antagonista holinergičkih receptora na antinociceptivni efekat ESL .....	52
4.2.4. Uticaj antagonista kanabinoidnih receptora na antinociceptivni efekat ESL .....	53
4.2.5. Uticaj antagoniste opioidnih receptora na antinociceptivni efekat ESL .....	55
4.3. Ispitivanje interakcija između ESL i standardnih/alternativnih analgetika u modelu inflamatornog trigeminalnog bola .....	56
4.3.1. Efekat standardnih/alternativnih analgetika u orofacijalnom formalinskom testu .....	56
4.3.2. Efekat dvokomponentnih kombinacija ESL i analgetika u modelu inflamatornog trigeminalnog bola, i utvrđivanje tipa interakcije (izoblogrfska analiza).....	58
4.3.3. Ispitivanje uticaja pojedinačnih analgetika i kombinacija ESL i standardnih/alternativnih analgetika na motornu spretnost miševa u rotarod testu .....	62
4.4. Efikasnost metformina u eksperimentalnim modelima bola .....	63
4.4.1. Efekat metformina u modelu inflamatornog somatskog bola .....	63
4.4.2. Efekat metformina u modelu bolne dijabetesne neuropatije .....	63
4.4.3. Uticaj metformina na motoriku eksperimentalnih životinja .....	64
4.5. Ispitivanje interakcija između metformina i standardnih/alternativnih analgetika u eksperimentalnim modelima bola .....	65
4.5.1. Ispitivanje interakcija između metformina i standardnih/alternativnih analgetika u modelu inflamatornog somatskog bola.....	65
4.5.2. Ispitivanje interakcija između metformina i standardnih/alternativnih analgetika u modelu bolne dijabetesne neuropatije.....	75
<b>5. Diskusija.....</b>	<b>84</b>
5.1. Antinociceptivna/antihiperalgezijska efikasnost ESL u eksperimentalnim modelima bola .....	84
5.2. Mehanizam dejstva ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola .....	85
5.2.1. Uloga serotoninskih receptora u antinociceptivnom efektu ESL .....	85
5.2.2. Uloga adrenergičkih receptora u antinociceptivnom efektu ESL.....	86
5.2.3. Uloga holinergičkih receptora u antinociceptivnom efektu ESL .....	87
5.2.4. Uloga kanabinoidnih receptora u antinociceptivnom efektu ESL.....	88
5.2.5. Uloga opioidnih receptora u antinociceptivnom efektu ESL .....	89
5.3. Interakcije između ESL i analgetika u modelu inflamatornog trigeminalnog bola .....	90
5.3.1. Interakcija između ESL i paracetamola/propifenazona/naproksena .....	90
5.3.2. Interakcija između ESL i zolmitriptana/metoklopramida .....	91

5.4. Antihiperalgezijska efikasnost metformina u eksperimentalnim modelima bola .....	92
5.5. Interakcije između metformina i analgetika u eksperimentalnim modelima bola .....	94
5.5.1. Interakcije između metformina i analgetika u modelu somatskog inflamatornog bola.....	94
5.5.2. Interakcije između metformina i analgetika u modelu bolne dijabetesne neuropatije .....	96
<b>6. Zaključak .....</b>	<b>99</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>101</b>

# 1. Uvod

---

## 1.1. Bol – definicija, osnovni pojmovi i klinički značaj

Prema Međunarodnom udruženju za proučavanje bola (engl. *International Association for the Study of Pain* - IASP), bol se može definisati kao neprijatan osećaj i emocionalno iskustvo izazvano stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva. U julu 2020. godine definicija bola je proširena, i sada uključuje neprijatna i emocionalna iskustva koja nalikuju onim u kojima je prisutno stvarno ili potencijalno oštećenje tkiva, jer je prepoznato da kod mnogih bolnih stanja ne mora da bude prisutno nikakvo objektivno tkivno oštećenje ili oštećenje neurona zaduženih za percepciju bola (**IASP, 2020**).

Sposobnost opažanja bola je od presudnog značaja za preživljavanje organizma, i omogućava telu da minimizira kontakt sa stimulusima iz spoljašnje sredine koji imaju potencijal da oštete tkiva. Neprijatna (averzivna) reakcija koja se razvija prilikom susreta sa potencijalno ugrožavajućim stimulusima takođe ima značajan adaptivni uticaj na ponašanje jedinke, i omogućava osobi da u budućnosti izbegava štetne stimulse (**Woolf, 2010**).

Pored sposobnosti opažanja ugrožavajućih stimulusa iz spoljašnje sredine od strane zdravih tkiva, dobro je poznato da povredu tkiva može pratiti razvoj bolne preosetljivosti. Bolna preosetljivost je sastavni deo procesa izlečenja, gde povreda tkiva dovodi do preosetljivosti u cilju sprečavanja dodatnog oštećenja i promovisanja zaštite oštećenog dela tela (obeshrabrivanjem daljih pokreta ili kontakta sa povređenim delom tela). Ova vrsta bola koja prati oštećenje tkiva je izazvana aktivacijom ćelija imunskog sistema i zato se često označava i kao **inflamatorni bol**. Kao rezultat ove preosetljivosti, bolni stimulusi mogu dovesti do razvoja bola većeg intenziteta nego što je uobičajeno (fenomen *hiperalgezije*) ili se inače bezbolni stimulusi mogu doživljavati kao bolni (fenomen *alodinije*) (**Basbaum i sar., 2009; Woolf, 2010**). Međutim, pod određenim okolnostima, ne dolazi do prolaska inflamatorne bolne preosetljivosti i osobe mogu osećati intenzivan bol koji ne prolazi po zalečenju inicijalne povrede tkiva ili je oštećenje tkiva nemoguće trajno otkloniti, što dovodi do nastanka hroničnog bola. U dobro poznate primere hroničnih inflamatornih bolnih stanja spadaju različite reumatske bolesti (poput osteoartritisa i reumatoidnog artritisa), bol u sklopu kancera i dr. (**Basbaum i sar., 2009; Manion i sar., 2019**).

Pored bola koji prati oštećenje tkiva, postoje i bolna stanja koja se razvijaju kao posledica oštećenja neurona koji su zaduženi za prenos nociceptivnih informacija. Ova bolna stanja se označavaju kao **neuropatski bolovi**, i mogu nastati kao posledica oštećenja perifernih neurona (npr. od strane lekova kao što su citostatici, antiretrovirusni lekovi ili od strane hiperglikemije u sklopu dijabetesa) ili centralnih neurona bolnog puta (npr. u slučaju multiple skleroze). Kancerski bolovi takođe mogu imati neuropatsku komponentu (**Basbaum i sar., 2009; Woolf, 2010**). Spadaju među hronična bolna stanja koja su najteža za lečenje i često su rezistentna na postojeće farmakološke i nefarmakološke mere. Karakter neuropatskih bolova se obično opisuje kao oštar, probadajući (sličan električnom udaru), a često je prisutna i taktilna alodinija, gde inače bezbolni mehanički stimulusi postaju izuzetno bolni i mogu nastati prilikom najmanjeg dodira poput presvlačenja ili vetra. Uobičajeno su prisutne i senzacije poput trnjenja ili mravinjanja, ali i gubitak senzacija (**Manion i sar., 2019**).

Na kraju, određena bolna stanja nemaju u svojoj osnovi dejstvo noksičnih stimulusa, oštećenje tkiva/inflamaciju ili oštećenje neurona. Ova stanja se označavaju kao **disfunkcionalni bolovi** i smatra se da nastaju kao posledica poremećaja funkcionisanja somatosenzornog sistema. U ova bolna stanja ubrajaju se fibromijalgija, sindrom iritabilnog creva, poremećaji temporomandibularnog zgloba, a prema nekim autorima i hronični oblici primarnih glavobolja (**Manion i sar., 2019; Woolf, 2010; 2011**).

Kao što je već rečeno, akutni bol ima jasnu zaštitnu i adaptivnu ulogu. Međutim, hronična bolna stanja (prema definiciji IASP, bol koji traje duže od 3 meseca) inflamatorne, neuropatske i disfunkcionalne prirode, nemaju ni korisnu niti adaptivnu ulogu (**Manion i sar., 2019; Woolf, 2010**). Ova hronična bolna stanja su veoma prevalentna i predstavljaju značajan problem kako za pojedinca, tako i za društvo u celini. Prema rezultatima epidemiološke studije *The Global Burden of Disease Study 2019*, bol i bolesti praćene bolom spadaju među glavne uzroke onesposobljenosti na globalnom nivou. Prevalencija hroničnog bola se stalno povećava i među 25 glavnih uzroka hronične onesposobljenosti u opštoj populaciji spadaju bol u leđima i hronične glavobolje (naročito prevalentne kod mladih i pacijenata srednje životne dobi), dok se u populaciji starih pacijenata među 25 glavnih uzroka onesposobljenosti dodatno nalaze i osteoartritis i drugi muskuloskeletni poremećaji (**GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators, 2020**).

## 1.2. Nocicepcija

Nocicepcija je proces u kome intenzivni termički, mehanički i hemijski stimuli (koji su sposobni da oštete tkivo) bivaju prepoznati od strane posebne populacije perifernih nervnih vlakana, koji se zovu **nociceptori**. Nociceptori su završeci specijalizovanih primarnih aferentnih neurona, koji su zaduženi za prepoznavanje noksičnih stimulusa. Nociceptori senzorno inervišu praktično sve delove tela, sa izuzetkom parenhima mozga. Poseduju biofizička i molekularna svojstva koja omogućavaju da se selektivno aktiviraju od strane potencijalno oštećujućih stimulusa i samo kada stimulus dostigne bolni (noksični) intenzitet. Specijalizovani receptori, jonski kanali i intracelularni putevi su odgovorni za specifičnost pojedinih podtipova nociceptora i omogućavaju otkrivanje i prenošenje informacija o akutnim i hroničnim (perzistentnim) bolnim stimulusima (**Basbaum i sar., 2009; Guan i sar., 2016**).

Postoje dve glavne vrste nociceptora. U prvu grupu spadaju mijelinizirana aferentna vlakna srednjeg prečnika (A $\delta$  vlakna) koja su odgovorna za nastanak akutnog, jasno definisanog, brzog bola. Druga klasa nociceptora su tanka nemijelinizirana C vlakna koja potiču od neurona manjeg dijametra i koja prenose slabije definisan, spori bol (**Basbaum i sar., 2009**). Većina nociceptora su polimodalni, što znači da mogu istovremeno prepoznati noksične stimuluse mehaničke, termičke i hemijske prirode (**Basbaum i sar., 2009; Kidd i Urban, 2001**).

Ćelijska tela nociceptora (primarni senzorni neuroni) su lokalizovana u dorzalnim ganglijama kičmene moždine (inervacija trupa i ekstremiteta), kao i u trigeminalnim ganglijama (inervacija glave i lica). Ovi neuroni su pseudounipolarni i poseduju perifernu i centralnu aksonsku granu koje inervišu ciljno tkivo/organ i neurone kičmene moždine/medularnog dorzalnog roga, redom (**Basbaum i sar., 2009; Guan i sar., 2016**).

Primarni senzorni neuroni bolnog puta imaju 2 osnovne funkcije u okviru procesa nocicepcije:

- 1) **transdukcija** – pretvaranje informacije o dejstvu noksičnih termičkih/mehaničkih/hemijskih stimulusa u odgovarajuće električne impulse (akcione potencijale),
- 2) **kondukcija i transmisija** - prenošenje senzornih informacija od perifernih završetaka do kičmene moždine/medularnog dorzalnog roga (kondukcija) i sinaptička transmisija senzornih informacija na sekundarne neurone koji se nalaze u okviru specifičnih lamina kičmene moždine/medularnog dorzalnog roga (transmisija) (**Basbaum i sar., 2009**).

### *Transdukcija*

Za proces transdukcije potencijalno ugrožavajućih stimulusa od strane nociceptora, presudnu ulogu igraju različiti jonotropni receptori, receptori vezani za G-proteine, jonski kanali koji su prisutni u membrani nociceptora. Od svih, verovatno najveći značaj za proces transdukcije nociceptivnih stimulusa igraju jonotropni receptori iz familije TRP kanala (engl. *Transient Receptor Potential Channels*) (**Slika 1.1**). TRP kanali se ponašaju kao katjonski jonotropni receptori i po njihovoj aktivaciji (od strane nociceptivnih stimulusa) dolazi do influksa katjona u neuron i depolarizacije ćelijske membrane. Ukoliko promena membranskog potencijala dostigne odgovarajući prag okidanja, stvaraju se akcioni potencijali koji prenose nociceptivne informacije ka centralnom nervnom sistemu. Različiti članovi ove familije (poput TRPV1 i TRPA1) su polimodalni i mogu da budu aktivirani od strane noksičnih stimulusa mehaničke, termičke ili hemijske prirode (**Basbaum i sar., 2009; Guan i sar., 2016; Gold, 2013**).

Proinflamatorne supstance koje se stvaraju endogeno kao odgovor na oštećenje tkiva, putem modulacije aktivnosti TRP kanala i drugih proteina odgovornih za transdukciju, mogu povećati

osetljivost nociceptora prema termičkim i mehaničkim stimulusima. Neki inflamatorni medijatori (npr. protoni i lipidi) ponašaju se kao direktni alosterni modulatori ovih kanala, dok se drugi vezuju za sopstvene receptore na površini nociceptora i modulišu aktivnost TRP kroz aktivaciju nishodnih intracelularnih signalnih puteva (npr. prostaglandin E<sub>2</sub>, putem aktivacije prostanoidnih receptora, može povećati osetljivost TRPV1 kanala prema noksičnim stimulusima) (**Basbaum i sar., 2009; Zeilhofer i Brune, 2013**). Ovi mehanizmi dovode do izrazitog pada praga aktivacije ovih kanala, kao i povećanja amplitude odgovora na nadpragovne stimuluse (biofizički ekvivalenti alodinije i hiperalgezije) i na taj način povećavaju osetljivost perifernih nociceptora prema mehaničkim i termičkim stimulusima (proces *periferne senzitivacije*) (**Basbaum i sar., 2009**). Ovaj proces je posebno značajan sa farmakološkog stanovišta, jer nesteroidni anti-inflamatorni lekovi (NSAIL), koji spadaju među najkorišćenije analgetike, inhibicijom sinteze prostaglandina sprečavaju ovaj proces senzitivacije perifernih nociceptora (**Zeilhofer i Brune, 2013**). Pored proinflatornih medijatora, poznato je da različiti lekovi (npr. oksaliplatin) ili hiperglikemija, koji mogu dovesti do nastanka neuropatskog bola, takođe mogu uticati na aktivnost TRP kanala i na taj način olakšati proces transdukcije i doprineti nastanku bolne preosetljivosti koja se viđa kod neuropatskih bolnih stanja (**Chukyo i sar., 2018; Wang i sar., 2018**).

### *Kondukcija*

Kada se noksični mehanički, termički ili hemijski stimulusi procesom transdukcije prevedu u odgovarajuću promenu membranskog potencijala, ova promena potencijala ukoliko je dovoljnog intenziteta dovodi do aktivacije različitih voltažno-zavisnih Na<sup>+</sup> kanala, koji imaju presudnu ulogu u nastanku akcionih potencijala pomoću kojih se informacija prenosi ka centralnom nervnom sistemu (**Slika 1.1**) (**Basbaum i sar., 2009**). Značajno je naglasiti da različiti proinflatorni medijatori mogu pozitivno modulirati aktivnost Na<sup>+</sup> kanala i na taj način olakšati proces nastanka akcionih potencijala. Na primer, prostaglandin E<sub>2</sub> putem aktivacije svojih receptora dovodi do fosforilacije Na<sub>v</sub>1.8 kanala (koji su selektivno eksprimirani samo u nociceptorima), što dovodi do njihove olakšane aktivacije i doprinosi nastanku inflamatorne mehaničke i termičke hiperalgezije (**Zeilhofer i Brune, 2013**). Takođe, povećanje aktivnosti i/ili broja voltažno-zavisnih Na<sup>+</sup> kanala doprinosi i nastanku neuropatskog bola, nakon povrede nerva ili pod uticajem hiperglikemije (**Craner i sar., 2002; Devor, 2013**).

### *Transmisija*

Centralne aksonske grane primarnih nociceptivnih neurona se projektuju u dorzalne robove kičmene moždine (inervacija trupa i ekstremiteta) i medularni dorzalni rog (inervacija glave i vrata), koji sadrže anatomske i elektrofiziološki različite slojeve (lamine). Aδ nociceptori se uglavnom projektuju u laminu I, kao i u dublje slojeve dorzalnog roga (lamina V), a C nociceptori uglavnom u površinske lamine I i II. U okviru ovih slojeva kičmene moždine i medularnog dorzalnog roga se nalaze sekundarni neuroni sistema za transmisiju nociceptivnih informacija, koji se projektuju ka višim strukturama centralnog nervnog sistema, poput talamusa i moždanog stabla (**Slika 1.1**) (**Basbaum i sar., 2009; Chicorro i sar., 2017**).

Inicijalno prenošenje nociceptivnih signala sa primarnog na sekundarni senzorni neuron je posredovano oslobađanjem glutamata iz centralnih aksonskih grana primarnih neurona i aktivacijom AMPA/kainatnih jonotropnih receptora na sekundarnim neuronima (što dovodi do njihove depolarizacije i nastanka akcionih potencijala). U ovom procesu, presudnu ulogu igraju različiti tipovi voltažno-zavisnih Ca<sup>2+</sup> kanala, koji su odgovorni za inicijaciju egzocitoze neurotransmitera (**Basbaum i sar., 2009**). Međutim, ukoliko su stimulusi velikog intenziteta i/ili postoji ponovljena stimulacija nociceptora (npr. u slučaju perzistentne povrede tkiva ili neurona), Aδ i C nociceptori počinju pojačano

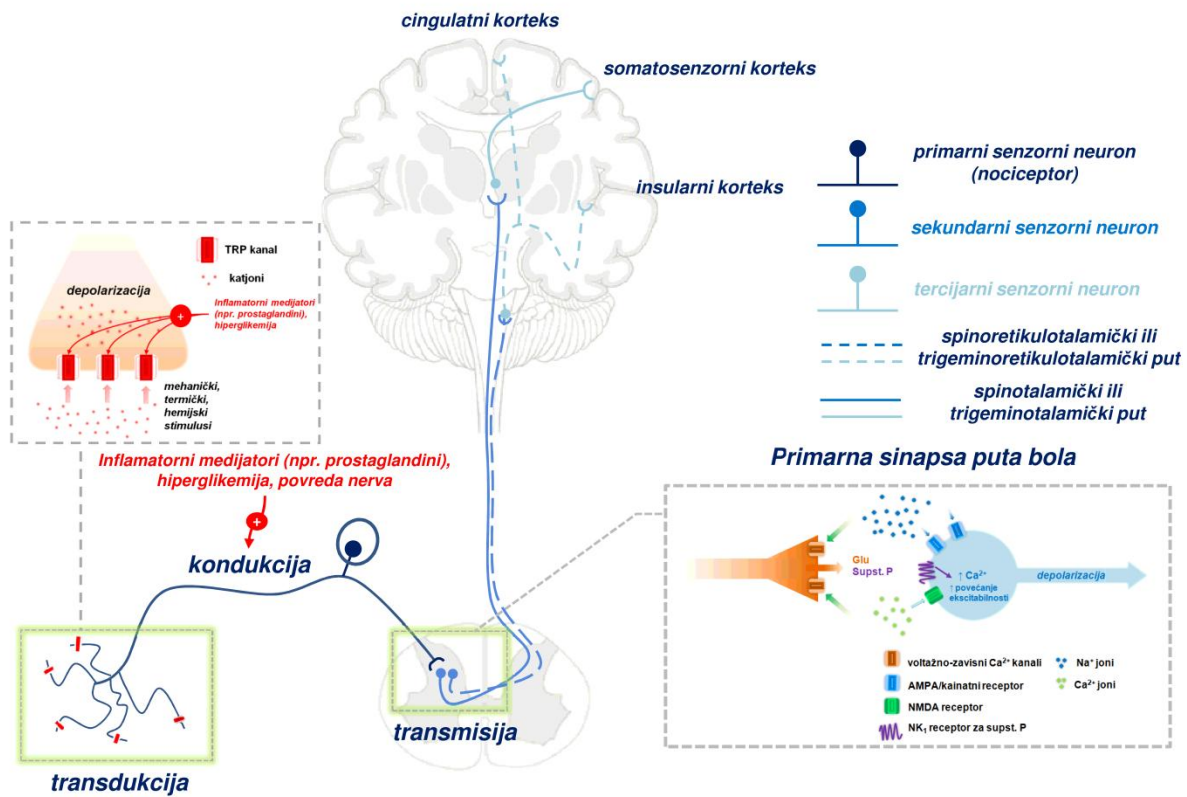


da oslobađaju glutamat u okviru dorzalnih rogova kičmene/produžene moždine, ali i druge neurotransmitere/neuromodule, poput neuropeptida (npr. supstanca P). Kao posledica ovoga dolazi do aktivacije NMDA receptora za glutamat na nivou sekundarnih neurona (koji se inače ne aktiviraju u slučaju sporadične stimulacije). NMDA receptori su izrazito propustljivi za jone  $\text{Ca}^{2+}$ , i porast intracelularne koncentracije ovog jona u okviru sekundarnih neurona pokreće kaskadu događaja, čiji konačni rezultat je povećana ekscitabilnost i olakšano stvaranje akcionih potencijala od strane sekundarnih neurona (proces *centralne senzitivacije*) (Basbaum i sar., 2009; Kidd i Urban, 2001).

Pored ovog mehanizma, poznato je da periferna inflamacija i povreda nerava može dovesti do povećane ekspresije voltažno-zavisnih  $\text{Ca}^{2+}$  kanala, kao i  $\alpha_2\delta$  pomoćne subjedinice koja povećava aktivnost voltažno-zavisnih  $\text{Ca}^{2+}$  kanala, u okviru kičmene moždine što olakšava transmisiju nociceptivnih informacija sa primarnog na sekundarni senzorni neuron. Sa farmakološkog aspekta posebno je značajno povećanje ekspresije  $\alpha_2\delta$  pomoćne subjedinice, jer navedena subjedinica je ciljno mesto dejstva antiepileptika iz grupe gabapentnoida (gabapentina i pregabalina), koji pokazuju kliničku efikasnost kod niza različitih bolnih stanja (Basbaum i sar., 2009; Patel i Dickenson, 2016; Tomić i sar., 2018).

#### *Ushodni putevi i supraspinalna obrada informacije o bolu*

Senzorne informacije o dejstvu noksičnih stimulusa se preko projekcionih neurona prisutnih dominantno u laminama I i V dorzalnog roga kičmene moždine i medularnog dorzalnog roga prenose ka mozgu. Ove informacije se prenose preko većeg broja ushodnih puteva, uključujući spinotalamičkog i trigeminotalamičkog puta koji prenose informacije o bolu u talamus, kao i spinoretikulotalamičkog i trigeminoretikulotalamičkog puta koji prenose informacije o bolu u moždano stablo (**Slika 1.1**). Spino(trigemino)talamički trakt je posebno značajan za senzorno diskriminativne aspekte bolnog iskustva (gde je stimulus i koliko je intenzivan), dok je spino(trigemino)retikulotalamički put izgleda značajniji za nastanak averzivnih svojstava bolnih stanja. Iz talamusa i moždanog stabla, informacija stiže do kortikalnih struktura. Bol nastaje kao posledica aktivacije različitih struktura korteksa od kojih su neke značajne za senzorno diskriminatorne aspekte (somatosenzorni korteks), a druge za emocionalne aspekte bola (npr. cingulatni girus i insularni korteks) (Basbaum i sar., 2009; Villanueva i Nosedá, 2013).



Slika 1.1. Sistem za transdukciju, kondukciju i transmisiju nociceptivnih informacija (prilagođeno prema Basbaum i sar., 2009)

### 1.3. Descendentna modulacija bola

Modulacija bola je proces u kome telo menja senzorne informacije o dejstvu noksličnih stimulusa, putem uticaja na sistem nervnih vlakana koji je zadužen za transmisiju nociceptivnih impulsa (**Kirkpatrick i sar. 2015**). U prethodnom tekstu su opisani procesi periferne i centralne senzitivizacije, koji nastaju pod uticajem različitih inflamatornih medijatora ili kao posledica oštećenja neurona, i koji pozitivno modulišu bolnu senzaciju, tj. olakšavaju nastanak nociceptivnih impulsa i njihovu propagaciju u okviru sistema za transmisiju nociceptivnih informacija.

Pored navedenih procesa, bitno je naglasiti da različite supraspinalne strukture mogu ispoljiti moćan uticaj na sistem za transmisiju nociceptivnih informacija. Ove moždane strukture čine sistem za descendentnu (niskodnu) modulaciju bola, i mogu facilitirati ili češće inhibirati transmisiju nociceptivnih informacija i tako stimulisati/inhibirati nastanak bolne senzacije. Neuronski putevi koji vrše niskodnu modulaciju bola vode poreklo uglavnom iz regija srednjeg mozga i produžene moždine, i projektuju se do dorzalnih rogova kičmene moždine i medularnog dorzalnog roga, gde utiču na proces nociceptivne transmisije (**Bannister i Dickenson, 2016; Chichorro i sar., 2017; Ossipov i sar., 2014**).

Od svih moždanih regija koje su uključene u modulaciju bola, centralnu ulogu igraju neuroni periaqueductalne sive mase (engl. *Periaqueductal Gray* - PAG). PAG je deo centralnih neuronskih kola koji kontrolišu transmisiju nociceptivnih informacija na nivou sinapse između primarnog i sekundarnog nociceptivnog neurona (koja se nekada slikovito označava kao *kapija bola*). Postoje dokazi da električna stimulacija, kao i aktivacija opioidnih receptora u ovoj regiji proizvodi snažan analgetički efekat kod eksperimentalnih životinja i ljudi. Takođe, danas je prepoznato da je PAG izvor descendentne inhibicije nocicepcije koja je posredovana endogenim opioidima (**Bannister i Dickenson, 2016; Ossipov i sar., 2014**).

Glavna struktura u koju se projektuje PAG je rostroventralna medula (RVM) i, putem aktivacije neurona u RVM, ispoljava uticaj na nociceptivnu transmisiju u okviru *kapije bola*. RVM obuhvata serotonergička jedra, poput *nucleus raphe magnus*, čiji neuroni se projektuju ka dorzalnim rogovima kičmene moždine, kao i medularnom dorzalnom rogu, i putem oslobađanja serotonina i dr. neurotransmitera modulišu proces nociceptivne transmisije. Za razliku od PAG, RVM ispoljava dvosmerni modulatorni uticaj, tj. može da inhibira i facilitira nastanak bolnih senzacija. Ovo je posledica postojanja različitih neuronskih populacija u okviru RVM koje pozitivno (ON ćelije) ili negativno modulišu (OFF ćelije) proces transmisije nociceptivnih informacija u kičmenoj moždini/medularnom dorzalnom rogu (**Bannister i Dickenson, 2016; Chichorro i sar., 2017; Ossipov i sar., 2014**).

Neuroni PAG-RVM se takođe projektuju ka noradrenergičkim jedrima prisutnim u okviru moždanog stabla, od čega je posebno značajno njihova inervacija neurona *locus coeruleus*-a, koji predstavljaju glavno mesto sinteze noradrenalina u centralnom nervnom sistemu. Neuroni *locus coeruleus*-a, slično RVM, daju descendentne projekcije ka dorzalnim rogovima kičmene moždine i medularnom dorzalnom rogu, i putem oslobađanja noradrenalina kontrolišu nociceptivnu transmisiju na nivou *kapije bola* (**Bannister i Dickenson, 2016; Ossipov i sar., 2010; Samuels i Szabadi, 2008**).

Imajući u vidu značaj PAG-RVM osovine i descendentne modulacije bolne senzacije, ne iznenađuje činjenica da je u mnogim hroničnim bolnim stanjima nastanak bola doveden u vezu sa deficitom u funkcionisanju niskodnih inhibitornih puteva. Disfunkcija descendentne inhibitorne modulacije je opisana da doprinosi nastanku hroničnih bolnih stanja poput osteoartritisa, reumatoidnog artritisa, fibromijalgije, sindroma iritabilnog creva (**Ossipov i sar, 2014**).

Na kraju, u procesu nishodne modulacije bola učestvuje čitav niz različitih neurotransmitera i neuromodulatora, poput monoamina, acetilholina, endogenih kanabinoida i opioda, GABA-e, glicina i dr. Ove supstance obezbeđuju hemijski supstrat putem koga descedentni putevi iz viših struktura mogu ispoljiti uticaj na nociceptivnu transmisiju u okviru kičmene moždine i medularnog dorzalnog roga (**Bannister i Dickenson, 2016; Chichorro i sar., 2017; Millan, 2002; Ossipov i sar., 2014**). Sa farmakološkog stanovišta, veliki značaj imaju monoamini (serotonin i noradrenalin), jer se smatra da povećanje nishodne serotonergičke i noradrenergičke neurotransmisije na nivou *kapije bola* doprinosi analgetičkim svojstvima lekova iz grupe antidepresiva (**Kremer i sar., 2016; Urits i sar., 2019**).

U nastavku teksta je opisana uloga serotonina, noradrenalina, acetilholina, endogenih kanabinoda i opioda u procesu modulacije bolne senzacije.

### 1.3.1. Uloga serotonina i serotoninских receptora u modulaciji bola

Serotonin ima kompleksan uticaj na modulaciju bolne senzacije, i može facilitirati ili inhibirati prenos nociceptivnih informacija u zavisnosti od (pod)tipa receptora na koji deluje i njegove lokacije u okviru sistema za transmisiju nociceptivnih informacija. Postoji ukupno sedam tipova serotoninских receptora (5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub>), i većina su receptori vezani za G-proteine, sa izuzetkom 5-HT<sub>3</sub> tipa koji predstavlja katjonski jonotropni receptor. Posebno značajnu ulogu u procesu modulacije bola igraju serotoninски receptori 5-HT<sub>1</sub> tipa (A, B i D podtipa) čija aktivacija doprinosi ublaženju bolne senzacije (aktivacijom G<sub>i</sub> proteina i smanjenjem stvaranja cAMP-a), dok se serotoninски receptori 5-HT<sub>2</sub> (aktivacijom G<sub>q</sub> proteina i povećanjem intracelularnih nivoa Ca<sup>2+</sup>) i 5-HT<sub>3</sub> tipa (ekscitatorni jonotropni receptor) uglavnom dovode u vezu sa nastankom i pojačanjem bolne senzacije. Postoje dokazi da su receptori 5-HT<sub>7</sub> tipa takođe značajni za nastanak antinociceptivnih efekata (**Kayser i sar., 2007;2010; Loyd i sar., 2013**). Sa aspekta farmakoterapije bola najveći značaj imaju 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptori, jer predstavljaju ciljno mesto dejstva lekova iz grupe triptana, koji se klinički koriste za ublaženje bola u napadu migrene (**Ong i Felice, 2018**).

Značajan centralan izvor serotonergičke modulacije bola je RVM. Ova struktura u moždanom stablu obuhvata nekoliko serotonergičkih jedara (poput *nucleus raphe magnus*), čiji neuroni se nishodno projektuju ka sekundarnim neuronima u kičmenoj moždini i medularnom dorzalnom rogu. Aktivacija nishodnih puteva poreklom iz RVM dovodi do povećanog oslobađanja serotonina na nivou kičmene moždine, koji može proizvesti pronociceptivne ili antinociceptivne efekte u zavisnosti od toga koji tip 5-HT receptora se aktivira. Aktivacija spinalnih 5-HT<sub>1A/1B/1D</sub> i 5-HT<sub>7</sub> receptora uglavnom proizvodi antinociceptivne efekte, dok 5-HT<sub>2</sub> i 5-HT<sub>3</sub> receptori uglavnom imaju pronociceptivnu ulogu. Postojanje različitih tipova 5-HT receptora na nivou kičmene moždine može pružiti dodatno objašnjenje kako neuroni RVM mogu inhibirati i facilitirati transmisiju nociceptivnih informacija (**Bannister i Dickenson, 2017; Chichorro i sar., 2017; Ossipov i sar., 2014**). Isto je od značaja naglasiti da su 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptori prisutni u okviru medularnih dorzalnih rogova, i da aktivacija ovih receptora otežava proces trigeminalne nociceptivne transmisije sa primarnog na sekundarni senzorni neuron, što predstavlja jedan od glavnih mehanizama dejstva lekova iz grupe triptana (**Levy i sar., 2004**). Pored lokacije u okviru kičmene moždine i medularnog dorzalnog roga, serotoninски receptori 5-HT<sub>1B/1D</sub> tipa su prisutni i u okviru PAG, i njihova aktivacija u ovoj oblasti se dovodi u vezu sa dezinhibicijom nishodnih inhibitornih puteva i nastankom antinociceptivnih efekata (**Akerman i sar., 2013; Jeong i sar., 2008**).

Takođe, pored značajnih efekata koje serotonin ostvaruje na nivou centralnog nervnog sistema, treba istaći da su serotoninски receptori takođe prisutni na perifernim aksonskim završecima nociceptora poreklom iz ganglija dorzalnog roga kičmene moždine i trigeminalnih ganglija (**Loyd i sar.,**

**2011;2013**). Na nivou perifernog nervnog sistema, serotonin se prevashodno smatra pronociceptivnim medijatorom. Izvor perifernog serotonina su trombociti i različite imunske ćelije koje na mestu povrede tkiva, oslobađanjem serotonina i drugih medijatora, doprinose nastanku bola i bolne preosetljivosti. Ulogu u ovom procesu igraju 5-HT<sub>3</sub> receptori, čija aktivacija može direktno ekscitirati periferne nociceptore, kao i 5-HT<sub>2</sub> receptori koji su značajni u nastanku inflamatorne hiperalgezije (putem povećanja osetljivosti proteina TRP familije) (**Loyd i sar., 2013**). Međutim, pored pronociceptivnih 5-HT<sub>2</sub> i 5-HT<sub>3</sub> receptora, periferni završeci nociceptora na svojoj površini takođe eksprimiraju inhibitorne receptore 5-HT<sub>1B/1D</sub> tipa, i u farmakološkim eksperimentima je pokazano da aktivacija ovih perifernih serotoninских receptora primenom selektivnih agonista može dovesti do nastanka antinociceptivnih efekata (**Loyd i sar., 2011;2013**).

### 1.3.2. Uloga noradrenalina i adrenergičkih receptora u modulaciji bola

Pored serotonina, noradrenalin je drugi monoamin koji igra presudnu ulogu u modulaciji transmisije nociceptivnih informacija. Noradrenalin svoje modulatorne efekte ispoljava putem dva tipa receptora vezanih za G-proteine,  $\alpha$ -adrenergičkih receptora (koji su podeljeni na  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ -adrenergičke receptore) i  $\beta$ -adrenergičkih receptora (koji su podeljeni na  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$ -adrenergičke receptore). Od svih navedenih, verovatno je najbolje proučena uloga  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora, za koje postoje podaci kako iz animalnih tako i iz humanih studija da posreduju u nastanku antinociceptivnih efekata (**Bannister i Dickenson, 2016; Ossipov i sar., 2014**). Ovi receptori su vezani za G<sub>i/o</sub> protein, i po aktivaciji dovode do smanjene aktivnosti adenilat ciklaze, inhibicije voltažno-zavisnih Ca<sup>2+</sup> kanala i aktivacije K<sup>+</sup> kanala. Dodatno, postoje dokazi da su  $\alpha_1$ -adrenergički receptori (vezani za G<sub>q</sub> protein; dovode do povećanja intracelularnih nivoa Ca<sup>2+</sup>) uglavnom u vezi sa olakšanjem transmisije nociceptivnih informacija, dok je uloga  $\beta$ -adrenergičkih receptora slabije proučena (**Pertovaara, 2009;2013**).

Glavni izvor centralne noradrenergičke modulacije bola su različita noradrenergička jedra prisutna u moždanom stablu, a najveći značaj za ovaj proces imaju neuroni *locus coeruleus*-a. Ovi neuroni predstavljaju glavno mesto sinteze noradrenalina u centralnom nervnom sistemu i daju nishodne projekcije ka neuronima dorzalnog roga kičmene moždine i medularnog dorzalnog roga koji su zaduženi za transmisiju nociceptivnih informacija. Dodatno, ova regija je inervisana od strane osovine PAG-RVM, i postoje dokazi da stimulacija PAG-RVM osovine, kao i stimulacija samog *locus coeruleus*-a dovodi do oslobađanja noradrenalina na nivou kičmene moždine, koji putem aktivacije  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora može inhibirati nociceptivnu transmisiju (**Bannister i Dickenson, 2016; Ossipov i sar., 2014; Samuels i Szabadi, 2008**). Ovi receptori su locirani presinaptički, na centralnim aksonskim granama primarnih senzornih neurona i njihova aktivacija inhibira oslobađanje neurotransmitera iz ovih završetaka. Takođe,  $\alpha_2$ -adrenergički receptori su locirani i postsinaptički, na membrani sekundarnih senzornih neurona i njihova aktivacija smanjuje ekscitabilnost i otežava generisanje akcionih potencijala u ovim neuronima (**Pertovaara, 2013**). Pored  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora, postoje i izvesni dokazi da aktivacija centralnih  $\beta$ -adrenergičkih receptora takođe može inhibirati transmisiju nociceptivnih informacija, dok aktivacija  $\alpha_1$  receptora na spinalnom nivou uglavnom olakšava proces nociceptivne transmisije (**Bannister i Dickenson, 2016; Ossipov i sar., 2014; Samuels i Szabadi, 2008**). Aktivnost descendentnog noradrenergičkog sistema se povećava u uslovima povrede perifernih nerava i tkiva u cilju da kompenzuje povećani priliv nociceptivnih impulsa. Povećana efikasnost spinalnog noradrenergičkog sistema može pružiti i mehanističko objašnjenje za efikasnost lekova poput antidepresiva (koji inhibiraju preuzimanje noradrenalina) i atipičnih opioda poput tramadola i tapentadola (takođe inhibiraju preuzimanje noradrenalina) u različitim bolnim stanjima (**Bannister i Dickenson, 2016; Ossipov i sar., 2014**).

Pored značajne uloge koju adrenergički receptori igraju na nivou kičmene moždine u kontroli procesa nociceptivne transmisije, bitno je naglasiti da su ovi receptori prisutni i na nivou perifernih grana primarnih senzornih neurona. U zdravom tkivu, noradrenalin ima minimalan uticaj na periferne nociceptore i osetljivost prema bolu. Međutim, u uslovima povrede perifernih tkiva ili nerava periferno oslobađanje noradrenalina može posredovati u nastanku antinociceptivnih ili pronociceptivnih efekata. Ovi različiti periferni efekti su posledica aktivacije različitih adrenergičkih receptora, pri čemu veliki broj podataka iz bihejvioralnih, neurofizioloških i/ili kliničkih studija ukazuju da aktivacija perifernih  $\alpha_2$  receptora uglavnom dovodi do ublaženja bolne senzacije, dok aktivacija perifernih  $\alpha_1$  i  $\beta$ -adrenergičkih receptora dovodi do nastanka bola i bolne preosetljivosti (**Pertovaara, 2009**).

### 1.3.3. Uloga acetilholina i holinergičkih receptora u modulaciji bola

Acetilholin i holinergički receptori su široko distribuirani u telu i igraju značajnu ulogu u regulaciji različitih fizioloških procesa, kako na periferiji, tako i u centralnom nervnom sistemu. U pogledu njihove uloge u regulaciji nocicepcije, postoji relativno puno dokaza da holinomimetici (agonisti holinergičkih receptora i inhibitori acetilholinesteraze) imaju značajnu antinociceptivnu/antihiperalgezijsku efikasnost u različitim modelima inflamatornog i neuropatskog bola, kao i analgetičku efikasnost kada se primene kod ljudi (npr. u kontroli postoperativnog bola ili prevenciji napada migrene) (**Jones i Dunlop, 2007; Naser i Kuner, 2018**). Međutim, uprkos postojanju dokaza o značajnoj ulozi holinergičke neurotransmisije u modulaciji bolne senzacije, trenutno holinomimetici nemaju veći klinički značaj za farmakoterapiju bola.

Acetilholin ispoljava svoje efekte preko dve vrste receptora, muskarinskih koji su receptori vezani za G-proteine i nikotinskih koji predstavljaju jonotropne receptore (ligand-zavisne katjonske kanale). Postoji ukupno 5 tipova muskarinskih receptora, ali se antinociceptivni efekti uglavnom dovode u vezu sa muskarinskim  $M_2$  receptorima. Ovi receptori su povezani sa  $G_{i/o}$  proteinom i dovode do smanjenja aktivnosti adenilat ciklaze, aktivacije  $K^+$  kanala i inhibicije voltažno-zavisnih  $Ca^{2+}$  kanala. Nikotinski receptori u centralnom nervnom sistemu su mnogo raznovrsniji, i uglavnom su organizovani kao heteropentameri od različitih  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinica (takođe postoje i homopentameri, poput  $\alpha_7$  nikotinskih receptora). U centralnom nervnom sistemu posebno su zastupljeni  $\alpha_7$  homopentamerni i  $\alpha_4\beta_2$  receptori. Aktivacija nikotinskih receptora je u vezi depolarizacijom neurona kao posledica ulaska jona  $Na^+$  u ćelije, međutim mogu biti propusni i za jone  $Ca^{2+}$  (posebno  $\alpha_7$  homopentameri) (**Naser i Kuner, 2018**).

Holinergička modulacija nocicepcije je posebno značajna na nivou kičmene moždine i medularnog dorzalnog roga (**Jeong i sar., 2013; Naser i Kuner, 2018; Zhang i sar., 2007**). Smatra se da su primarni izvor acetilholina na nivou kičmene moždine različite populacije interneurona. Holinergički interneuroni u kičmenoj moždini su malobrojna populacija ćelija, ali nastavci ovih ćelija grade kompleksnu i gustu mrežu unutar lamine II dorzalnih rogova kičmene moždine (za koju je poznato da igra značajnu ulogu u obradi nociceptivnih informacija) i inervišu veliki broj ćelija. Od svih tipova muskarinskih receptora, postoji najviše dokaza da su  $M_2$  receptori značajni za nastanak antinociceptivnih efekata. Ovaj receptor je ujedno i najzastupljeniji tip muskarinskog receptora u kičmenoj moždini (**Naser i Kuner, 2018**). Elektrofiziološke studije su pokazale da aktivacija presinaptičkih  $M_2$  muskarinskih receptora smanjuje oslobađanje glutamata iz primarnih senzornih neurona i na taj način stimulaciju sekundarnih neurona u okviru kičmene moždine i medularnog dorzalnog roga. Dodatno, postoje i pretpostavke da aktivacija postsinaptičkih  $M_2$  receptora može smanjiti ekscitabilnost sekundarnih neurona u kičmenoj moždini (**Jeong i sar., 2013; Naser i Kuner, 2018; Zhang i sar., 2007**). Pored muskarinskih, u kičmenoj moždini su prisutni i nikotinski holinergički receptori. Međutim, uloga ovih receptora nije u potpunosti jasna, jer aktivacija nikotinskih receptora na spinalnom nivou može da proizvede i antinociceptivne i pronociceptivne efekte, verovatno

zbog postojanja različitih tipova nikotinskih receptora koji posreduju u nastanku različitih efekata (**Naser i Kuner, 2018**). Dodatno, postoje dokazi da aktivacija nikotinskih receptora u okviru PAG, kao i nikotinskih ili muskarinskih receptora na nivou RVM dovodi do aktivacije nishodnih inhibitornih puteva koji se projektuju ka kičmenoj moždini (**Jones i Dunlop, 2007; Naser i Kuner, 2018**).

Pored jasne uloge u modulaciji bola na nivou centralnog nervnog sistema, holinergički receptori su takođe prisutni i na perifernim završecima primarnih nociceptivnih neurona i njihova aktivacija može imati uticaj na proces generisanja nociceptivnih impulsa (**Naser i Kuner, 2018**). U skladu sa tim, različite elektrofiziološke, neurohemijske i/ili bihejvioralne studije su pokazale da aktivacija perifernih muskarinskih M<sub>2</sub> receptora dovodi do inhibicije aktivnosti perifernih nociceptora i nastanka antinociceptivnih efekata (**Fiorino i Garcia-Guzman, 2012**).

#### **1.3.4. Uloga endokanabinoida i kanabinoidnih receptora u modulaciji bola**

Kanabinoidni receptori, endogeni agonisti kanabinoidnih receptora (endokanabinoidi), kao i enzimi uključeni proces njihove sinteze/razgradnje su prisutni na mnogim mestima duž neuralne osovine, od periferije do različitih struktura centralnog nervnog sistema. Dva najznačajnija endokanabinoida su arahidonoiletanolamin (anandamid) i 2-arahidonoilglicerol, derivati arahidonske kiseline. Endokanabinoidi se stvaraju po potrebi od fosfolipida ćelijske membrane i zbog visoke lipofilnosti se odmah oslobađaju iz ćelija koje ih sintetišu (**Guindon i Hohmann, 2010**). Različiti neurotransmiteri koji su uključeni u proces modulacije bola, poput serotonina i acetilholina, mogu dovesti do povećanja produkcije endokanabinoida i deo svojih efekata ispoljavati putem aktivacije kanabinoidnih CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub> receptora (**Burattini i sar., 2014; Gyombolai i sar., 2012; Lau i Vaughan, 2008**).

Endokanabinoidi i egzogeni kanabinoidi proizvode svoje farmakološke efekte putem aktivacije CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub> receptora, koji pripadaju superfamiliji receptora vezanih za G proteine. Aktivacija oba tipa kanabinoidnih receptora dovodi do inhibicije aktivnosti adenilat ciklaze (putem G<sub>i/o</sub> familije proteina). Pored toga, aktivacija CB<sub>1</sub> receptora negativno moduliše aktivnost presinaptičkih voltažno-zavisnih Ca<sup>2+</sup> (što dovodi do smanjenog oslobađanja neurotransmitera) i povećava aktivnost K<sup>+</sup> kanala (što dovodi do hiperpolarizacije membrane neurona) (**Guindon i Hohmann, 2010; Hohmann i Rice, 2013**).

Kanabinoidni receptori se nalaze u okviru različitih centralnih struktura značajnih za transmisiju i modulaciju nociceptivnih informacija, kao i na nivou perifernih završetaka primarnih senzornih neurona (s tim da su CB<sub>1</sub> receptori uglavnom locirani u okviru centralnog nervnog sistema, dok se CB<sub>2</sub> receptori uglavnom nalaze na periferiji) (**Guindon i Hohmann, 2010; Hohmann i Rice, 2013**). Za modulaciju bola, posebno značajno je da se CB<sub>1</sub> receptori nalaze u okviru PAG i RVM, i pokazano je da aktivacija kanabinoidnih receptora u ovim strukturama dovodi do antinociceptivnih efekata u eksperimentalnim modelima bola. Kanabinoidni CB<sub>1</sub> receptori su uglavnom locirani presinaptički u ovim strukturama, i pretpostavlja se da povećavaju njihovu aktivnost putem inhibicije oslobađanja GABA-e, što dovodi do dezinhibicije neurona u ovim regijama mozga i pojačanja nishodne inhibitorne modulacije bolne senzacije na nivou kičmene moždine i medularnog dorzalnog roga (**Akerman i sar., 2013; Guindon i Hohmann, 2010; Hohmann i Rice, 2013**). Takođe, CB<sub>1</sub> receptori su locirani u okviru površinskih slojeva dorzalnih rogova kičmene moždine i njihova aktivacija na ovoj lokaciji otežava transmisiju nociceptivnih impulsa sa primarnih na sekundarne senzorne neurone sistema za transmisiju nociceptivnih informacija (**Guindon i Hohmann, 2010; Hohmann i Rice, 2013**).

Oba tipa kanabinoidnih receptora se takođe nalaze na nivou perifernih nervnih završetaka primarnih senzornih neurona poreklom iz ganglija dorzalnih rogova kičmene moždine i trigeminalnih ganglija.

Aktivacija perifernih CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub> kanabinoidnih receptora, bilo direktna (primenom odgovarajućih agonista) ili indirektna (primenom inhibitora razgradnje kanabinoida) dovodi do antinociceptivnih i antihiperalgezijskih efekata u različitim modelima inflamatornog i neuropatskog bola (**Guindon i Hohmann, 2010; Hossain i sar., 2020; Sánchez Robles i sar., 2012; Wong i sar., 2017**).

### 1.3.5. Uloga endogenih opioida i opioidnih receptora u modulaciji bola

Endogeni opiodi (endorfini, enkefalini i dinorfini) i opioidni receptori ( $\mu$ ,  $\kappa$  i  $\delta$  opioidni receptori) igraju ključnu ulogu u modulaciji bolne senzacije. Podaci dobijeni korišćenjem genetski modifikovanih životinja (kojima je inaktiviran jedan ili više gena za različite opioidne receptore ili endogene opioidne peptide) ukazuju da je endogeni opioidni sistem veoma značajan u kontroli osetljivosti prema noksičnim stimulusima različite prirode, a izvesni podaci ukazuju da je kod pacijenata sa hroničnim bolom prisutno smanjenje endogenog opioidnog tonusa (**Dickenson i Kieffer, 2013; Martikainen i sar., 2013; Nascimento i sar., 2019**).

Opioidni receptori pripadaju superfamiliji receptora vezanih za G proteine. Spregnuti su sa G<sub>i/o</sub> inhibitornim proteinima i najznačajniji molekularni efekti njihove aktivacije su inhibicija aktivnosti voltažno-zavisnih Ca<sup>2+</sup> kanala i aktivacija K<sup>+</sup> kanala. Za ova dva efekta se smatra da su esencijalni za nastanak analgezije po aktivaciji opioidnih receptora od strane endogenih opioida i lekova koji se ponašaju kao agonisti opioidnih receptora (**Dickenson i Kieffer, 2013; Lueptow i sar., 2018**).

Na supraspinalnom nivou, dve značajne lokacije na koje deluju opiodi su PAG i RVM. Aktivacija opioidnih receptora u ovim strukturama je u vezi povećanjem aktivnosti nishodnih inhibitornih puteva koji se projektuju ka dorzalnim rogovima kičmene moždine i medularnom dorzalnom rogu, gde otežavaju transmisiju nociceptivnih impulsa. Smatra se da opiodi u ovim strukturama deluju mehanizmom dezinhibicije, verovatno inhibicijom GABAergičkih neurona koji tonično smanjuju aktivnost nishodnih inhibitornih puteva. Deo vlakana koja se projektuju od RVM ka kičmenoj moždini su serotonergička i enkefalinergička, i oslobađanje ovih neurotransmitera na nivou dorzalnih rogova kičmene moždine i medularnog dorzalnog roga suprimira transmisiju nociceptivnih impulsa aktivacijom odgovarajućih serotoninских i opioidnih receptora. Dodatno, PAG aktivira i noradrenergička jedra poput *locus coeruleus*-a, koji se takođe projektuju ka dorzalnim rogovima kičmene moždine i medularnom dorzalnom rogu i putem oslobađanja noradrenalina i aktivacije adrenergičkih receptora inhibira transmisiju nociceptivnih informacija (**Dickenson i Kieffer, 2013; Lueptow i sar., 2018; Chichorro i sar., 2017**).

Na nivou kičmene moždine, opioidni receptori su uglavnom locirani u površinskim slojevima dorzalnog roga (lamine I i II). Predominantan receptor na nivou kičmene moždine je  $\mu$ -opioidni receptor, i uglavnom je lociran presinaptički na centralnim aksonskim granama nociceptivnih primarnih senzornih neurona. Aktivacija opioidnih receptora (koja dovodi do inhibicije voltažno-zavisnih Ca<sup>2+</sup> kanala) dovodi do smanjenog oslobađanja neurotransmitera iz nociceptivnih aferentnih vlakana, i na taj način otežava nociceptivnu transmisiju prema sekundarnim senzornim neuronima puta bola. Aktivacija opioidnih receptora smeštenih na sekundarnim (postsinaptičkim) neuronima dovodi do povećanja otvorenosti K<sup>+</sup> kanala i posledične hiperpolarizacije (**Dickenson i Kieffer, 2013; Lueptow i sar., 2018**).

Iako se smatra da su centralni efekti opioida najznačajniji za nastanak analgetičkih efekata, bitno je naglasiti da su opioidni receptori prisutni i na nivou perifernih nervnih završetaka. Pod normalnim uslovima (kada nije prisutno oštećenje tkiva), doprinos perifernih opioidnih receptora sveukupnoj efikasnosti opioda je minimalan. Međutim, u slučaju povrede tkiva i periferne inflamacije dolazi do



povećanja ekspresije opioidnih receptora na nivou perifernih završetaka nociceptora, kao i do povećanja efikasnosti njihove aktivacije. Dodatno, na mestu inflamacije dolazi i do nakupljanja različitih imunskih ćelija koje proizvode endogene opioide, čije oslobađanje može doprineti ublaženju bolne senzacije (**Busch-Dienstfertig i Stein, 2010; Dickenson i Kieffer, 2013**).

#### 1.4. Alternativni analgetici

Farmakoterapija predstavlja osnovni pristup terapiji bola. Lekovi koji se najviše koriste za ublažavanje bola su standardni analgetici u koje spadaju opiodi, NSAIL i paracetamol. Iako su standardni analgetici nesumnjivo korisni u terapiji različitih bolnih stanja, neretko pokazuju nedovoljnu efikasnost i/ili nepovoljan bezbednosni profil. Produžena primena NSAIL je vezi sa povećanim rizikom od ozbiljnih gastrointestinalnih, kardiovaskularnih i renalnih neželjenih efekata, dok kod dugotrajne primene (naročito velikih doza) opioda postoji rizik od nastanka fizičke zavisnosti, adicije (prilikom terapije hroničnog nemalignog bola) i respiratorne depresije (prilikom predoziranja) (**Dowell i sar., 2016; Gilron i sar., 2013; Patrignani i Patrono, 2015; WHO, 2020**).

Razvoj novih analgetika u prethodnom periodu doživeo je nekoliko značajnih neuspeha, ili zbog nedostatka efikasnosti ili nepovoljne bezbednosti novih analgetičkih supstanci u kliničkim studijama ili postregistracionom periodu (npr. povlačenje izvesnih predstavnika COX-2 selektivnih inhibitora iz upotrebe zbog ozbiljnih kardiovaskularnih neželjenih efekata). Zbog poteškoća u razvoju analgetika sa novim, jedinstvenim mehanizmom dejstva posebno značajna istraživanja u polju farmakologije bola su ona koja se tiču otkrića novih alternativnih analgetika. Alternativni (adjuvantni ili atipični) analgetici predstavljaju raznorodnu grupu lekova čija primarna indikacija nije terapija bola, ali koji mogu biti efikasni u ublažavanju bolnih stanja. Navedeni pristup razvoju novih analgetika od već postojećih lekovitih supstanci je racionalan sa vremenskog i ekonomskog aspekta, imajući u vidu da se radi o lekovima koji su već odobreni za primenu kod ljudi i čija je bezbednost poznata, što olakšava i ubrzava njihov dalji razvoj kao potencijalnih analgetičkih supstanci (**Sisignano i sar., 2016**).

U najpoznatije predstavnike alternativnih analgetika spadaju lekovi iz grupe antiepileptika i antidepresiva. U Tabeli 1.1 su prikazane najznačajnije zvanične i *off-label* indikacije za primenu antiepileptika i antidepresiva u različitim bolnim stanjima. Za većinu antiepileptika se smatra da proizvode analgetički efekat menjanjem ekscitabilnosti neurona, gde putem različitih mehanizama (poput blokade voltažno-zavisnih Na<sup>+</sup> kanala ili voltažno-zavisnih Ca<sup>2+</sup> kanala) dovode do smanjene kondukcije ili transmisije nociceptivnih impulsa (**Kremer i sar., 2016; Tomić i sar., 2018**). U slučaju antidepresiva, smatra se da je u osnovi njihove analgetičke efikasnosti sposobnost da potenciraju serotonergičku i noradrenergičku neurotransmisiju, za koje je poznato da igraju ključnu ulogu u modulaciji bola (**Kremer i sar., 2016; Urits i sar., 2019**).

**Tabela 1.1.** Zvanične i *off label* indikacije za antiepileptike i antidepresive koji se koriste u terapiji različitih bolnih stanja

<b>Antiepileptici</b>	
<b>Gabapentinoidi</b>	<p><b>Gabapentin</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ periferni neuropatski bol - bolna dijabetesna neuropatija (jedan od lekova prvog izbora prema preporukama Američke asocijacije za dijabetes, ADA), post-herpetička neuralgija (<i>zvanične indikacije u EU/SAD</i>)</li> <li>○ profilaksa migrenoznih glavobolja - jedan od lekova trećeg izbora prema aktuelnim preporukama Evropske federacije neuroloških društava (EFNS) (<i>off label</i>)</li> </ul> <p><b>Pregabalin</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ periferni i centralni neuropatski bol - bolna dijabetesna neuropatija (jedan od lekova prvog izbora prema preporukama Američke asocijacije za dijabetes, ADA), post-herpetička neuralgija, bol nakon povrede kičmene moždine (<i>zvanične indikacije u EU/SAD</i>)</li> <li>○ fibromijalgija – preporuke Evropske lige za borbu protiv reumatizma (EULAR) (<i>zvanična indikacija u SAD</i>)</li> </ul>
<b>Dibenzazepini</b>	<p><b>Karbamazepin i okskarbazepin</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ trigeminalna neuralgija - lekovi izbora za dugotrajnu terapiju trigeminalne neuralgije prema aktuelnim preporukama Evropske federacije neuroloških društava (EFNS) (<i>zvanična indikacija u EU/SAD za karbamazepin; off label za okskarbazepin</i>)</li> </ul>
<b>Topiramata</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ profilaksa migrenoznih glavobolja - jedan od lekova prvog izbora prema aktuelnim preporukama Evropske federacije neuroloških društava (EFNS) i Američke akademije za neurologiju i Američkog udruženja za glavobolje (AAN/AHS) (<i>zvanična indikacija u EU/SAD</i>)</li> </ul>
<b>Valproati</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ profilaksa migrenoznih glavobolja - jedan od lekova prvog izbora prema aktuelnim preporukama Evropske federacije neuroloških društava (EFNS) i Američke akademije za neurologiju i Američkog udruženja za glavobolje (AAN/AHS) (<i>zvanična indikacija u SAD</i>)</li> </ul>
<b>Antidepresivi</b>	
<b>Triciklični antidepresivi</b>	<p><b>Amitriptilin</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ profilaksa glavobolje tenzionog tipa – lek prvog izbora prema aktuelnim preporukama Evropske federacije neuroloških društava (EFNS) (<i>zvanična indikacija u EU</i>)</li> <li>○ profilaksa migrenoznih glavobolja – jedan od lekova drugog izbora prema aktuelnim preporukama Evropske federacije neuroloških društava (EFNS) i Američke akademije za neurologiju i Američkog udruženja za glavobolje (AAN/AHS) (<i>zvanična indikacija u EU</i>)</li> <li>○ neuropatski bol - najviši nivo dokaza prema NeuPSIG grupi Međunarodnog udruženja za proučavanje bola (IASP) (<i>zvanična indikacija u EU</i>)*</li> </ul> <p><i>*Postoje izvesni dokazi o efikasnosti u neuropatskom bolu za druge predstavnike tricikličnih antidepresiva – dezipramin, nortriptilin, maprotilin, imipramin, klomipramin</i></p>

<p><b>Inhibitori preuzimanja serotonina i noradrenalina (SNRI)</b></p>	<p><b>Duloksetin</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ bolna dijabetesna neuropatija - jedan od lekova prvog izbora prema preporukama Američke asocijacije za dijabetes, ADA (<i>zvanična indikacija u EU/SAD</i>)</li> <li>○ neuropatski bol izazvan hemoterapeuticima – preporuke Američkog udruženja kliničkih onkologa (ASCO) (<i>off label</i>)</li> <li>○ fibromijalgija – preporuke Evropske lige za borbu protiv reumatizma (EULAR) (<i>zvanična indikacija u SAD</i>)</li> <li>○ osteoartritis – preporuke za lečenje osteoartritisa Američkog koledža reumatologije (<i>zvanična indikacija u SAD</i>)</li> </ul> <p><b>Venlafaksin</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ neuropatski bol – jedan od lekova sa najvišim nivoom dokaza prema NeuPSIG grupi Međunarodnog udruženja za proučavanje bola (IASP) (<i>off label</i>)</li> <li>○ profilaksa migrenozne glavobolje – jedan od lekova drugog izbora prema aktuelnim preporukama Evropske Federacije Neuroloških Društava (EFNS) i Američke akademije za neurologiju i Američkog udruženja za glavobolje (AAN/AHS) (<i>off label</i>)</li> <li>○ profilaksa glavobolje tenzionog tipa – jedan od lekova drugog izbora prema aktuelnim preporukama Evropske Federacije Neuroloških Društava (EFNS) (<i>off label</i>)</li> </ul> <p><b>Milnacipran</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ fibromijalgija (<i>zvanična indikacija u SAD</i>)</li> </ul>
--	---

**Reference: ADA, 2020b; Bendtsen i sar., 2010; 2019; eMC, 2020; Evers i sar., 2009; FDA, 2020; Finnerup i sar., 2015; Kolasinski i sar., 2020; Loprinzi i sar., 2020; Macfarlane i sar., 2017; Silberstein i sar., 2012.**

Pored antiepileptika i antidepresiva, postoje primeri i lekova iz drugih farmakoloških/farmakoterapijskih grupa koji nalaze kliničku primenu u terapiji bola, poput:

- **antagonista β-adrenergičkih receptora** (propranolol i metoprolol), koji predstavljaju jedne od lekova prvog izbora u prevenciji migrenoznih glavobolja prema aktuelnim evropskim i američkim preporukama (**Evers i sar., 2009; Silberstein i sar., 2012**),
- **bisfosfonata** (zoledronat, ibandronat i dr. predstavnici), koji se mogu koristiti za ublaženje bola koji prati razvoj koštanih metastaza (**WHO, 2020**),
- **glukokortikoida**, koji se sa manjim ili većim uspehom primenjuju kod niza bolnih stanja, poput osteoartritisa (**Kolasinski i sar., 2020**), migrenskog statusa ili prevencije klaster glavobolje (**Evers i sar., 2009; May i sar., 2006; Robbins i sar., 2016**), kancerskog bola (**WHO, 2020**) i drugih,
- **blokatora Ca<sup>2+</sup> kanala**, poput flunarizina koji predstavlja jedan od lekova prvog izbora za prevenciju napada migrene (**Evers i sar., 2009**), ili verapamila koji predstavlja terapiju izbora za prevenciju klaster glavobolja (**May i sar., 2006; Robbins i sar., 2016**).

Poslednjih godina, posebno su interesantni nalazi da lekovi iz grupe antibakterijskih lekova (poput određenih β-laktama i tetraciklina) i antidijabetika (poput metformina i pioglitazona) su pokazali analgetičku efikasnost u različitim modelima inflamatornog i neuropatskog bola (**Sisignano i sar., 2016; Stepanović-Petrović i sar., 2014**).

#### *Kombinovana primena alternativnih i standardnih analgetika*

Značajan aspekt savremene terapije bola je multimodalna analgezija - kombinovanje analgetika (iz različitih farmakoloških grupa) u cilju optimizovanja efikasnosti i/ili bezbednosti terapije. Idealna kombinacija bi poželjno trebalo da se sastoji od lekova koji imaju različit mehanizam dejstva, različit profil neželjenih efekata i minimalan potencijal da stupaju u nepoželjne farmakokinetičke interakcije

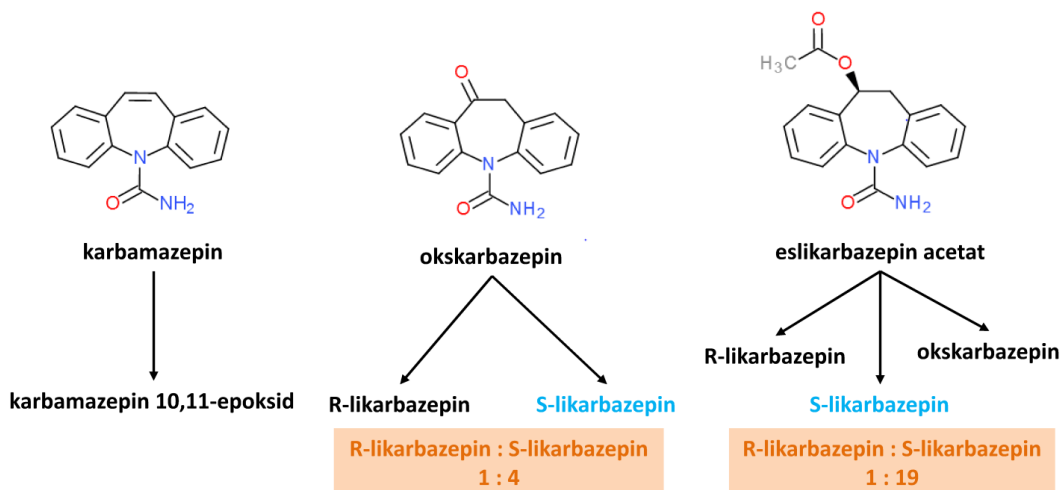
(**Gilron i sar., 2013**). Alternativni analgetici, zbog mehanizama dejstva i bezbednosnog profila koji se uglavnom razlikuju od postojećih standardnih analgetika, predstavljaju koristan dodatak konvencionalnoj terapiji, jer mogu omogućiti postizanje optimalne analgezije uz manje doze standardne terapije (i posledično, manje dozno-zavisnih neželjenih efekata). Na primer, postoje dokazi da primena gabapentinoida ili duloksetina može biti koristan dodatak standardnim analgeticima u cilju povećanja efikasnosti terapije postoperativnog bola, kao i da može umanjiti potrebu sa opioidnim analgeticima (**Govil i sar., 2020; Tiippana i sar., 2007; Yao i sar., 2015; Zhang i sar., 2011**). Alternativni analgetici se takođe mogu i međusobno kombinovati, posebno u terapiji neuropatskih bolova (**Gilron i sar., 2013; Mao i sar., 2011**). U skladu sa tim, ispitivanje interakcija između novih alternativnih i postojećih analgetika ima veliki klinički značaj, jer može ukazati na povoljnost ili nepovoljnost određenih kombinacija (kroz otkriće sinergističkih, aditivnih ili antagonističkih interakcija) i doprineti boljoj terapiji bola.

#### **1.4.1. Eslikarbazepin acetat**

Eslikarbazepin acetat (ESL) je predstavnik III generacije antiepileptika, koji je 2009. godine odobren u Evropi i 2013. godine u SAD za terapiju fokalnih epileptičnih napada (inicijalno kao adjuvantna terapija, a kasnije i kao monoterapija fokalnih napada). Primarni mehanizam antikonvulzivnog dejstva ESL je blokada voltažno-zavisnih Na<sup>+</sup> kanala (**Heo, 2020; Lawthom i sar., 2018; Shirley i Dhillon, 2016**). Ovaj antiepileptik predstavlja prolek, koji se nakon oralne primene brzo i gotovo potpuno hidrolizuje u jetri do aktivnog metabolita eslikarbazepina koji je odgovoran za farmakološke efekte (**Soares da Silva i sar., 2015**).

ESL pripada grupi dibenzazepinskih antiepileptika (u koju takođe spadaju karbamazepin i okskarbazepin) (**Slika 1.2**), ali kao posledica malih strukturnih razlika na poziciji 10,11 dibenzazepinskog prstena ima određene prednosti u odnosu na starije predstavnike ove grupe u pogledu farmakokinetike/metabolizma i farmakodinamike. Ove farmakokinetičke i farmakodinamske razlike dovode do bolje podnošljivosti ESL, efikasnosti u lečenju fokalnih epilepsija kod pacijenata koji nisu imali povoljan odgovor na starije predstavnike dibenzazepina, manje klinički značajnih farmakokinetičkih interakcija, i povoljniji režim doziranja (**Lawthom i sar., 2018**).

Za razliku od karbamazepina, ESL se ne metaboliše do epoksidnog metabolita koji doprinosi neželjenim efektima karbamazepina (poput pospanosti, vrtoglavice i diplopije). Dodatno, ESL nije sklon indukciji enzima, zbog čega ima manji uticaj na sopstvenu metaboličku razgradnju, metaboličku razgradnju drugih lekova (ponaša se kao slab induktor CYP3A4 izoenzima i UDP-glukuronil transferaze) i enzime uključene u endogene metaboličke puteve (potencijalno manji rizik od razvoja osteoporoze, seksualne disfunkcije, i poremećaja lipidnog profila) (**Heo, 2020; Lawthom i sar., 2018**). Dodatno, na farmakokinetiku ESL ne utiču značajno antiepileptici koji su induktori mikrozomalnih enzima jetre i valproat, a sam ESL ne utiče na farmakokinetiku lamotrigina (što je od značaja u slučaju kombinovane primene ova dva antiepileptika u terapiji fokalnih epilepsija) (**Heo, 2020; Lawthom i sar., 2018**).



**Slika 1.2.** Hemijska struktura i metabolizam dibenzazepinskih antiepileptika (preuzeto iz **Lawthom i sar., 2018**)

Metabolizam ESL se takođe razlikuje od metabolizma okskarbazepina. Okskarbazepin se u organizmu brzo transformiše do aktivnog hidrosilovanog metabolita (monohidroksi derivata) koji predstavlja kombinaciju enantiomera S-likarbazepina (eslikarbazepina) i R-likarbazepina (u odnosu 4:1). Metabolizam ESL je stereoselektivan i dovodi do stvaranja veće količine farmakološki aktivnog metabolita eslikarbazepina (**Slika 1.2**). Ovaj stereoselektivni metabolizam ESL ne dovodi do ranih pikova u koncentraciji R-likarbazepina i okskarbazepina u plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti koji se zapažaju nakon primene okskarbazepina, i za koje se smatra da doprinose neželjenim efektima poput vrtoglavice i glavobolje (**Heo, 2020; Lawthom i sar., 2018**).

Kao posledica dužeg poluvremena eliminacije aktivnog metabolita, ESL se uobičajeno primenjuje jednom dnevno, za razliku od starijih predstavnika dibenzazepina koji se primenjuju 2-3 puta dnevno, zavisno od doze i farmaceutskog oblika, što bi moglo da doprinese poboljšanju adherence od strane pacijenata (**Heo, 2020; Lawthom i sar., 2018**).

U pogledu farmakodinamskih karakteristika, u *in vitro* elektrofiziološkim studijama su zapažene neke značajne razlike između aktivnog metabolita ESL, eslikarbazepina, i karbamazepina/okskarbazepina. Eslikarbazepin pokazuje veći afinitet vezivanja za voltažno-zavisne  $\text{Na}^+$  kanale u inaktivnom stanju u odnosu na karbamazepin/okskarbazepin i pretežno smanjuje broj dostupnih  $\text{Na}^+$  kanala pospešivanjem procesa njihove spore inaktivacije (dok karbamazepin/okskarbazepin uglavnom smanjuju dostupnost  $\text{Na}^+$  kanala potenciranjem procesa brze inaktivacije) (**Soares da Silva i sar., 2015**). Ove farmakodinamske razlike mogu pružiti objašnjenje za efikasnost ESL u terapiji fokalnih epilepsija kod pacijenata koji nisu imali povoljan odgovor na karbamazepin/okskarbazepin (**Lawthom i sar., 2018**). Dodatno, za eslikarbazepin je pokazano da ne potencira aktivaciju  $\text{GABA}_A$  receptora (karbamazepin potencira aktivnost ovih kanala, što se dovodi u vezu sa pogoršanjem apsansnih epileptičnih napada) i da poseduje sposobnost da blokira voltažno-zavisne  $\text{Ca}^{2+}$  kanale T tipa ( $\text{Ca}_v3.2$ ) što može doprineti antiepileptogenim efektima koji su pokazani u animalnim modelima (**Soares da Silva i sar., 2015**).

## *Dibenzazepinski antiepileptici i terapija bola*

Karbamazepin i okskarbazepin su pokazali efikasnost u različitim modelima inflamatornog bola (Foong i Satoh, 1984a; Stepanović-Petrović i sar., 2008; Tomić i sar., 2004), kao i neuropatskog bola (npr. u modelu bolne dijabetesne neuropatije i neuropatije izazvane kompresijom korena trigeminalnog nerva) (Jeon i sar., 2012; Tomić i sar., 2010a). U kliničkim uslovima, karbamazepin i okskarbazepin predstavljaju lekove izbora u terapiji trigeminalne neuralgije (Bendtsen i sar., 2019), a pokazali su izvesnu efikasnost u terapiji drugih bolnih stanja (npr. u lečenju bolne dijabetesne neuropatije) (Finnerup i sar., 2010; Wiffen i sar., 2014). Za ESL trenutno ima malo kliničkih podataka u vezi njegovog analgetičkog dejstva, prevashodno u lečenju trigeminalne neuralgije (Alcántara Montero i Sánchez Carnerero, 2017; Sanchez-Larsen i sar., 2018).

Tačan mehanizam analgetičkog dejstva dibenzazepina nije u potpunosti razjašnjen. Osnovni mehanizam za koji se smatra da je odgovoran za antikonvulzivno dejstvo dibenzazepinskih antiepileptika je blokada voltažno-zavisnih Na<sup>+</sup> kanala (Soares-da-Silva i sar., 2015) i ovaj mehanizam verovatno doprinosi analgetičkoj efikasnosti ovih lekova (Tomić i sar., 2018). Međutim, opisani su i dodatni biološki efekti dibenzazepinskih predstavnika koji bi mogli da doprinesu njihovim analgetičkim svojstvima. U vezi sa tim, za starije dibenzazepine je pokazano da povećavaju serotonergičku (Baf i sar., 1994; Clinckers i sar., 2005; Tanahashi i sar., 2012), noradrenergičku (Baf i sar., 1994; Olpe i Jones, 1983) i holinergičku neurotransmisiju (Mizuno i sar., 2000; Zhu i sar., 2002) i nivoe navedenih medijatora u različitim regijama centralnog nervnog sistema. Likarbazepin (koji predstavlja racemsku smešu eslikarbazepina i R-likarbazepina) takođe povećava serotonergičku neurotransmisiju (Clinckers i sar., 2005). Serotonin, noradrenalin i acetilholin igraju važnu ulogu u modulaciji nocicepcije, i pojačanje neurotransmisije posredovane ovim medijatorima može dovesti do smanjenja ili pojačanja bolne senzacije, zavisno od tipa/podtipa receptora i njegove lokalizacije u okviru bolnog puta (videti deo 1.3. *Descendentna modulacija bola*). Dodatno, postoje dokazi da dibenzazepini ublažavaju bol direktnim uticajem na medularni dorzalni rog i PAG, dve strukture koje su uključene u transmisiju i modulaciju bola u trigeminalnoj regiji, i koje predstavljaju važno mesto dejstva endogenih i egzogenih kanabinoida i/ili opioida (Foong i Satoh, 1984b; 1985).

Imajući u vidu značaj karbamazepina i okskarbazepina kao analgetika (naročito u terapiji trigeminalnih bolova), ispitivanje antinociceptivnih/antihiperalgzijskih efekata ESL u različitim modelima inflamatornog i neuropatskog bola, kao i mehanizama koji doprinose ovim efektima, bi moglo da ukaže na potencijalnu novu terapijsku primenu ovog antiepileptika kao analgetika i da proširi postojeći repertoar alternativnih analgetika. Ako se uzme u obzir da ESL poseduje povoljnije farmakokinetičke karakteristike i potencijalno bolji bezbednosni profil u odnosu na starije dibenzazepinske predstavnike (Heo, 2020; Lawthom i sar., 2018) mogao bi da bude bolji kandidat za kombinovanu terapiju bola u odnosu na njih, a posebno bi bilo značajno ispitati njegove interakcije u modelima trigeminalnog bola (gde se dibenzazepini najviše koriste).

### **1.4.2. Metformin**

Metformin predstavlja lek izbora za inicijalnu terapiju dijabetes melitusa tipa 2 kod većine pacijenata, jer poseduje visoku antihiperглиkemijsku efikasnost, povoljan bezbednosni profil, nizak potencijal za interakcije, nisku cenu, kao i sposobnost da prevenira ozbiljne kardiovaskularne događaje i smrtnu ishodu. Dodatno, metformin se može koristiti i za prevenciju razvoja dijabetesa tipa 2 kod određenih grupa pacijenata u predijabetesnom stanju (ADA, 2020a).

Pored dobro ustanovljene primene metformina u terapiji dijabetesa tipa 2, poslednjih godina su brojne pretkliničke i/ili kliničke studije pokazale da metformin može ispoljiti korisne preventivne ili terapijske efekte kod niza patoloških stanja, poput različitih bolesti jetre, bubrega, kardiovaskularnog sistema, kancera, određenih neuroloških bolesti, ali i kod različitih bolnih stanja (**Price i sar., 2016; Steinberg i Carling, 2019; Wang i sar., 2017**).

Postoje brojni eksperimentalni dokazi da metformin poseduje analgetička svojstva u različitim modelima inflamatornog i neuropatskog bola (u Tabeli 1.2 je prikazan pregled najznačajnijih eksperimentalnih radova u kojima je pokazana analgetička efikasnost metformina). Značajan eksperimentalan rezultat sa kliničkog aspekta je efikasnost metformina u ublažavanju bihevioralnih manifestacija bolne dijabetesne neuropatije, a posebno interesantan je nalaz da metformin može da ublaži bolnu preosetljivost nakon akutne (sistemske ili lokalne periferne) primene u modelima dijabetesne neuropatije (**Huang i sar., 2016; Wang i sar., 2018**). Ovi rezultati sugerišu da bi analgetički efekat metformina mogao da se viđa i nezavisno od njegovog povoljnog uticaja na nivo glikemije. Takođe, metformin je pokazao i efikasnost nakon akutne sistemske primene u ublažavanju manifestacija inflamatornog bola (**Russe i sar., 2013**).

Pored rezultata iz pretkliničkih studija, postoje i izvesni klinički dokazi o analgetičkim efektima metformina (Tabela 1.3), gde je uglavnom ustanovljena efikasnost metformina u ublažavanju različitih oblika neuropatskog bola. Ovi nalazi su uglavnom u skladu sa rezultatima pretkliničkih studija. Pored rezultata navedenih u Tabeli 1.3, od značaja su i nalazi iz opservacione studije **Pop-Busui i sar. (2009)**, koji su utvrdili da je primena metformina (u kombinaciji sa tiazolidindionima) u vezi sa nižom prevalencijom nastanka dijabetesne neuropatije kod dijabetičara koji su lečeni ovom kombinacijom lekova.



**Tabela 1.2.** Najznačajnije prekliničke studije u kojima je pokazana analgetička efikasnost metformina

	<b>Model bola</b>	<b>Najznačajniji rezultati</b>	<b>Reference</b>
<b>Inflamatorni bol</b>	<b>Formalinski test</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓dužine nociceptivnog ponašanja u II fazi testa (100 mg/kg, akutna primena)</li> </ul>	<b>Russe i sar., 2013</b>
	<b>Inflamacija izazvana intraplantarnom injekcijom zimosana</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓mehaničke hiperalgezije indukovane zimosanom (100 mg/kg, akutna primena)</li> <li><i>Efekat metformina je izostao kod AMPK<math>\alpha</math>2<sup>-/-</sup> miševa (sa inaktivnom katalitičkom subjedinicom AMPK)</i></li> </ul>	<b>Russe i sar., 2013</b>
	<b>Modeli postoperativnog bola</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓mehaničke preosetljivosti (30-200 mg/kg/dan, produžena primena)</li> </ul>	<b>Burton i sar., 2017 Das i sar., 2019</b>
	<b>Model visceralnog bola izazvan lipopolisaharidom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ visceralne alodinije i permeabilnosti kolona (5-50 mg/kg/dan, produžena primena)</li> </ul>	<b>Nozu i sar., 2019</b>
<b>Neuropatski bol</b>	<b>Modeli bolne dijabetesne neuropatije</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ mehaničke alodinije kod <i>db/db</i> miševa (250 mg/kg/dan, produžena primena)</li> <li>▪ ↓ mehaničke alodinije kod <i>db/db</i> miševa (50 mmol/L, akutna lokalna intraplantarna primena)</li> <li>▪ ↓ mehaničke alodinije kod životinja sa dijabetesom indukovanim streptozotocinom (250 mg/kg, akutna primena ili 30-500 mg/kg/dan produžena primena)</li> <li>▪ ↓ termičke preosetljivosti (hladne i tople), kod životinja sa dijabetesom indukovanim streptozotocinom (30-500 mg/kg/dan, produžena primena)</li> </ul>	<b>Byrne i sar., 2015 Huang i sar., 2016 Ma i sar., 2015 Wang i sar., 2018</b>
	<b>Neuropatski bol izazvan hemoterapeuticima</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓mehaničke alodinije indukovane cisplatinom ili paklitakselom (200 mg/kg/dan, produžena primena)</li> <li>▪ ↓mehaničke i termičke hiperalgezije indukovane oksaliplatinom (25 <math>\mu</math>g, akutna intratekalna primena)</li> <li>▪ ↓mehaničke alodinije indukovane bortezomibom (150 mg/kg/dan, produžena primena)</li> </ul>	<b>Ling i sar., 2017 Ludman i Melemedjian, 2019 Mao-Ying i sar., 2014</b>
	<b>Neuropatski bol izazvan povredom ili podvezivanjem nerava</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ mehaničke preosetljivosti (50-1000 mg/kg, akutna ili produžena primena)</li> <li>▪ ↓ termičke preosetljivosti (50-250 mg/kg/dan, produžena primena)</li> </ul>	<b>Augusto i sar., 2019 Ge i sar., 2018 Inyang i sar., 2019 Liu i sar., 2019 Weng i sar., 2019</b>
	<b>Neuropatski bol izazvan povredom kičmene moždine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ mehaničke i termičke alodinije (10-100 mg/kg, akutna primena)</li> </ul>	<b>Afshari i sar., 2018</b>

**Tabela 1.3.** Kliničke studije u kojima je pokazana analgetička efikasnost metformina

Vrsta bolnog stanja	Dizajn studije i broj učesnika	Glavni rezultati	Referenca
<b>Lumbalna radikulopatija</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Retrospektivna studija</li> <li>▪ 46 pacijenata na terapiji metforminom i 94 pacijenata koji nisu primenjivali metformin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Intenzitet bola kod pacijenata koji su primenjivali metformin je bio značajno niži u odnosu na grupu koja nije primenjivala metformin</li> </ul>	<b>Taylor i sar., 2013</b>
<b>Neuropatija indukovana oksaliplatinom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Prospektivna randomizovana studija prevencije oksaliplatinske neuropatije kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom koji se podvrgavaju FOLFOX-4 hemoterapiji</li> <li>▪ Analizirani su podaci 20 pacijenata koji su uzimali metforminom (3 x 500 mg dnevno) i 20 kontrolnih pacijenata</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ U grupi pacijenata koji su primenjivali metformin bio je značajno niži broj pacijenata sa neuropatijom nivoa 2 i 3, kao i značajno niži intenzitet bola.</li> <li>▪ Dodatno, bili su značajno niži nivoi malondialdehida (marker oksidativnog stresa)</li> </ul>	<b>El-Fatraty i sar., 2018</b>
<b>Radikularni bol</b> <i>(subakutna i hronična cervikalna i lumbosakralna radikulopatija)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Prospektivna dvostruko slepa studija</li> <li>▪ Ispitan efekat kombinacije pregabalina (75 mg/dan) i metformina (500 mg/dan) tokom 3 meseca na intenzitet radikularnog bola</li> <li>▪ 35 pacijenata (monoterapija pregabalinom) i 36 pacijenata (kombinacija metformina i pregabalina)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kombinovana primena pregabalina i metformina je značajno ublažila bol</li> <li>▪ Nije utvrđena značajna razlika u odnosu na grupu tretiranu monoterapijom pregabalinom</li> </ul>	<b>Ansari i sar., 2018</b>
<b>Fibromijalgija</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pilot (otvorena) klinička studija</li> <li>▪ Šest žena sa fibromijalgijom (200 mg/dan metformina tokom mesec dana)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Metformin je značajno ublažio bol</li> <li>▪ Metformin je ublažio prateće manifestacije fibromijalgije, poput broja osetljivih tačaka, umora, depresivnih simptoma</li> </ul>	<b>Bullón i sar., 2016</b>

Analgetička svojstva metformina su dovedena u vezu sa njegovom sposobnošću da aktivira AMP-zavisnu protein kinazu, mehanizmom koji se razlikuje od postojećih standardnih i alternativnih analgetika (**Price i sar., 2016; Russe i sar., 2013**). Pored jedinstvenog mehanizma dejstva, metformin poseduje dobar bezbednosni profil i nije sklon farmakokinetičkim interakcijama (**ADA, 2020a; Graham i sar., 2011**), što ga čini povoljnim za kombinovanje sa postojećim analgeticima. Imajući u vidu da dijabetičari neretko boluju od različitih artritčnih poremećaja (koje prati inflamatorni bol) (**CDC, 2008**) i bolne dijabetesne neuropatije (**Feldman i sar., 2019**), od značaja je proširiti postojeće podatke o antinociceptivnoj/antihiperalgezijskoj efikasnosti ovog antidijabetika i ispitati njegove interakcije sa lekovima koji su pokazali efikasnost u terapiji inflamatornih i neuropatskih bolnih stanja kod ljudi.

## 2. Ciljevi rada

---

Ciljevi ove doktorske disertacije su bili:

### 1. Ispitivanje efekata ESL u eksperimentalnim modelima bola

#### 1.1. Ispitati efekte sistemski i/ili lokalno periferno primenjenog ESL u modelima inflamatornog i neuropatskog bola:

- u modelu inflamatornog trigeminalnog bola (orofacijalni formalinski test) – uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u prvoj i drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa,
- u modelu inflamatornog visceralnog bola (test grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom) – uticaj na broj abdominalnih kontrakcija izazvanih intraperitonealnom injekcijom sirćetne kiseline,
- u modelu bolne dijabetesne neuropatije indukovane streptozotocinom – uticaj na termičku i mehaničku hiperalgeziju koja se razvija kod dijabetičnih životinja.

#### 1.2. Ispitati efekat ESL u *rotarod* testu:

- ispitati efekat velikih doza ESL na motornu spretnost eksperimentalnih životinja i odrediti srednju efektivnu dozu za narušavanje motorne koordinacije ( $TD_{50}$ ),
- ispitati efekat najveće testirane doze ESL (koja je korišćena u modelu bolne dijabetesne neuropatije) na motornu spretnost dijabetičnih životinja.

### 2. Ispitati mehanizme dejstva ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola, korišćenjem farmakološkog pristupa (sistemskom i/ili lokalnom perifernom primenom antagonista različitih receptora značajnih za modulaciju bola):

- serotoninских 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora,
- $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\beta$ -adrenergičkih receptora,
- muskarinskih i nikotinskih holinergičkih receptora,
- CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub> kanabinoidnih receptora,
- opioidnih receptora.

### 3. Ispitati vrstu interakcija između ESL i standardnih/alternativnih analgetika (koji se klinički primenjuju kod različitih bolnih stanja u trigeminalnoj regiji) u modelu inflamatornog trigeminalnog bola:

- ispitati efekte paracetamola, propifenazona, naproksena, zolmitriptana i metoklopramida u orofacijalnom formalinskom testu,
- ispitati efekte dvokomponentnih kombinacija ESL i paracetamola/propifenazona/naproksena/zolmitriptana/metoklopramida u orofacijalnom formalinskom testu,
- utvrditi tip interakcije između ESL i standardnih/alternativnih analgetika izoblografskom analizom.

**Obrazloženje za izbor analgetika za ispitivanje interakcija sa ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola:** Paracetamol i naproksen su standardni analgetici koji se uobičajeno koriste za ublažavanje različitih bolnih stanja u trigeminalnoj regiji, samostalno ili u kombinaciji sa drugim lekovima (npr. glavobolja tenzionog tipa, migrena, odontogeni bol) (Bendtsen i sar., 2010; Evers i sar., 2009; Gibbs i Hargreaves, 2013). Propifenazon pripada grupi pirazolonskih derivata, koji se u mnogim zemljama koriste za lečenje različitih bolnih stanja (uključujući bola u trigeminalnoj regiji), i koje odlikuje povoljan gastrointestinalni i kardiovaskularni bezbednosni profil (Konijnenbelt-Peters i sar., 2017; Wehling, 2014). Zolmitriptan je lek iz grupe triptana, koji se prevashodno upotrebljavaju u tretmanu napada migrene (Evers i sar., 2009; Ong i De Felice,

2018). Metoklopramid se uobičajeno koristi u tretmanu napada migrene, zbog svojih antiemetičkih i prokinetičkih svojstava (koja mogu pojačati efekat oralno primenjenih lekova), ali je takođe pokazano da poseduje analgetičku efikasnost u ublažavanju migrenoznog bola u pretkliničkim i kliničkim studijama (Evers i sar., 2009; Doganay Aydin i sar., 2017; Ong i De Felice, 2018; Orr i sar., 2016).

#### 4. Ispitivanje efekata metformina u eksperimentalnim modelima bola

##### 4.1. Ispitati efekte sistemski primenjenog metformina u modelima inflamatornog i neuropatskog bola:

- u modelu inflamatornog somatskog bola (hiperalgezija indukovana karageninom) – uticaj na mehaničku hiperalgeziju,
- u modelu bolne dijabetesne neuropatije indukovane streptozotocinom – uticaj na mehaničku hiperalgeziju koja se razvija kod dijabetičnih životinja.

##### 4.2. Ispitati efekat metformina u rotarod testu:

- ispitati efekat najveće testirane doze (koja je korišćena u modelu somatskog inflamatornog bola) na motornu spretnost eksperimentalnih životinja.

#### 5. Ispitivanje interakcija između metformina i standardnih/alternativnih analgetika u eksperimentalnim modelima bola:

##### 5.1. Ispitati vrstu interakcija između metformina i standardnih/alternativnih analgetika (koji se klinički primenjuju u tretmanu različitih inflamatornih bolnih stanja) u modelu inflamatornog somatskog bola:

- ispitati efekte ibuprofena, aspirina, tramadola i pregabalina u modelu inflamatornog somatskog bola (hiperalgezija indukovana karageninom) – uticaj na mehaničku hiperalgeziju,
- ispitati efekte dvokomponentnih kombinacija metformina i ibuprofena/aspirina/tramadola/pregabalina u modelu inflamatornog somatskog bola (hiperalgezija indukovana karageninom) – uticaj na mehaničku hiperalgeziju,
- utvrditi tip interakcije između metformina i standardnih/alternativnih analgetika izobolografskom analizom.

**Obrazloženje za izbor analgetika za ispitivanje interakcija sa metforminom u modelu inflamatornog somatskog bola:** Ibuprofen i aspirin spadaju u grupu neselektivnih NSAIL i predstavljaju jedne od najčešće korišćenih analgetika za lečenje bolova inflamatorne prirode (Delaney i sar., 2011). Tramadol je atipični opioidni analgetik koji je indikovani u terapiji umerenih ili intenzivnih bolova. Smatra se da ima povoljniji bezbednosni profil u odnosu na druge opioidne analgetike, ali kao monoterapija nije uvek efikasan u ublažavanju intenzivnih bolova (zbog čega se često kombinuje sa neopiodnim analgeticima, poput paracetamola) (Dhillon, 2010; Grond i Sablotzki, 2004; Radbruch i sar., 2013). Pregabalin je gabapentinoidni antiepileptik koji predstavlja jedan od lekova izbora za lečenje različitih formi neuropatskog bola (Stahl i sar., 2013), ali se neretko koristi *off label* u terapiji drugih bolnih stanja (npr. bola u leđima) (Giladi i sar., 2015). Dodatno, pregabalin se pokazao kao koristan adjuvans konvencionalnim analgeticima u terapiji postoperativnog bola i osteoartritisa (Ohtori i sar., 2013; Zhang i sar., 2011).

**5.2. Ispitati vrstu interakcije između metformina i standardnih/alternativnih analgetika (koji su se pokazali efikasnim u tretmanu dijabetesne neuropatije) u modelu bolne dijabetesne neuropatije:**

- ispitati efekte duloksetina, oksikodona i vitamina B<sub>12</sub> u modelu bolne dijabetesne neuropatije - uticaj na mehaničku hiperalgeziju kod dijabetičnih životinja,
- ispitati efekte dvokomponentnih kombinacija metformina i ESL/duloksetina/oksikodona/vitamina B<sub>12</sub> u modelu bolne dijabetesne neuropatije - uticaj na mehaničku hiperalgeziju kod dijabetičnih životinja,
- utvrditi tip interakcije između metformina i standardnih/alternativnih analgetika izobolografskom analizom.

**Obrazloženje za izbor analgetika za ispitivanje interakcija sa metforminom u modelu bolne dijabetesne neuropatije:** Duloksetin je antidepresiv iz grupe SNRI, i predstavlja jedan od lekova prvog izbora za lečenje bolne dijabetesne neuropatije prema aktuelnim stručnim preporukama (**ADA, 2020b**). Oksikodon je predstavnik opioidnih analgetika za koga je pokazana klinička efikasnost u ublažavanju bolne dijabetesne neuropatije (**Gimbel i sar., 2003; Watson i sar., 2003**), ali zbog bezbednosnih rizika, primena oksikodona i drugih opioida se preporučuje samo u slučaju neefikasnosti bezbednijih lekova (**Pop-Busui i sar., 2017**). Vitamin B<sub>12</sub> je pokazao kliničku efikasnost u ublažavanju određenih manifestacija dijabetesne neuropatije (**Buesing i sar., 2019**). Dodatno, poznato je da hronična primena metformina može dovesti do deficijencije ovog vitamina (**Aroda i sar., 2016; Out i sar., 2018; Yang i sar., 2019**), što se dovodi u vezu sa pogoršanjem simptoma neuropatije kod dijabetičara.

### 3. Materijal i metode

---

#### 3.1. Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su izvedene na mužjacima miševa *Swiss Webster* (mase 20-30 g) i C57Bl/6 soja (mase 20-30 g na početku eksperimenata i starosti oko 3 meseca), kao i na mužjacima pacova *Wistar* soja (mase 180-220 g). Životinje su uzgajane na Vojnomedicinskoj Akademiji Republike Srbije. *Swiss Webster* miševi su korišćeni u modelu inflamatornog trigeminalnog i visceralnog bola, C57Bl/6 miševi u modelu bolne dijabetesne neuropatije, a *Wistar* pacovi u modelu inflamatornog somatskog bola. Dodatno, miševi oba soja, kao i pacovi korišćeni su za procenu uticaja različitih tretmana na motornu spretnost eksperimentalnih životinja (pomoću *rotarod* testa).

Životinje su čuvane u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, pod standardnim laboratorijskim uslovima: temperatura od 20-25°C, relativna vlažnost vazduha od 60%, sa trajanjem svetle i tamne faza po 12h. Životinje su bile smeštene u kavezima od pleksiglasa, sa žičanom rešetkom i podlogom od drvene strugotine. U jednom kavezu bilo je smešteno po 4-8 miševa ili 4-6 pacova. Hrana (briketi za ishranu eksperimentalnih životinja, Veterinarski zavod „Subotica” A.D., Srbija) i voda bili su dostupni *ad libitum*, osim tokom trajanja eksperimenta. Sve životinje su najmanje 3 dana pre početka eksperimenta boravile u prostorijama vivarijuma u cilju prilagođavanja na novu sredinu. Na dan eksperimenta, životinje su iz vivarijuma prenošene u laboratoriju bar 1 h pre početka eksperimenta. Svi eksperimenti su izvođeni uvek u isto doba dana (od 8 do 16h), kako bi se izbegle cirkadijalne varijacije u bihevioralnim testovima.

Eksperimentalne grupe su se sastojale od 5-12 životinja. Za svaki eksperimentalni model postojala je odgovarajuća kontrolna grupa koja je u istoj zapremini dobijala vehikulum za rastvaranje/suspendovanje ispitivanih supstanci i bila je podvrgnuta istoj eksperimentalnoj proceduri. Svaka životinja je korišćena u eksperimentu samo jednom. Nakon završetka eksperimenta, životinje su žrtvovane ugljen-dioksidom. Sve eksperimentalne procedure odobrene su od strane Etičke komisije za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (br. rešenja 323-07-03984/2017-05). Prilikom rada sa eksperimentalnim životinjama primenjivani su etički principi definisani Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i EU direktivom 2010/63/EU. U toku celokupnog istraživanja upotrebljeno je oko 850 miševa *Swiss Webster* soja, 450 miševa C57Bl/6 soja i 300 pacova *Wistar* soja.

### 3.2. Eksperimentalne supstance

U cilju indukcije bolnog stanja kod eksperimentalnih životinja, korišćene su sledeće algogene supstance:

- **formalin** (Reahem, Srbija) – za orofacijalni formalinski test,
- **sirćetna kiselina** (Zorka Pharma, Srbija) – za test grčeva,
- **karagenin** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) – za izazivanje inflamatorne mehaničke hiperalgezije u pacova,
- **streptozotocin** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) - za izazivanje dijabetesa i bolne dijabetesne neuropatije u miševa.

U eksperimentima u kojima je ispitivana efikasnost ESL i metformina u različitim modelima bola, korišćene su sledeće supstance:

- **eslikarbazepin acetat** (*čista supstanca*: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka; *tabletna smeša*: Zebinix<sup>®</sup>, Bial Portela & CA, Portugalija),
- **metformin** (*čista supstanca*: Galenika AD Beograd, Srbija; *tabletna smeša*: Glucophage<sup>®</sup>, Merck KGaA, Nemačka).

Za ispitivanje mehanizma dejstva ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola, korišćeni su sledeći receptorski antagonisti:

- **GR 127935-hidrohlorid, hidrat** (N-[4-metoksi-3-(4-metil-1-piperazini)fenil]-2'-metil-4'-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)-1,1'-bifenil-4-karboksiamid-hidrohlorid hidrat; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) – antagonist serotoninskih 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora,
- **prazosin-hidrohlorid** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) – antagonist  $\alpha_1$ -adrenergičkih receptora,
- **johimbin-hidrohlorid** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) – antagonist  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora,
- **propranolol-hidrohlorid** (Galenika AD Beograd, Srbija) – neselektivni antagonist  $\beta$ -adrenergičkih receptora,
- **metoprolol-tartarat** (Presolol<sup>®</sup>, Hemofarm AD Vršac, Srbija) – antagonist  $\beta_1$ -adrenergičkih receptora,
- **atropin-sulfat** (Zhejiang Essuan, Kina) – neselektivni antagonist muskarinskih receptora,
- **mekamilamin-hidrohlorid** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) – neselektivni antagonist nikotinskih receptora,
- **AM251** (1-(2,4-dihlorofenil)-5-(4-jodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazol-3-karboksiamid; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) – antagonist kanabinoidnih CB<sub>1</sub> receptora,
- **AM630** (6-jodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4-metoksifenil)metanon; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) – antagonist kanabinoidnih CB<sub>2</sub> receptora,
- **nalokson-hidrohlorid, dihidrat** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) – neselektivni antagonist opioidnih receptora.

U eksperimentima u kojima je ispitan efekat dvokomponentnih kombinacija ESL/metformina i standardnih/alternativnih analgetika, korišćene su sledeće aktivne supstance:

#### U modelu inflamatornog trigeminalnog bola

- **paracetamol** (tabletna smeša: Panadol<sup>®</sup>, GSK Dungarvan Ltd., Irska),
- **propifenazon** (čista supstanca: Alkaloid AD Skoplje, Makedonija),
- **naproksen** (tabletna smeša: Nalgesin<sup>®</sup> forte, Krka Tovarna Zdravil D.D., Slovenija),
- **zolmitriptan** (tabletna smeša: Zomig<sup>®</sup>, AstraZeneca UK Limited, Velika Britanija),
- **metoklopramid** (tabletna smeša: Klometol<sup>®</sup>, Galenika AD Beograd, Srbija),

#### U modelu inflamatornog somatskog bola

- **ibuprofen** (čista supstanca: Aliapharm GmbH, Nemačka),
- **aspirin** (tabletna smeša: Aspirin, Bayer Bitterfeld GmbH, Nemačka),
- **tramadol** (rastvor za injekciju: Trodon, Hemofarm AD Vršac, Srbija),
- **pregabalín** (tabletna smeša: Lyrica<sup>®</sup>, Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH, Nemačka),

#### U modelu bolne dijabetesne neuropatije

- **duloksetin** (tabletna smeša: Cymbalta<sup>®</sup>, Lilly S.A., Španija),
- **oksikodon** (tabletna smeša: OxyContin<sup>®</sup>, Mundipharma GmbH, Nemačka),
- **vitamin B<sub>12</sub>**, u obliku hidroksokobalamina (rastvor za injekciju: OHB12, Galenika AD Beograd, Srbija).

### **3.3. Priprema i primena algogenih supstanci**

Rastvor formalina se pripremao razblaživanjem komercijalno dostupnog štoka fiziološkim rastvorom do koncentracije od 2% (v/v) i primenjivao se supkutano (s.c.) u perinazalnu regiju miševa u zapremini od 20  $\mu$ L korišćenjem mikrolitarskog šprica i 26G igle. Za test grčeva, razblažena sirćetna kiselina (0,75% v/v, u fiziološkom rastvoru) je primenjivana intraperitonealno (i.p.) u zapremini od 10 mL/kg telesne mase miševa. Karagenin (1% m/v) se dan pre planiranih eksperimenata dispergovao u fiziološkom rastvoru i primenjivao intraplantarno (100  $\mu$ L po šapi pacova), pomoću šprica i 26G igle. Streptozotocin se, neposredno pre primene, rastvarao u 0,03 M citratnom puferu (pH = 4,5) i primenjivao i.p. u zapremini od 10 mL/kg telesne mase miševa.

### **3.4. Priprema i primena aktivnih supstanci**

Većina aktivnih supstanci je aplikovana peroralnim (p.o.) putem korišćenjem intragastrične sonde za miševu ili pacovu. Za p.o. primenu pripremane su suspenzije/rastvori lekovitih supstanci u odgovarajućem vehikulumu (destilovanoj vodi, sa ili bez dodatka kapi *Tween* 80 radi postizanja bolje homogenosti suspenzije tabletna smeše). Jedino metformin i tramadol (rastvoreni/razblaženi u fiziološkom rastvoru) su pacovima primenjeni i.p. putem, zbog niske oralne biorasploživosti ovih supstanci kod pacova (**Manconi i sar., 2013; Zhao i sar., 2008**), kao i vitamin B<sub>12</sub> koji je primenjen i.p. kod miševa, zbog uobičajene parenteralne primene hidroksokobalamina u kliničkim uslovima. Suspenzije/rastvori aktivnih supstanci primenjene su u finalnoj zapremini od 10 mL/kg telesne mase miševa ili 2 mL/kg telesne mase pacova.

U eksperimentima u kojima je ispitivan efekat/mehanizam dejstva ESL nakon lokalne periferne primene pripremljen je štok rastvor rastvaranjem ESL u čistom dimetilsulfoksidu (DMSO), a neposredno pre eksperimenta štok rastvor je razblažen fiziološkim rastvorom do odgovarajuće koncentracije. U ovim eksperimentima ESL je s.c. ubrizgavan u perinazalnu regiju u zapremini od 20



$\mu\text{L}$ . Finalna koncentracija DMSO je bila 20% (v/v) u svim tretmanima koji su primenjivani lokalno u perinazalnu regiju miševa.

### 3.5. Priprema i primena receptorskih antagonista

Štok rastvori antagonista su pripremljeni rastvaranjem antagonista u fiziološkom rastvoru (GR 127935, propranolol, atropin, mekamilamin, nalokson) ili DMSO (johimbin, prazosin, AM251, AM630), a neposredno pre primene su razblaženi fiziološkim rastvorom do odgovarajuće koncentracije. Metoprolol (u obliku komercijalno dostupnog rastvora za injekcije) je razblažen fiziološkim rastvorom. Rastvori antagonista su aplikovani i.p. (u zapremini od 10 mL/kg telesne mase miševa) ili lokalno periferno u perinazalnu regiju, sa ili bez ESL (u konačnoj zapremini od 20  $\mu\text{L}$ ). Najveća finalna koncentracija DMSO u sistemskim tretmanima je bila 4,8% (v/v), a u lokalnim tretmanima 20% (v/v).

### 3.6. Eksperimentalni modeli bola

#### 3.6.1. Model inflamatornog trigeminalnog bola

Kao model inflamatornog trigeminalnog bola korišćen je orofacijalni formalinski test. Test je izveden prema **Luccarini i sar.** (2006) uz manje izmene. Miševi *Swiss Webster* soja su ostavljeni da se adaptiraju na uslove komore za posmatranje od pleksiglasa (30 x 25 x 25 cm<sup>3</sup>), 30 minuta pre početka testa. Posle adaptacije, miševima je s.c. ubrizgavan rastvor formalina (u perinazalnu regiju). Nakon injekcije, pratili smo vreme koje životinje provode u nociceptivnom ponašanju (trljanje njuške ipsilateralnom prednjom ili zadnjom šapom) tokom 45 minuta. Injekcija formalina izaziva dve karakteristične faze nociceptivnog ponašanja koje su posledica različitih mehanizama: *prva faza* je kratkotrajna (0-9 min), javlja se neposredno nakon injekcije formalina i posledica je aktivacije nociceptora od strane formalina i drugih supstanci koje se oslobađaju na mestu oštećenja tkiva; *druga faza* je dugotrajnija (9-45 min) i posledica je zapaljenjske reakcije na mestu injekcije i promena na nivou centralnih neuronskih puteva koje olakšavaju transmisiju nociceptivnih informacija (centralna senzitivizacija) (**Sawynok i Liu, 2003**).

Ovaj test je korišćen za ispitivanje:

- antinociceptivnih efekata sistemski (p.o.) i lokalno periferno primenjenog ESL (s.c. u perinazalnu regiju miševa),
- mehanizama antinociceptivnog efekta ESL i
- antinociceptivnih efekata dvokomponentnih kombinacija ESL i različitih standardnih/alternativnih analgetika (paracetamola, propifenazona, naproksena, zolmitriptana i metoklopramida) i utvrđivanje tipa njihove međusobne interakcije.

#### 3.6.1.1. Ispitivanje efikasnosti ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

Različite grupe miševa su oralno tretirane suspenzijom ESL ili vehikulumom (destilovanom vodom), 60 min pre injekcije formalina, nakon čega smo pratili uticaj tretmana na dužinu nociceptivnog ponašanja u prvoj i drugoj fazi testa (**Slika 3.1A**). Dodatno, ispitali smo efikasnost ESL nakon lokalne periferne primene u perinazalnu regiju miševa. U okviru ovih eksperimenata ESL ili vehikulum (20% DMSO u fiziološkom rastvoru) su primenjivani s.c. u perinazalnu regiju, 20 min pre injekcije formalina (**Slika 3.1B**). U cilju potvrde da je antinociceptivni efekat periferno primenjenog ESL lokalne prirode (a ne posledica resorpcije i ispoljavanja sistemskog dejstva), ispitan je efekat najveće testirane lokalne doze ESL (30  $\mu\text{g}$ /mišu) nakon s.c. kontralateralne primene (u odnosu na stranu formalinske injekcije), u posebnoj eksperimentalnoj grupi miševa.

Vreme koje su miševi proveli u nociceptivnom ponašanju je mereno u trominutnim intervalima. Pored toga, mereno je i ukupno, kumulativno, vreme (T) provedeno u nociceptivnom ponašanju u svakoj fazi testa. Za supstancu se smatra da je ispoljila antinociceptivnu efikasnost ako dovede do značajnog skraćanja vremena koje životinje provode u nociceptivnom ponašanju. Kumulativne T vrednosti (u sekundama) za svaku fazu testa prevedene su u procenat antinociceptivne aktivnosti (%AN) prema sledećoj formuli (Tomić i sar., 2015):

$$\%AN = \frac{\text{(srednja vrednost T kontrolne grupe – T pojedinačne životinje u test grupi)}}{\text{srednja vrednost T kontrolne grupe}} \times 100$$

U eksperimentu u kom je ispitivana efikasnost sistemski primenjenog ESL, ispitane su četiri različite doze ESL, dok su u slučaju lokalne periferne primene ESL ispitane tri različite doze ovog antiepileptika. Srednje efektivne doze (ED<sub>50</sub> vrednosti) ESL za oba puta primene su određene primenom linearne regresione analize odnosa log doze i antinociceptivnog efekta (Tallarida, 2000; Tallarida i Murray, 1986).

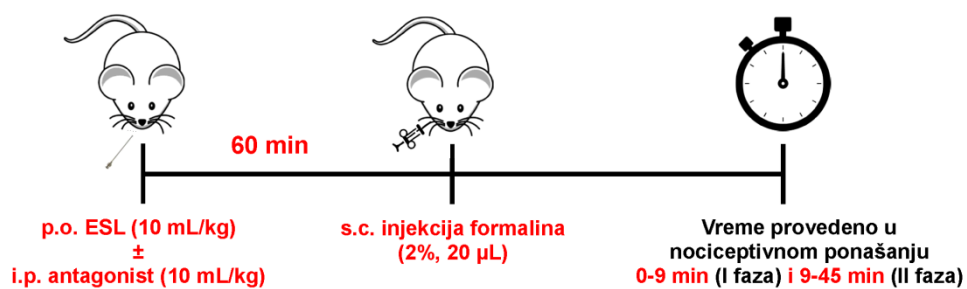
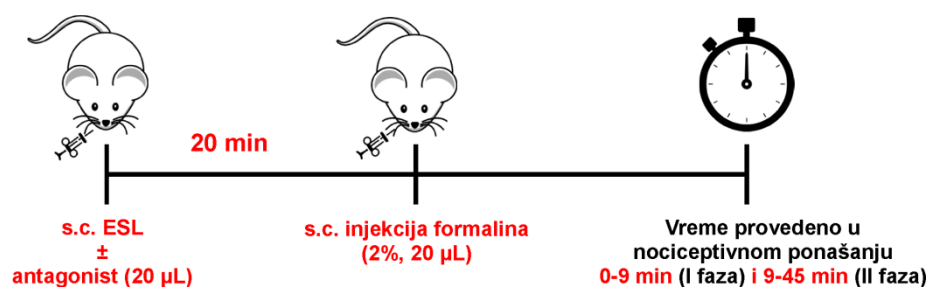
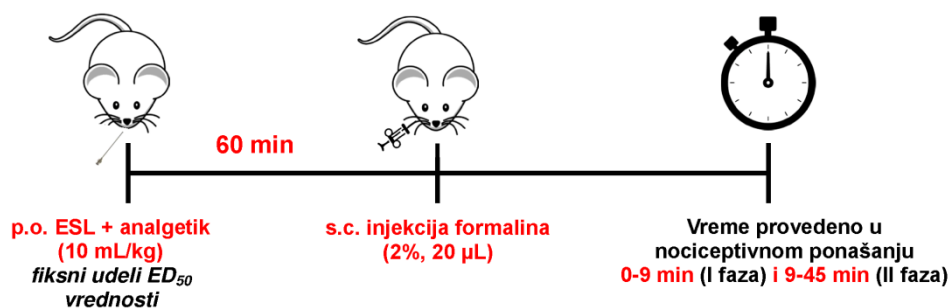
### 3.6.1.2. Ispitivanje mehanizma dejstva ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

Za ispitivanje mehanizma dejstva ESL u ovom modelu bola koristili smo farmakološki pristup. Pratili smo uticaj antagonista različitih receptora značajnih za modulaciju nocicepcije na antinociceptivni efekat fiksne, submaksimalne doze ESL koja je pokazala značajan antinociceptivni efekat (60 mg/kg; p.o.). Koristili smo fiksnu submaksimalnu dozu ESL koja je efikasna samo u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa, zbog većeg značaja ove faze za klinička bolna stanja u trigeminalnoj regiji. Prvo smo ispitali uticaj različitih antagonista nakon sistemske primene na antinociceptivni efekat sistemski primenjenog ESL. U ovim eksperimentima, antagonisti su primenjivani i.p. neposredno nakon ESL (60 min pre injekcije formalina) (Slika 3.1A).

Dodatno, ispitali smo i efekat određenih antagonista nakon lokalne periferne primene u perinazalnu regiju. U okviru ovih eksperimenata, antagonisti su primenjivani s.c. zajedno sa ESL u perinazalnu regiju miševa, 20 min pre injekcije formalina. Kao i u slučaju sistemske primene, koristili smo fiksnu submaksimalnu dozu ESL koja je pokazala značajan efekat nakon lokalne periferne primene (15 µg/mišu; s.c.) (Slika 3.1B). Step en inhibicije (u procentima) antinociceptivnog efekta ESL u drugoj fazi testa je računat prema sledećoj formuli (Tomić i sar., 2015):

$$\%I = 100 - \left( \frac{\%AN_{\text{u prisustvu antagoniste}}}{\%AN_{\text{u odsustvu antagoniste}}} \right) \times 100$$

Kako bismo isključili mogućnost da je uticaj antagonista na antinociceptivni efekat ESL posledica njihovog intrinzičkog efekta u orofacijalnom formalinskom testu, ispitali smo i uticaj najvećih testiranih sistemskih i lokalnih doza antagonista, kada se primene samostalno bez ESL, na dužinu nociceptivnog ponašanja u ovom testu.

**A****B****C**

**Slika 3.1.** Eksperimentalni protokol za ispitivanje efekata, mehanizama dejstva (A i B) i interakcija eslikarbazepin acetata (ESL) (C) u modelu inflamatornog trigeminalnog bola kod miševa. i.p. = intraperitonealno; p.o. = oralno; s.c. = supkutano.

### 3.6.1.3. Ispitivanje efekata dvokomponentnih kombinacija ESL i analgetika u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

U okviru ovih eksperimenata, prvo smo ispitali antinociceptivni efekat pojedinačnih standardnih/alternativnih analgetika (paracetamola, propifenazona, naproksena, zolmitriptana i metoklopramida) u orofacijalnom formalinskom testu. Za svaki analgetik ispitane su četiri različite doze i određene su njihove ED<sub>50</sub> vrednosti (linearnom regresionom analizom odnosa log doze i efekta) za drugu fazu testa. Svi analgetici su primenjeni p.o. 60 min pre injekcije formalina (**Slika 3.1C**). Nakon toga, pristupili smo ispitivanju antinociceptivne efikasnosti dvokomponentnih kombinacija ESL i standardnih/alternativnih analgetika u istom testu. ESL i analgetici su primenjivani u dozama koje odgovaraju fiksnim udelima njihovih srednjih efektivnih doza (1/16, 1/8, 1/5, 1/4, 1/3 i/ili 1/2 ED<sub>50</sub>), a antinociceptivni efekat je računat na goreopisan način (**Slika 3.1C**). Za svaku dvokomponentnu kombinaciju ESL i analgetika ispitali smo antinociceptivnu efikasnost četiri različite doze kombinacije, nakon čega su određene eksperimentalne ED<sub>50</sub> vrednosti kombinacija (ED<sub>50 mix</sub>). U cilju određivanja vrste interakcije koristili smo izoblografsku analizu (opisana u delu 3.7. *Analiza vrste interakcije između dva leka – izoblografaska analiza*; videti dole).

### 3.6.2. Model inflamatornog visceralnog bola

Kao model inflamatornog visceralnog bola korišćen je test grčeva, izazvanih i.p. injekcijom rastvora sirćetne kiseline (0,75% v/v). Sirćetna kiselina izaziva karakteristične grčeve (abdominalne kontrakcije, izvijanje tela unazad sa opružanjem jedne ili obe šape), koji se mogu kvantifikovati u određenom vremenskom intervalu. Grčevi počinju da se broje 5 minuta nakon i.p. injekcije sirćetne kiseline tokom narednih 15 minuta. Za supstancu se smatra da je ispoljila antinociceptivni efekat ako dovede do značajnog smanjenja broja grčeva u odnosu na kontrolnu grupu (**Stepanović-Petrović i sar., 2008**).

Ovaj model je korišćen za ispitivanje antinociceptivne efikasnosti ESL. Različite grupe miševa su p.o. tretirane suspenzijom ESL ili vehikulumom (destilovanom vodom), 55 min pre injekcije sirćetne kiseline. Antinociceptivni efekat (%AN) svake doze je izračunat na osnovu broja grčeva (N), korišćenjem sledeće formule (**Stepanović-Petrović i sar., 2014**):

$$\%AN = \frac{(\text{srednja vrednost N kontrolne grupe} - \text{N pojedinačne životinje u test grupi})}{\text{srednja vrednost N kontrolne grupe}} \times 100$$

U ovom modelu ispitali smo četiri različite doze ESL i odredili ED<sub>50</sub> vrednost linearnom regresionom analizom odnosa log doze ESL i antinociceptivnog efekta (**Tallarida, 2000; Tallarida i Murray, 1986**).

### 3.6.3. Model inflamatornog somatskog bola

Kao model somatskog inflamatornog bola korišćen je model inflamatorne mehaničke hiperalgezije šape pacova indukovane intraplantarnom injekcijom proinflamatornog sredstva, karagenina (**Micov i sar., 2010; Tomić i sar., 2013**). Rastvor karagenina (1% m/v) je primenjivan u zadnju desnu šapu pacova *Wistar* soja. Inflamacija indukovana karageninom je primer akutne inflamatorne reakcije u sklopu koje brzo dolazi do razvoja kardinalnih manifestacija zapaljenja – bolne preosetljivosti (hiperalgezije) i edema. Inflamacija izazvana karageninom se razvija kao posledica efekta velikog broja proinflamatornih medijatora – histamina, serotoninina, bradikinina, prostaglandina i drugih (**Morris, 2003**).

Razvoj mehaničke hiperalgezije nakon injekcije karagenina, kao i antihiperalgezijska aktivnost različitih tretmana praćena je merenjem mehaničkog praga povlačenja šape (engl. *Paw Withdrawal*

*Threshold*, PWT) pomoću elektronskog *Von Frey* aparata (IITC Life Science, SAD) (**Slika 3.2**). Pacovi su smeštani u providne, plastične komore koje su bile postavljene na metalnu podlogu sa perforiranim dnom i ostavljeni oko 30 min da se adaptiraju na novu sredinu. Nakon toga, izmerene su bazalne PWT vrednosti pre injekcije karagenina. Mehanička stimulacija zadnje desne šape je izvršena pomoću semifleksibilnog filameta koji je bio povezan za trandjuserom aparata. Vrh filameta je postavljen pod pravim uglom na plantarnu stranu zadnje desne šape i mehanička sila je postepeno povećavana (tako da ne izazove odizanje šape od podloge) sve do pojave bihejvioralne reakcije kod pacova (naglo povlačenje šape). Sila (u gramima) koja je bila potrebna da izazove brzo povlačenje šape je automatski zabeležena na digitalnom ekranu aparata. Nakon izazivanja inflamacije, dolazi do postepenog smanjivanja PWT vrednosti inflamirane šape (efikasni antihiperlgezijski tretmani su sposobni da preveniraju smanjenje ili mogu dovesti do povećanja PWT vrednosti). Rezultati su prikazani kao razlika (*df*) između bazalnih PWT vrednosti (pre injekcije karagenina) i PWT vrednosti nakon primene karagenina (**Vivancos i sar., 2004**):

$$df = PWT_{\text{pre injekcije karagenina}} (g) - PWT_{\text{posle injekcije karagenina}} (g)$$

U ovom modelu ispitali smo:

- antihiperlgezijsku aktivnost sistemski primenjenog metformina i
- antihiperlgezijsku aktivnost dvokomponentnih kombinacija metformina i standardnih/alternativnih analgetika (ibuprofena, aspirina, tramadola i pregabalina) i tip interakcije između njih.

### 3.6.3.1. Ispitivanje antihiperlgezijske aktivnosti metformina

Za ispitivanje antihiperlgezijskih efekata metformina, lek je primenjivan i.p. neposredno pre intraplantarne injekcije karagenina. Kontrolna grupa životinja je dobila vehikulum (fiziološki rastvor) i.p. u istoj zapremini i intraplantarnu injekciju karagenina. Bazalne PWT vrednosti su izmerene pre izazivanja inflamacije i pre primene metformina. Test merenja su vršena u sedam vremenskih tačaka - 60, 90, 120, 150, 180, 240 i 300 min nakon izazivanja inflamacije šape. Za svaku vremensku tačku, izmerene su barem četiri PWT vrednosti za svakog pacova, a srednja vrednost je korišćena u daljim izračunavanjima (**Slika 3.2A**). Antihiperlgezijska aktivnost (%AH) metformina je računata za svaku vremensku tačku prema sledećoj formuli:

$$\%AH = \frac{(\text{srednja vrednost } df \text{ kontrolne grupe} - df \text{ pojedinačne životinje u test grupi})}{\text{srednja vrednost } df \text{ kontrolne grupe}} \times 100$$

Ukoliko je *df* pojedinačne životinje u test grupi bila veća od srednje vrednosti *df* kontrolne grupe, računato je da je %AH efekat 0%.

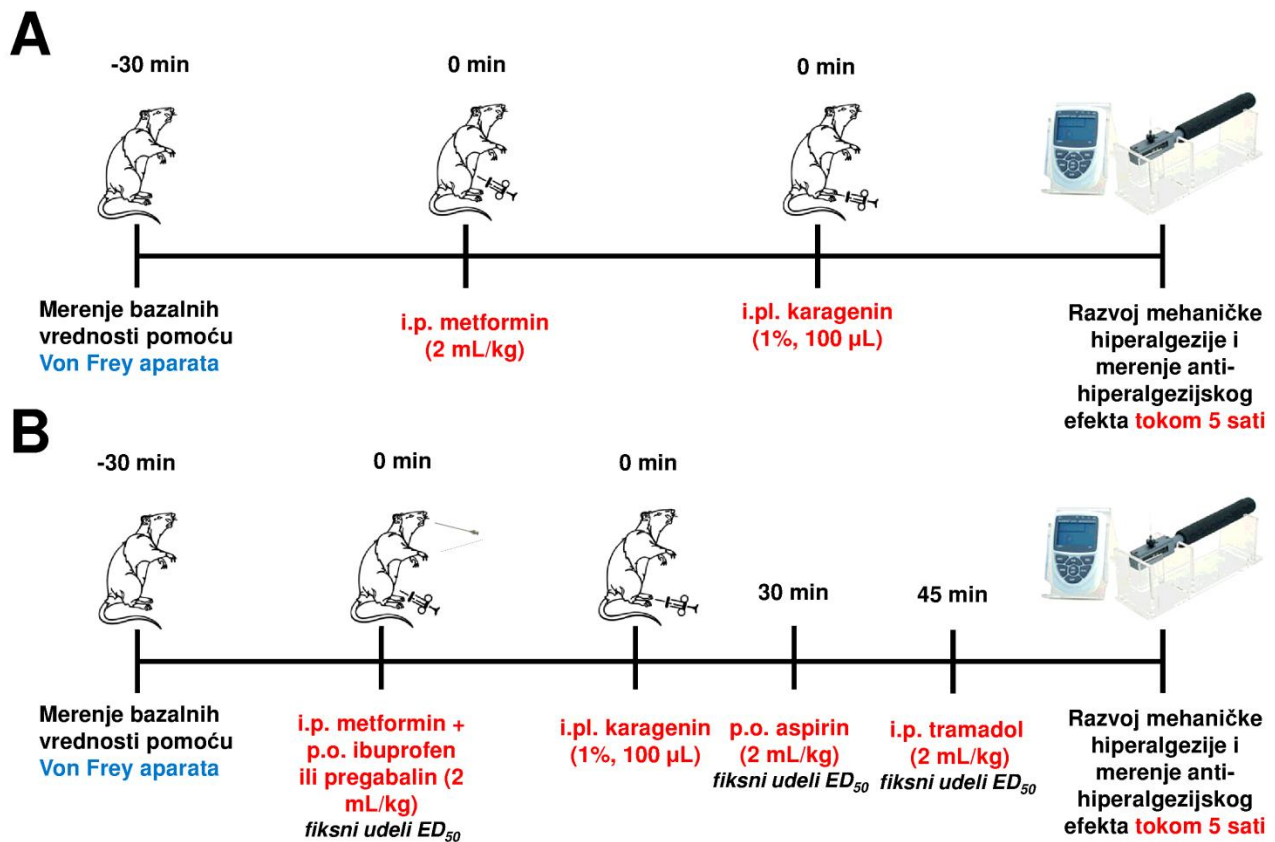
U ovom eksperimentalnom modelu ispitali smo antihiperlgezijsku efikasnost četiri različite doze metformina. ED<sub>50</sub> vrednost metformina utvrđena je regresionom analizom linearnog dela odgovarajuće krive odnosa log doze i antihiperlgezijskog efekta (**Tallarida, 2000; Tallarida i Murray, 1986**).

### 3.6.3.2. Ispitivanje antihiperlgezijske aktivnosti dvokomponentnih kombinacija metformina i standardnih/alternativnih analgetika

U ovim eksperimentima, prvo je ispitana antihiperlgezijska aktivnost pojedinačnih standardnih/alternativnih analgetika (ibuprofena, aspirina, tramadola i pregabalina). Za svaki analgetik ispitane su četiri doze i određene su njihove ED<sub>50</sub> vrednosti (u vreme postizanja maksimalnog antihiperlgezijskog efekta). Ibuprofen i pregabalin su primenjeni p.o. neposredno pre injektovanja

karagenina. Aspirin je primenjen p.o. 30 min nakon indukcije inflamacije, a tramadol i.p. 45 min nakon karageninske injekcije (**Slika 3.2B**). Vreme primene analgetika je izabrano na osnovu vremena postizanja maksimalnog efekta metformina, literaturnih podataka o vremenskom toku razvoja karageninske inflamacije i dužini dejstva/vremenu postizanja maksimalnih antihiperalgezijskih efekata pojedinačnih analgetika (**Fernandez-Duenas i sar., 2008; Hurley i sar., 2002; Russe i sar., 2013; Rutten i sar., 2011; Tomić i sar., 2013**).

Nakon određivanja efikasnosti i  $ED_{50}$  vrednosti pojedinačnih analgetika, pristupilo se ispitivanju efikasnosti dvokomponentnih kombinacija metformina i ibuprofena/aspirina/tramadola/pregabalina. Za svaku kombinaciju ispitane su četiri doze kombinacije metformina i pojedinačnog analgetika (koje su se sastojale od 1/16, 1/8, 1/4 i 1/2  $ED_{50}$  vrednosti pojedinačnih lekova). Kao i u slučaju ispitivanja antihiperalgezijske aktivnosti metformina, bazalne PWT vrednosti su izmerene pre izazivanja inflamacije i primene analgetika/kombinacija, a test merenja su vršena 60, 90, 120, 150, 180, 240 i 300 min nakon izazivanja inflamacije šape. Za svaku vremensku tačku, izmerene su barem četiri PWT vrednosti za svakog pacova, a srednja vrednost je korišćena u daljim izračunavanjima (**Slika 3.2B**). Na osnovu PWT vrednosti pre i nakon indukcije inflamacije izračunati su maksimalni %AH (na goreopisan način) koji su posle korišćeni za određivanje eksperimentalne  $ED_{50}$  vrednosti kombinacije ( $ED_{50\text{ mix}}$ ). U cilju određivanja vrste interakcije koristili smo izobolografsku analizu (opisana u delu 3.7. *Analiza vrste interakcije između dva leka – izobolografška analiza*; videti dole).



**Slika 3.2.** Eksperimentalni protokol za ispitivanje efekata (**A**) i interakcija (**B**) metformina (**MET**) u modelu inflamatornog somatskog bola kod pacova. i.p. = intraperitonealno; i.pl. = intraplantarno; p.o. = oralno.

### 3.6.4. Model bolne dijabetesne neuropatije

Kao model neuropatskog bola korišćen je model bolne dijabetesne neuropatije indukovane streptozotocinom u miševa (**Micov i sar. 2015; Tomić i sar. 2010a**).

#### 3.6.4.1. Indukcija dijabetesa i određivanje glikemije

Dijabetes je izazivan kod mužjaka miševa C57Bl/6 soja pojedinačnom dozom streptozotocina (150 mg/kg; i.p.). Dve nedelje nakon primene streptozotocina, određivala se koncentracija glukoze u krvi miševa u cilju potvrde razvoja dijabetesa. Krv je uzorkovana iz repne vene miševa, a glikemija je određivana korišćenjem automatskog merača glukoze u krvi sa opsegom merenja 1,1-33,3 mmol/L (GlucoSure Autocode, Prizma, Srbija). Miševi sa glikemijom > 13,9 mmol/L (250 mg/dL) smatrali su se dijabetičnim (**Slika 3.3**) (**Micov i sar. 2015; Tomić i sar. 2010a**).

#### 3.6.4.2. Procena mehaničke i termičke hiperalgezije

Za procenu razvoja hiperalgezije (bolne preosetljivosti) kod dijabetičnih životinja korišćeni su aparati za izvođenje *Von Frey* testa, za procenu mehaničke hiperalgezije, i testa izmicanja repa pod uticajem toplote (*tail-flick* test), za procenu termičke hiperalgezije (**Micov i sar. 2015; Tomić i sar. 2010a**).

Testiranje mehaničke hiperalgezije sprovedeno je na sličan način koji je opisan u delu 3.6.3. *Model inflamatornog somatskog bola*. Miševima su merene PWT vrednosti (u gramima) pre indukcije dijabetesa, kao i nakon indukcije dijabetesa (2 i 3 nedelje posle primene streptozotocina). Nakon indukcije dijabetesa, dolazi do progresivnog smanjenja PWT vrednosti kod dijabetičnih životinja, kao odraz razvoja mehaničke hiperalgezije. Nivo mehaničke hiperalgezije koji se razvija kod dijabetičnih životinja je računat prema sledećoj formuli:

$$\%HA = \frac{PWT_{\text{bazal (2 ili 3 nedelje nakon indukcije)}} - PWT_{\text{bazal (pre indukcije)}}}{PWT_{\text{bazal (pre indukcije)}}} \times 100\%$$

Za testiranje razvoja termičke hiperalgezije kod dijabetičnih miševa korišćen je test izmicanja repa pod uticajem toplote (*tail-flick* test) (**Le Bars i sar., 2001; Micov i sar., 2015; Tomić i sar., 2010a**). Test se izvodi tako što se na kožu repa miševa aplikuje toplotni stimulus, a bolna reakcija životinje manifestuje se izmicanjem repa. U okviru testa se meri reakciono vreme (u sekundama) koje protekne od trenutka izlaganja repa životinje toplotnom zračenju do trenutka kada životinja naglo pomeri rep, što ukazuje da je dostignut prag bola. Za potrebe izvođenja testa, miševi su smeštani u plastične perforirane držače cilindričnog oblika (dijametra oko 3,2 cm i dužine oko 8 cm). Uoči testiranja, životinje su adaptirane na držače, u kojima su boravili po 30 min tokom 3 uzastopna dana. Prilikom merenja, toplotni stimulus je primenjen na deo repa koji je bio oko 4 cm udaljen od vrha, kroz otvor na postolju aparata. Pritiskanjem nožne pedale aparature (Hugo Sach Elektronik, Nemačka) istovremeno se aktiviraju toplotni znak i štoperica koja meri reakciono vreme. U trenutku kada životinja naglim pokretom izmakne rep, automatski se zaustavlja toplotno zračenje i štoperica, a na kontrolnoj ploči aparata očitava se reakciono vreme u sekundama (T). Intenzitet toplotnog zračenja aparata podešen je tako da bazalne vrednosti reakcionih vremena kod zdravih životinja (pre indukcije dijabetesa) iznose 4-6 sekundi. U cilju sprečavanja oštećenja tkiva, maksimalna dužina izlaganja toplotnom stimulusu je ograničena na 10 sekundi (*cut-off* vrednost). Kod dijabetičnih životinja, kao posledica razvoja neuropatskih promena dolazi do skraćivanja reakcionog vremena u *tail-flick* testu (**Micov i sar., 2015; Tomić i sar., 2010a**).

Nivo termičke hiperalgezije koji se razvio kod životinja (3 nedelje nakon primene streptozotocina) je procenjen primenom sledeće jednačine:

$$\%HA = \frac{T_{\text{bazal (3 nedelje nakon indukcije)}} - T_{\text{bazal (pre indukcije)}}}{10s - T_{\text{bazal (posle indukcije)}}} \times 100\%$$

U modelu bolne dijabetesne neuropatije ispitani su:

- antihiperalgezijski efekti ESL (ispitan je uticaj ESL na mehaničku i termičku hiperalgeziju),
- antihiperalgezijski efekti metformina (ispitan je uticaj metformina na mehaničku hiperalgeziju),
- antihiperalgezijski efekti dvokomponentnih kombinacija metformina i duloksetina/oksikodona/ESL/vitamina B<sub>12</sub> (ispitan je uticaj kombinacija na mehaničku hiperalgeziju), kao i vrsta interakcije između njih.

### 3.6.4.3. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta ESL u modelu bolne dijabetesne neuropatije

U modelu bolne dijabetesne neuropatije, ispitali smo uticaj p.o. primenjenog ESL na mehaničku hiperalgeziju (pomoću *Von Frey* testa) i termičku hiperalgeziju (pomoću *tail-flick* testa). Efekat ESL je ispitan kod miševa 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa, nakon pojedinačne, akutne primene. Antihiperalgezijske efekte smo pratili u šest vremenskih tačaka (30, 60, 90, 120, 180 i 240 min nakon primene ESL) (**Slika 3.3A**).

U slučaju mehaničke hiperalgezije, prvo su izmerene bazalne PWT vrednosti pre primene ESL (kod dijabetičnih miševa). Nakon primene ESL, pratili smo promenu PWT vrednosti. U svakoj vremenskoj tački izmerene su barem četiri PWT vrednosti za svakog miša, a njihova srednja vrednost je korišćena za dalja izračunavanja (**Slika 3.3A**). Antihiperalgezijski efekat (%AH) protiv mehaničke hiperalgezije računat je za svaku vremensku tačku korišćenjem sledeće formule:

$$\%AH = \frac{PWT_{\text{nakon primene ESL}} - PWT_{\text{bazal (3 nedelje nakon indukcije)}}}{PWT_{\text{bazal (pre indukcije)}} - PWT_{\text{bazal (3 nedelje nakon indukcije)}}} \times 100\%$$

Negativne i vrednosti %AH preko 100% su zaokružene na 0 i 100%, redom.

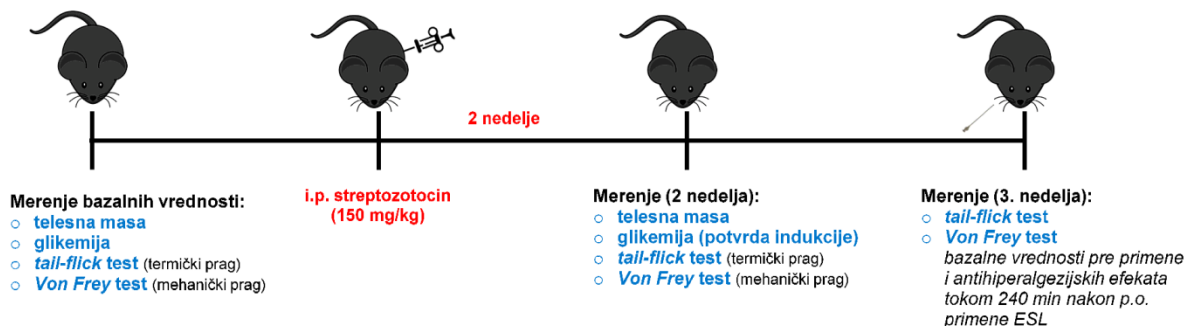
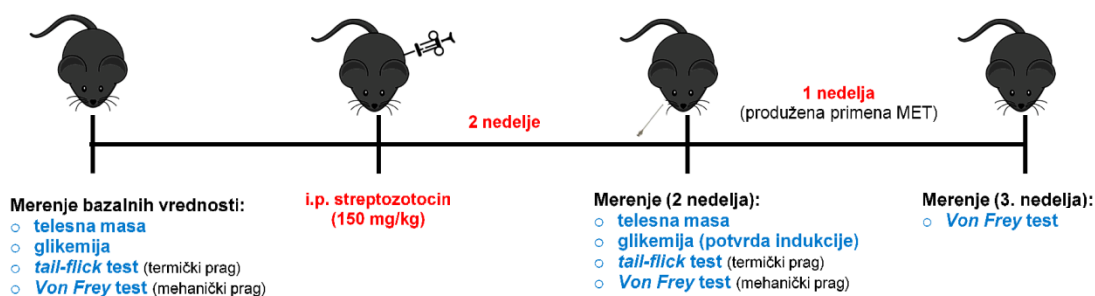
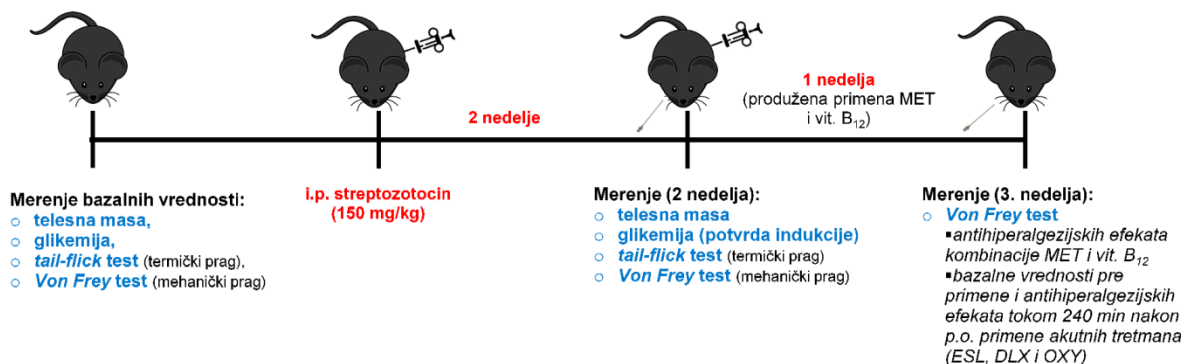
U slučaju testiranja uticaja ESL na termičku hiperalgeziju, isto smo ispitali efekte nakon pojedinačne primene u istim vremenskim tačkama kao i u slučaju ispitivanja mehaničke hiperalgezije (**Slika 3.3A**). Efikasnost ESL u ovom slučaju je računata uz pomoć izmerenih reakcionih vremena (za svaku vremensku tačku izmerene su po dve vrednosti za svaku eksperimentalnu životinju), kao procenat maksimalnog mogućeg efekta (engl. *Maximal Possible Effect*, %MPE), prema sledećoj formuli (**Tomčić i sar., 2010a**):

$$\%MPE = \frac{T_{\text{nakon primene ESL}} - T_{\text{bazal (3 nedelje nakon indukcije)}}}{10s - T_{\text{bazal (3 nedelje nakon indukcije)}}} \times 100\%$$

Negativne i vrednosti %MPE preko 100% su zaokružene na 0 i 100%, redom.

I u slučaju mehaničke i termičke hiperalgezije ispitana je efikasnost četiri različite doze ESL, nakon čega su određene ED<sub>50</sub> vrednosti, primenom linearne regresione analize odnosa log doze i antihiperalgezijskog/antinociceptivnog efekta.



**A****B****C**

**Slika 3.3.** Eksperimentalni protokol za ispitivanje antihiperalgezijskih efekata eslikarbazepin acetata (**ESL**) (**A**), metformina (**MET**) (**B**), kao i interakcija MET i standardnih/alternativnih analgetika (**C**) u modelu bolne dijabetesne neuropatije kod miševa. DLX = duloksetin; i.p. = intraperitonealno; OXY = oksikodon; p.o. = oralno; vit. B<sub>12</sub> = hidroksokobalamin.

#### 3.6.4.4. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta metformina u modelu bolne dijabetesne neuropatije

U modelu bolne dijabetesne neuropatije, ispitan je uticaj metformina na mehaničku hiperalgeziju koja se razvija kod dijabetičnih miševa. U ovim eksperimentima metformin je p.o. primenjivan hronično tokom 7 dana. Primena metformina je započeta 2 nedelje nakon indukcije dijabetesa. Pre početka primene metformina, izmerene su PWT vrednosti u 2. nedelji nakon indukcije. Procenat antihiperalgezijskog efekta metformina je meren u 3. nedelji, otprilike 24h posle primene poslednje doze metformina. Kao i u prethodnim slučajevima, u svakoj vremenskoj tački su izmerene po barem četiri PWT vrednosti za svakog miša, a njihova srednja vrednost je korišćena za dalje proračune (**Slika 3.3B**). Antihiperalgezijski efekat metformina protiv mehaničke hiperalgezije u modelu bolne dijabetesne neuropatije je izračunat korišćenjem sledeće formule:

$$\%AH = \frac{PWT_{\text{nakon primene metformina}} - PWT_{\text{bazal (2 nedelje nakon indukcije)}}}{PWT_{\text{bazal (pre indukcije)}} - PWT_{\text{bazal (2 nedelje nakon indukcije)}}} \times 100\%$$

Negativne i vrednosti %AH preko 100% su zaokružene na 0 i 100%, redom.

Kao i u prethodnim slučajevima, u ovom eksperimentalnom modelu ispitali smo antihiperalgezijsku efikasnost četiri različite doze metformina. Krive odnosa log doze i maksimalnog antihiperalgezijskog efekta analizirane su korišćenjem metode linearne regresije u cilju utvrđivanja ED<sub>50</sub> vrednosti (**Tallarida, 2000; Tallarida i Murray, 1986**).

#### 3.6.4.5. Ispitivanje antihiperalgezijskih efekata dvokomponentnih kombinacija metformina i standardnih/alternativnih analgetika u modelu bolne dijabetesne neuropatije

Navedeni eksperimenti su sprovedeni na sličan način koji je opisan u delu 3.6.3.2 (*Ispitivanje antihiperalgezijske aktivnosti dvokomponentnih kombinacija metformina i standardnih/alternativnih analgetika u modelu inflamatornog somatskog bola*).

Prvo je ispitana antihiperalgezijska aktivnost pojedinačnih standardnih/alternativnih analgetika (ESL, duloksetina, oksikodona i vitamina B<sub>12</sub>) u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Ispitan je uticaj navedenih analgetika na mehaničku hiperalgeziju koja se razvija kod dijabetičnih miševa. Za svaki analgetik ispitane su četiri različite doze i određene su njihove ED<sub>50</sub> vrednosti (linearnom regresionom analizom odnosa log doze i efekta). Ispitivanje efekata ESL u ovom modelu je opisano u delu 3.6.4.3. *Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta ESL u modelu bolne dijabetesne neuropatije* (efekat duloksetina i oksikodona je ispitan na identičan način kao što je opisano u ovom delu). Duloksetin i oksikodon su primenjeni akutno (p.o.) u pojedinačnoj dozi, 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa (isto kao i u slučaju ESL). Vitamin B<sub>12</sub> (hidroksokobalamin) je primenjivan hronično (i.p.) tokom 7 dana. Sa primenom vitamina B<sub>12</sub> je početo 2 nedelje nakon indukcije dijabetesa (kao i u slučaju metformina) (**Slika 3.3C**).

Nakon određivanja efikasnosti i ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih analgetika, pristupilo se ispitivanju efikasnosti dvokomponentnih kombinacija metformina i ESL/duloksetina/oksikodona/vitamina B<sub>12</sub>. Za svaku kombinaciju ispitane su četiri doze kombinacije metformina i pojedinačnog analgetika (ispitane su kombinacije koje su se sastojale od 1/16, 1/8, 1/4 i 1/2 ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova). Kao i u slučaju ispitivanja antihiperalgezijske aktivnosti metformina, antihiperalgezijski efekti dvokomponentnih kombinacija su računati prema sledećoj formuli:

$$\%AH = \frac{PWT_{\text{nakon primene kombinacije}} - PWT_{\text{bazal (2 nedelje nakon indukcije)}}}{PWT_{\text{bazal (pre indukcije)}} - PWT_{\text{bazal (2 nedelje nakon indukcije)}}} \times 100\%$$

Negativne i vrednosti %AH preko 100% su zaokružene na 0 i 100%, redom. Izračunati maksimalni %AH su korišćeni za određivanje eksperimentalne ED<sub>50</sub> vrednosti kombinacije (ED<sub>50 mix</sub>). U cilju određivanja vrste interakcije koristili smo izobolografsku analizu (opisana u delu 3.7. *Analiza vrste interakcije između dva leka – izobolografška analiza*; videti dole).

### 3.7. Analiza vrste interakcije između dva leka – izobolografška analiza

Za utvrđivanje vrste interakcije između dva leka koja su primenjeni u kombinaciji korišćena je izobolografška analiza. Ovaj vid analize može se koristiti za utvrđivanje vrste interakcije (aditivnost, sinergizam, antagonizam) između dva leka koji pokazuju dozno-zavisno dejstvo i visok nivo antinociceptivne/antihiperalgezijske efikasnosti (Tallarida i sar., 1997; Tallarida, 2000).

U okviru ove analize, kako bi se odredila interakcija između leka A i leka B koji se primenjuju u kombinaciji, najpre je potrebno odrediti srednje efektivne doze (ED<sub>50</sub> vrednosti) ova dva leka u ostvarivanju antinociceptivnog/antihiperalgezijskog efekta kada se primenjuju pojedinačno. U sledećem koraku, potrebno je ispitati antinociceptivnu/antihiperalgezijsku efikasnost ova dva leka kada se primene u obliku dvokomponentne kombinacije. U ovom stupnju, ispituju se efekti odgovarajućih udela ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova tj. kombinacije sadrže ekvi-efektivne doze leka A i leka B, koje odgovaraju udelu njihovih ED<sub>50</sub> vrednosti, (npr. 1/16 ED<sub>50</sub> leka A + 1/16 ED<sub>50</sub> leka B, 1/8 ED<sub>50</sub> leka A + 1/8 ED<sub>50</sub> leka B, 1/4 ED<sub>50</sub> leka A + 1/4 ED<sub>50</sub> leka B i 1/2 ED<sub>50</sub> leka A + 1/2 ED<sub>50</sub> leka B). Eksperimentalna ED<sub>50</sub> vrednost kombinacije (ED<sub>50 mix</sub>) i njen 95% interval poverenja se određuje linearnom regresionom analizom prave koja opisuje zavisnost izmerenog antinociceptivnog/antihiperalgezijskog efekta od logaritma doze kombinacije (kao i kod individualne primene lekova). Zatim se ova eksperimentalno određena ED<sub>50 mix</sub> vrednost kombinacije statistički upoređuje sa teorijskom srednjom efektivnom dozom kombinacije (ED<sub>50 add</sub>), koja se takođe sastoji iz odgovarajućih udela ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova A i B, uz pretpostavku da se njihovi efekti sabiraju. Teorijska ED<sub>50 add</sub> vrednost kombinacije lekova AB se računa pomoću sledeće formule (Tallarida i sar., 1997; Tallarida, 2000):

$$ED_{50\ add} = f \times ED_{50\ leka\ A} + (1 - f) \times ED_{50\ leka\ B}$$

U navedenoj formuli, f označava udeo (frakciju) ED<sub>50</sub> leka u ispitivanoj dvokomponentnoj kombinaciji (u našim eksperimentima f vrednost je bila 0,5; a ED<sub>50 add</sub> vrednost kombinacije je bila jednaka polovini ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova u kombinaciji).

U gornjoj jednačini, ED<sub>50 add</sub> kombinacije lekova AB je zbirna doza, a njena varijansa se proračunava pomoću sledeće formule (Tallarida i sar., 1997; Tallarida, 2000):

$$Var\ ED_{50\ add} = f^2 \times Var\ ED_{50\ leka\ A} + (1 - f)^2 \times Var\ ED_{50\ leka\ B}$$

Na osnovu vrednosti varijansi određuju se 95% intervali poverenja i razdvajaju na komponente prema udelu svakog leka u kombinaciji.

Prilikom statističkog poređenja eksperimentalno određene  $ED_{50\text{ mix}}$  vrednosti kombinacije i teorijske  $ED_{50\text{ add}}$  vrednosti, moguća su 3 ishoda:

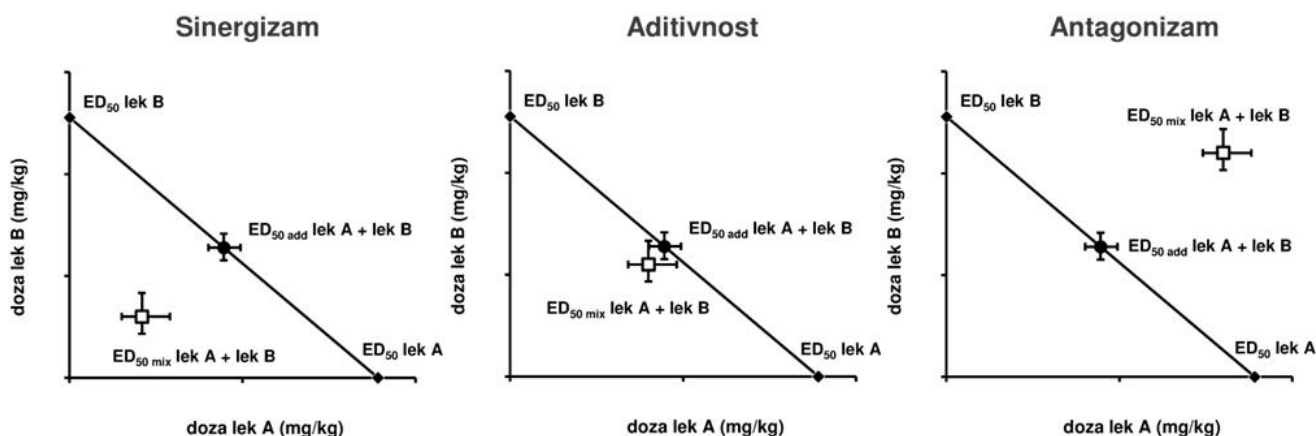
- $ED_{50\text{ mix}}$  vrednost kombinacije je značajno manja od  $ED_{50\text{ add}}$  vrednosti – između lekova primenjenih u kombinaciji postoji sinergistička (supra-aditivna) interakcija,
- $ED_{50\text{ mix}}$  vrednost kombinacije se ne razlikuje značajno od  $ED_{50\text{ add}}$  vrednosti – između lekova primenjenih u kombinaciji postoji aditivna interakcija,
- $ED_{50\text{ mix}}$  vrednost kombinacije je značajno veća od  $ED_{50\text{ add}}$  vrednost – između lekova primenjenih u kombinaciji postoji antagonistička interakcija.

Na **Slici 3.4** predstavljen je grafički prikaz rezultata izoblografske analize (izobologram), sa tri moguća ishoda analize. Statističko poređenje  $ED_{50\text{ mix}}$  i  $ED_{50\text{ add}}$  vrednosti se vrši primenom modifikovanog  $t$ -testa (**Tallarida i sar., 1997; Tallarida, 2000**).

Dodatno, računali smo i indeks interakcije ( $\gamma$ ), koji predstavlja kvantitativni parametar koji ukazuje koliko je izmenjena jačinu lekova kada se primene u kombinaciji u poređenju sa njihovom jačinom nakon pojedinačne primene. Indeks interakcije je računat prema sledećoj formuli (**Tallarida, 2002**):

$$\gamma = \frac{ED_{50\text{ leka A u kombinaciji sa B}}}{ED_{50\text{ leka A}}} + \frac{ED_{50\text{ leka B u kombinaciji sa A}}}{ED_{50\text{ leka B}}}$$

Vrednosti indeksa interakcije manje od 1 ukazuju na sinergističku interakciju, vrednosti bliske 1 ukazuju na aditivnu interakciju, dok vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju između komponenti (**Tallarida, 2002**).



**Slika 3.4.** Grafički prikaz rezultata izoblografske analize (izobologram). Na osama su prikazane  $ED_{50}$  vrednosti pojedinačnih lekova (lek A i lek B). Prava linija koja povezuje  $ED_{50}$  vrednosti pojedinačnih lekova je linija aditivnosti. Tačka na ovoj liniji je teorijska aditivna  $ED_{50}$  vrednost kombinacije lekova A+B ( $ED_{50\text{ add}}$  sa 95% intervalom poverenja). Dodatno, na grafikonima je prikazana i eksperimentalno određena  $ED_{50}$  vrednost kombinacije lekova A+B ( $ED_{50\text{ mix}}$  sa 95% intervalom poverenja). Sinergistička interakcija između lekova postoji kada je  $ED_{50\text{ mix}}$  vrednost kombinacije značajno manja od  $ED_{50\text{ add}}$  vrednosti; aditivna interakcija između lekova je prisutna kada ne postoji značajna razlika između  $ED_{50\text{ mix}}$  i  $ED_{50\text{ add}}$  vrednosti; antagonistička interakcija između lekova postoji kada je  $ED_{50\text{ mix}}$  značajno veća od  $ED_{50\text{ add}}$  vrednosti.

### 3.8. Analiza dužine trajanja antihiperalgezijskog dejstva lekova i kombinacija lekova

U cilju procene da li dolazi do promene dužine antihiperalgezijskog efekta kada su lekovi primenjeni u kombinaciji u odnosu na dužinu dejstva nakon individualne primene, vršili smo procenu dužine trajanja antihiperalgezijskog dejstva pojedinačnih lekova i dvokomponentnih kombinacija lekova računanjem vrednosti površina ispod krivih linija (PIK) koje opisuju promenu računatog/mernog parametra bolne osetljivosti u funkciji vremena (Micov i sar., 2015; Tomić i sar., 2010a; 2010b; 2013; Yaksh i sar., 1986).

Konkretno, u modelu somatskog inflamatornog bola (karageninom-indukovana mehanička hiperalgezija) rezultati su prikazani kao promena df vrednosti u funkciji vremena nakon primene tretmana (u minutima). PIK vrednosti su računane primenom trapezoidnog pravila za svaku eksperimentalnu grupu (Tallarida i Murray, 1986), a zatim su izračunate razlike između PIK vrednosti kontrolne grupe i PIK vrednosti eksperimentalnih grupa koje su dobile različite doze ispitivanih tretmana. Razlika ( $\Delta\text{PIK} = \text{PIK}_{\text{kontrola}} - \text{PIK}_{\text{tretman}}$ ) za svaku ispitanu dozu tretmana je predstavljena u funkciji maksimalnog antihiperalgezijskog efekta (%AH) koje ta doza proizvodi u eksperimentu, a dobijena kriva je analizirana primenom linearne regresije. Slično, u modelu bolne dijabetesne neuropatije (u eksperimentima u kojima je ispitivan uticaj akutno primenjenih lekova na mehaničku hiperalgeziju) rezultati su prikazani kao promena parametra PWT u funkciji vremena nakon primene tretmana (u minutima), u 3. nedelji nakon indukcije dijabetesa. PIK vrednosti u ovom modelu su računane isto primenom trapezoidnog pravila, a zatim su računane razlike između PIK vrednosti eksperimentalnih grupa koje su dobile ispitivani tretman (za svaku dozu) i PIK vrednosti kontrolne grupe. Razlika ( $\Delta\text{PIK} = \text{PIK}_{\text{tretman}} - \text{PIK}_{\text{kontrola}}$ ) za svaku ispitanu dozu tretmana je predstavljena u funkciji maksimalnog antihiperalgezijskog efekta koji ta doza tretmana proizvodi, i analizirana primenom linearne regresije.

Jednačine pravih linija dobijene na ovaj način smo koristili smo za procenu dužine dejstva akutno primenjenih tretmana. Linearna zavisnost između ova dva parametra ( $\Delta\text{PIK}$  i maksimalni antihiperalgezijski efekat) ukazuje da je dužina antihiperalgezijskog efekta dozno-zavisna, a veličina nagiba dobijene linearne prave je mera dužine antihiperalgezijskog efekta ispitanog tretmana (Tomić i sar., 2010a; 2010b; 2013; Yaksh i sar., 1986). Konkretnije, što je nagib krive veći, duži je antihiperalgezijski efekat datog tretmana. Ukoliko se nagibi dve regresione prave ne razlikuju značajno, to ukazuje da dva tretmana imaju sličnu dužinu dejstva. Sa druge strane, nagibi koji su značajno manji/veći, imaju značajno kraće/duže vreme dejstva u odnosu na poredbeni tretman. Razlika između nagiba je statistički analizirana primenom testa paralelizma, koji koristi Studentov *t*-test za poređenje veličine nagiba dve krive (Tallarida i Murray, 1986). Ovu analizu smo koristili:

- **u modelu somatskog inflamatornog bola** - poređenje dužine dejstva pojedinačno primenjenih lekova (metformin vs. ibuprofen/aspirin/tramadol/pregabalin), kao i za poređenje dužine dejstva lekova kada su primenjeni samostalno i dužine dejstva kada su primenjeni u obliku dvokomponentnih kombinacija,
- **u modelu bolne dijabetesne neuropatije** - poređenje dužine dejstva akutno primenjenih lekova kada su primenjeni samostalno (ESL, duloksetin i oksikodon) i dužine dejstva kada su primenjeni u obliku dvokomponentnih kombinacija sa metforminom.

### 3.9. Rotarod test

Rotarod test je korišćen za procenu uticaja pojedinačnih lekova i dvokomponentnih kombinacija lekova na motornu spretnost eksperimentalnih životinja (Stepanović-Petrović i sar., 2008; 2014; Micov i sar., 2015). Navedena ispitivanja su rađena kako bi se isključila mogućnost da je izmereni antinociceptivni/antihiperalgzijski efekat lekova posledica njihovog uticaja na motornu koordinaciju i/ili sedaciju eksperimentalnih životinja. Test je izveden korišćenjem posebnih rotarod aparata za miševe i pacove (*Treadmill for mice* 7660 i *Treadmill for rats* 47700, Ugo Basile, Milan, Italija). Aparature poseduju cilindre koji rotiraju i na koje su postavljeni miševi ili pacovi. U našim eksperimentima je cilindar oba aparata bio podešen da rotira konstantnom brzinom od 15 obrtaja/min. Pre ispitivanja uticaja lekova/kombinacija lekova, životinje su trenirane tokom 2 dana da održavaju ravnotežu na rotirajućem cilindru aparata. Trećeg dana (pre primene lekova) smatralo se da su životinje motorno sposobne ukoliko su mogle da održe ravnotežu na rotirajućem cilindru tokom dva uzastopna pokušaja, u trajanju od 60 s za miševe i 180 s za pacove. Nakon toga su primenjeni lekovi/kombinacije lekova čiji uticaj se ispituje, a vreme tokom kojeg su eksperimentalne životinje uspele da održe ravnotežu na rotirajućem cilindru aparature je izmereno u više vremenskih tačaka (koje odgovaraju vremenskim tačkama u kojima je meren antinociceptivni/antihiperalgzijski efekat lekova i kombinacija lekova). Minimalno (*cut-off*) vreme koje su životinje morale da provedu na aparaturi da bi se smatralo da nije narušena motorna spretnost je bilo 60 s za miševe i 180 s za pacove.

### 3.10. Statistička analiza

Podaci su analizirani primenom softvera SPSS 20, SigmaPlot 11.0, Microsoft Excel 2010, Pharm PCS i Pharm Tools Pro. Pri statističkoj obradi rezultata korišćeni se sledeći statistički testovi: Studentov *t*-test, modifikovani *t*-test, jednofaktorska ANOVA, dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, *Mann Whitney U*-test i *Kruskal-Wallis* test (u zavisnosti od broja grupa, broja/vrste faktora i karakteristika podataka [normalnost, ujednačenost varijanse]). Program Pharm PCS je korišćen za računanje ED<sub>50</sub> i TD<sub>50</sub> vrednosti sa 95% intervalima poverenja (linearnom regresionom analizom odnosa logaritma doze i efekta), odnosa TD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub> (terapijskog indeksa) i za procenu dužine dejstva tretmana (računanje vrednosti PIK-ova; opisano u delu 3.8. *Analiza dužine trajanja antihiperalgzijskog dejstva lekova i kombinacija lekova*). Program Pharm Tools Pro korišćen je za utvrđivanje vrste interakcije između dva leka primenjenih u kombinaciji primenom izoblografske analize (navedena analiza koristi modifikovani *t*-test za vršenje poređenja; opisano u delu 3.7. *Analiza vrste interakcije između dva leka – izoblografska analiza*) i test paralelizma koji služi za upoređivanje dužine dejstva različitih tretmana (navedena analiza koristi Studentov *t*-test za statističko poređenje veličine nagiba koji su mera dužine dejstva ispitivanih tretmana; opisano u delu 3.8. *Analiza dužine trajanja antihiperalgzijskog dejstva lekova i kombinacija lekova*).

Vrednost *P* manja od 0,05 je uzeta kao statistički značajna u većini analiza. Izuzeci su bila analiza uticaja ESL na motornu spretnost miševa u *rotarod* testu i analiza dužine trajanja antihiperalgzijskih efekata tretmana u modelu somatskog inflamatornog bola, gde su vršena višestruka poređenja. U ovim slučajevima korišćena je korigovana *P* vrednost, koja je zavisila od broja višestrukih poređenja i računata je prema formuli  $P = 0,05/n$  (gde je *n* broj poređenja koja su vršena u datoj analizi). Kod analize uticaja ESL na motornu spretnost, korišćena je korigovana *P* vrednost od 0,017 (za ukupno 3 poređenja – kontrola u poređenju sa tri različite doze ESL). Kada je poređena dužina dejstva metformina sa drugim ispitanim analgeticima u modelu somatskog inflamatornog bola, korišćena je korigovana *P* vrednost od 0,0125 (za ukupno 4 poređenja – dužina dejstva metformina u poređenju sa ibuprofenom, aspirinom, tramadolom ili pregabalinom). Kada je poređena dužina dejstva lekova nakon pojedinačne primene sa dužinom dejstva nakon primene u obliku dvokomponentnih kombinacija,

korišćena je korigovana  $P$  vrednost od 0,025 (za ukupno 2 poređenja – metformin ili analgetik u poređenju sa dvokomponentnom kombinacijom metformin+analgetik).

## 4. Rezultati

---

### 4.1. Efikasnost ESL u eksperimentalnim modelima bola

#### 4.1.1. Efekat ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

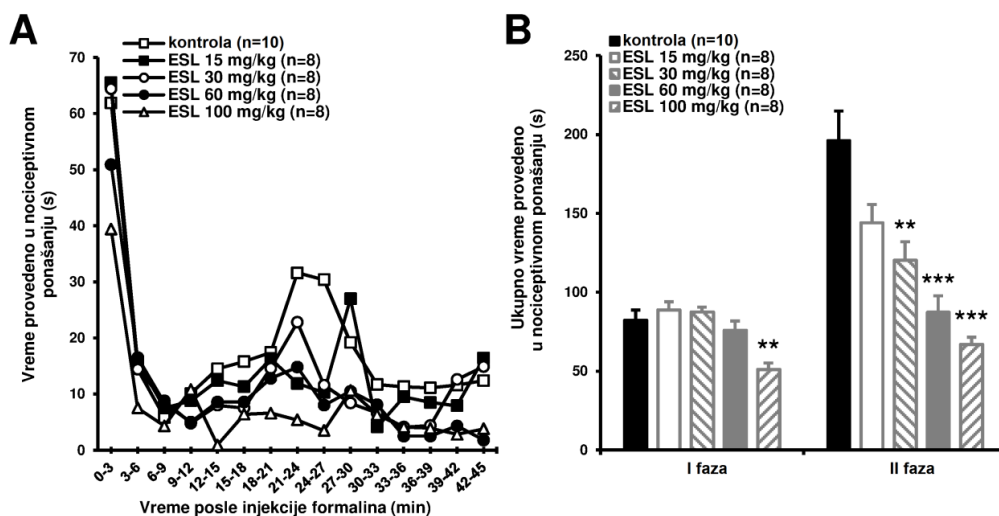
Nakon sistemske p.o. primene, ESL je ispoljio značajan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u prvoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ( $P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.1, A i B**). *Post hoc Tukey* test je pokazao da je samo najveća ispitana sistemska doza ESL (100 mg/kg) proizvela značajan antinociceptivan efekat (37,8%) u prvoj fazi testa ( $P = 0,001$ ). U drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa, ESL (15-100 mg/kg; p.o.) je izazvao značajan i dozno-zavisani antinociceptivni efekat u rasponu 26,5-66,9% ( $P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.1, A i B**). Srednja efektivna doza ( $\pm$  standardna greška) ESL u drugoj fazi testa je bila  $44,6 \pm 1,5$  mg/kg.

Slične rezultate smo dobili nakon lokalne periferne primene ESL u perinazalnu regiju miševa. Lokalna periferna primena ESL je imala značajan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u prvoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ( $P = 0,030$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.1, C i D**), a *post hoc Tukey P* vrednost je dostigla statističku značajnost ( $P = 0,026$ ) samo za najveću testiranu lokalnu dozu (30  $\mu$ g/mišu; s.c.). Ova doza je proizvela antinociceptivni efekat od 25,8%. U drugoj fazi testa, lokalna periferna primena ESL (7,5-30  $\mu$ g/mišu; s.c.) je proizvela značajan i dozno-zavisani antinociceptivni efekat od 34,9-60,1% ( $P = 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.1, C i D**).  $ED_{50}$  vrednost ( $\pm$  standardna greška) za ESL nakon lokalne s.c. primene je bila  $17,5 \pm 0,09$   $\mu$ g/mišu.

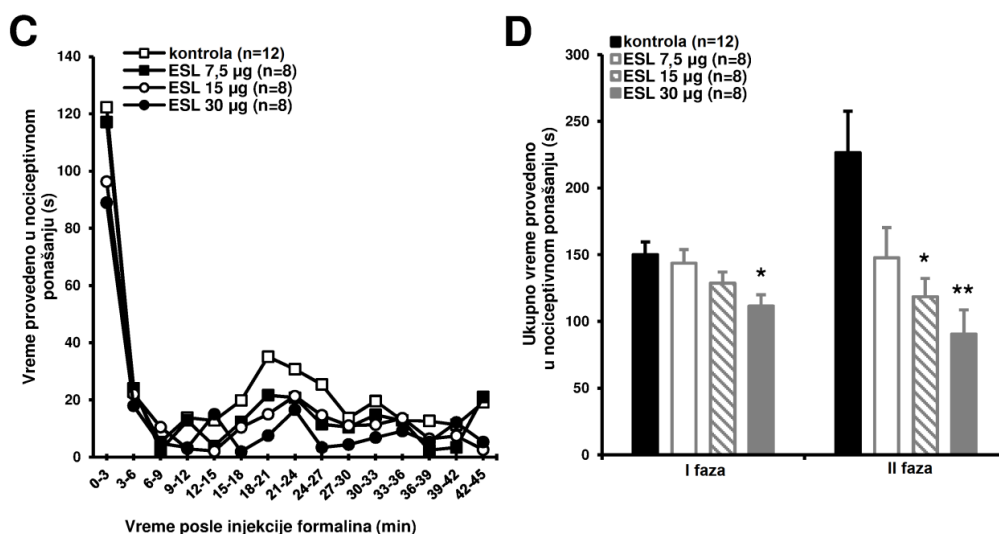
Kontralateralna primena najveće testirane lokalne doze ESL (30  $\mu$ g/mišu; s.c.) nije imala značajan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja ni u prvoj i drugoj fazi testa ( $P = 0,931$  za prvu fazu i  $P = 0,849$  za drugu fazu; Studentov *t*-test) (nije prikazano), što ukazuje da lokalna efikasnost ESL u ovom modelu bola nije bila posledica resorpcije i sistemskih efekata leka.



## Sistemska primena ESL



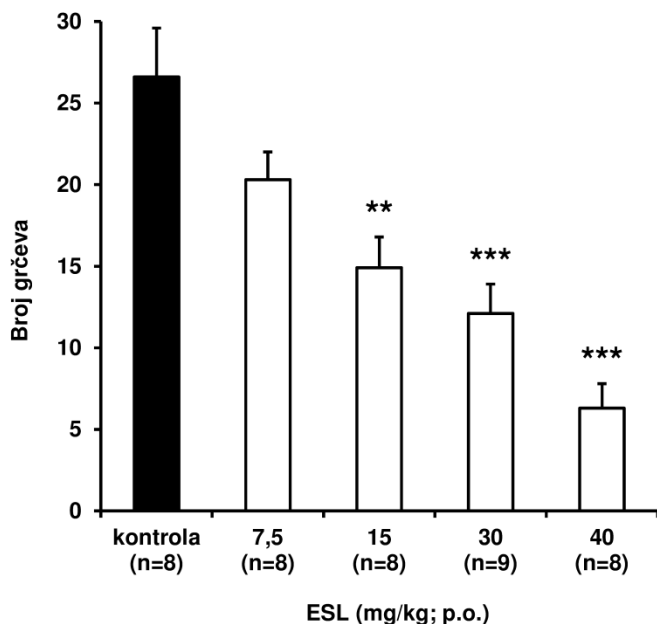
## Lokalna periferna primena ESL



**Slika 4.1.** Uticaj sistemski i lokalno periferno primenjenog eslikarbazepin acetata (ESL) na nociceptivno ponašanje miševa u orofacijalnom formalinskom testu. Vremenski tok trljanja njuške u 3-minutnim intervalima je prikazan na grafikonima sa leve strane (**A** i **C**), a ukupno vreme provedeno u trljanju njuške u prvoj (0-9 min nakon formalina) i drugoj fazi testa (9-45 min nakon formalina) na grafikonima sa desne strane (**B** i **D**). Tačke/stubići predstavljaju srednje vrednosti. U cilju bolje preglednosti, standardne greške nisu prikazane na grafikonima na kojima je predstavljen vremenski tok. ESL je primenjivan peroralno, 60 min pre formalinske injekcije (**A** i **B**) ili supkutano u perinazalnu regiju, 20 min pre formalinske injekcije (**C** i **D**). Statistička značajnost (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA praćena *post hoc* Tukey testom) je određena poređenjem sa odgovarajućem kontrolnom grupom.

#### 4.1.2. Efekat ESL u modelu inflamatornog visceralnog bola

U testu grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom, sistemska primena ESL (7,5-40 mg/kg; p.o.) je dovela do značajnog i dozno-zavisnog smanjenja broja grčeva kod životinja tretiranih ESL, u odnosu na kontrolnu grupu miševa ( $P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 4.2). Antinociceptivna efikasnost ESL u ovom modelu bola je bila 23,9-76,5%, a  $ED_{50}$  vrednost ( $\pm$  standardna greška)  $19,3 \pm 2,4$  mg/kg.



**Slika 4.2.** Antinociceptivni efekat eslikarbazepin acetata (ESL) u modelu inflamatornog visceralnog bola. Rezultati su izraženi kao broj grčeva indukovanih intraperitonealnom injekcijom sirćetne kiseline u miševa. ESL je primenjen peroralno 55 min pre injekcije sirćetne kiseline. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) broja grčeva u eksperimentalnim grupama (broj životinja po grupi je prikazan ispod stubića). Statistička značajnost (\*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA praćena Tukey post hoc testom) je određena u odnosu na kontrolnu grupu.

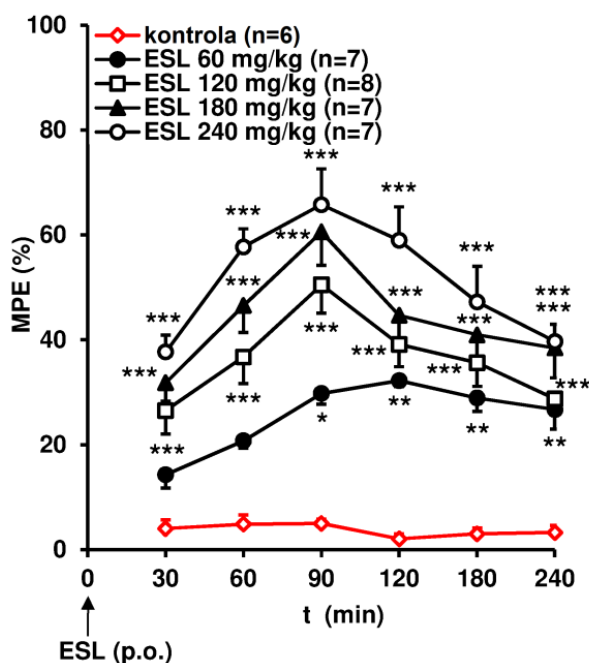
#### 4.1.3. Efekat ESL u modelu bolne dijabetesne neuropatije

U ovom modelu bola, ispitali smo uticaj ESL na termičku (pomoću *tail-flick* testa) i mehaničku hiperalgeziju (pomoću *Von Frey* testa) koje se razvijaju kod dijabetičnih životinja.

U prvoj grupi eksperimentalnih životinja koja je korišćena za ispitivanje uticaja ESL na termičku hiperalgeziju, zabeležili smo statistički značajno smanjenje reakcionog vremena u *tail-flick* testu kod dijabetičnih životinja, i razvoj termičke hiperalgezije od oko 40% (reakciono vreme je bilo  $5,03 \pm 0,85$ s pre indukcije dijabetesa vs.  $3,16 \pm 0,53$ s kod dijabetičnih životinja 3 nedelje nakon primene streptozotocina;  $P < 0,001$ , upareni *t*-test) (nije prikazano).

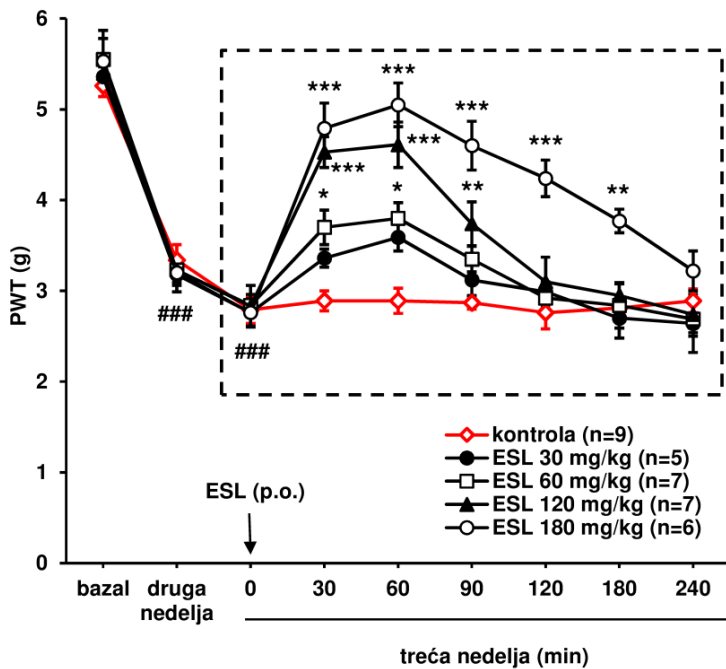
Sistemska primena ESL (60-240 mg/kg; p.o.), 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa, proizvela je dozno-zavisan i značajan antinociceptivni efekat u *tail-flick* testu kod dijabetičnih miševa (Slika 4.3). Dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima je pokazala značajan uticaj oba testirana faktora (vrsta tretmana i vreme posle primene tretmana) na %MPE vrednost određenu primenom *tail-flick* testa ( $P < 0,001$  za oba faktora). Takođe, postojala je značajna interakcija između dva testirana faktora ( $P < 0,001$ ), zbog čega smo dodatno koristili jednofaktorsku ANOVA-u da proverimo uticaj tretmana na %MPE vrednost u svakoj pojedinačnoj vremenskoj tački. Jednofaktorska ANOVA rezultata iz *tail-flick* testa je utvrdila da je ESL proizveo značajan antinociceptivni efekat u svim vremenskim tačkama (sve  $P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 4.3).

Maksimalni efekti za većinu testiranih doza ESL su postignuti 90 min nakon p.o. primene, a antinociceptivna efikasnost u *tail-flick* testu je bila 32,2-65,8%. Srednja efektivna doza ( $\pm$  standardna greška) za ESL u ovom testu je bila  $124,7 \pm 4,2$  mg/kg (za efekat 90 min nakon primene ESL) (Slika 4.3).



**Slika 4.3.** Vremenski tok antinociceptivnih efekata eslikarbazepin acetata (ESL) u *tail-flick* testu kod dijabetičnih životinja. Rezultati su izraženi kao procenat maksimalnog mogućeg efekta (engl. *Maximal Possible Effect* - MPE). ESL je primenjen oralno (p.o.) u pojedinačnoj dozi, 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa (označeno strelicom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) parametra MPE (%). Statistička značajnost (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA praćena *Tukey post hoc* testom) je određena u odnosu na kontrolnu grupu.

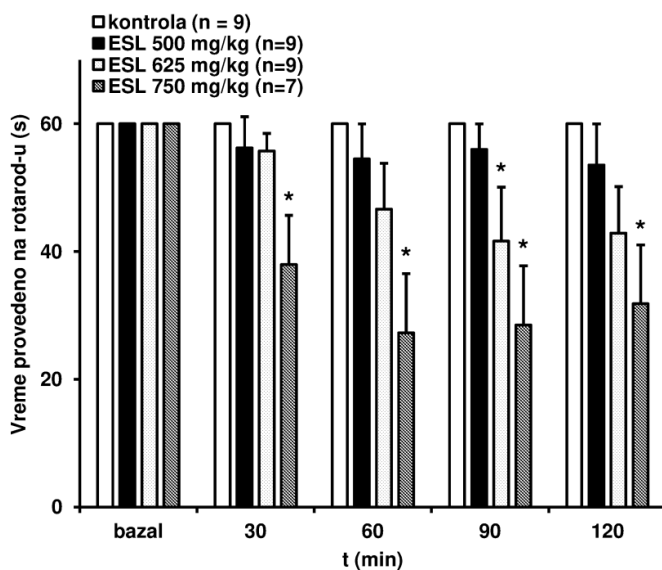
Druga grupa eksperimentalnih životinja je korišćena za ispitivanje uticaja ESL na mehaničku hiperalgeziju koja se razvija kod miševa u modelu bolne dijabetesne neuropatije indukovane streptozotocinom. U ovom slučaju zabeležili smo značajno smanjenje PWT vrednosti kod životinja dve i tri nedelje nakon indukcije dijabetesa u svim eksperimentalnim grupama i razvoj hiperalgezije od oko 45% ( $P < 0,001$  u svim eksperimentalnim grupama; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) (Slika 4.4). Sistemska primena ESL (30-180 mg/kg; p.o.) dovela je do značajne i dozno-zavisne redukcije mehaničke hiperalgezije koja se razvila kod dijabetičnih životinja. Dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima je pokazala značajan uticaj oba testirana faktora (vrsta tretmana i vreme) na PWT vrednost određenu primenom *Von Frey* testa ( $P < 0,001$  za oba faktora). Takođe, postojala je značajna interakcija između dva testirana faktora ( $P < 0,001$ ), zbog čega smo dodatno analizirali podatke primenom jednofaktorske ANOVA-e, kako bismo utvrdili u kojoj eksperimentalnoj grupi je primena ESL značajno uticala na PWT u odnosu na kontrolnu grupu. Jednofaktorska ANOVA je pokazala da u većini vremenskih tačaka (sa izuzetkom 240 min) postoji statistički značajan uticaj tretmana na PWT vrednost (sve  $P \leq 0,002$ ). Maksimalni antihiperalgezijski efekti su postignuti 60 min nakon primene ESL i iznosili su 31,0-80,1%, a  $ED_{50}$  vrednost ( $\pm$  standardna greška) ESL je bila  $71,9 \pm 10,1$  mg/kg.



**Slika 4.4.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta eslikarbazepin acetata (ESL) u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Rezultati su izraženi kao mehanički prag povlačenja šape (engl. *Paw Withdrawal Threshold* - PWT) u gramima, pre (bazal) i posle indukcije dijabetesa (u 2. i 3. nedelji). U svim eksperimentalnim grupama je PWT vrednost u 2. i 3. nedelji bila značajno manja nego bazalna PWT vrednost pre indukcije dijabetesa ( $^{###}P < 0,001$ ). ESL je primenjen oralno (p.o.) u pojedinačnoj dozi, 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa (označeno strelicom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) PWT (g). Statistička značajnost ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Tukey testom) je određena u odnosu na kontrolnu grupu.

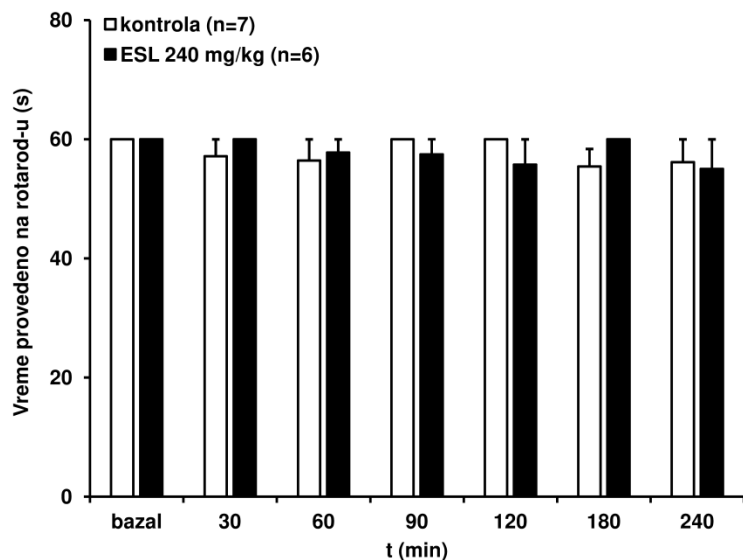
#### 4.1.4. Uticaj ESL na motoriku eksperimentalnih životinja

Primena velikih doza ESL (500-750 mg/kg; p.o.) miševima soja *Swiss Webster* (soj u kome je ispitivana njegova analgetička efikasnost u modelima inflamatornog trigeminalnog i visceralnog bola) dovela je do značajnog i dozno-zavisnog narušavanja motorne spretnosti ( $P < 0,01$ ; *Kruskal-Wallis U-test*) (Slika 4.5). Maksimalni efekat na motornu koordinaciju je postignut 60-120 min nakon primene ESL. Srednja efektivna doza za narušavanje motorne spretnosti ( $TD_{50} \pm$  standardna greška) je bila  $736 \pm 5,8$  mg/kg (za efekte postignute 90 min nakon primene ESL).



**Slika 4.5.** Vremenski tok uticaja eslikarbazepin acetata (ESL) na motornu sposobnost miševa, izraženo kao vreme, u sekundama, provedeno na rotirajućem cilindru *rotarod* aparata. Bazalno vreme provedeno na *rotarod*-u je određeno pre peroralne primene ESL. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) vremena provedenog na *rotarod*-u. Statistička značajnost ( $*P < 0,017$ ; *Kruskal-Wallis test*, praćen *Mann-Whitney U-testom*) je određena u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod dijabetičnih miševa (soja C57Bl/6), najveća doza ESL (240 mg/kg; p.o.), ispitana u testu termičke bolne stimulacije, nije imala značajan uticaj na motornu spretnost ni u jednoj vremenskoj tački (sve  $P \geq 0,05$ ; *Mann-Whitney U-test*) (Slika 4.6).



**Slika 4.6.** Vremenski tok uticaja eslikarbazepin acetata (**ESL**) na motornu sposobnost dijabetičnih miševa, izraženo kao vreme, u sekundama, provedeno na rotirajućem cilindru *rotarod* aparata. Bazalno vreme provedeno na *rotarod*-u je određeno pre peroralne primene ESL (240 mg/kg; p.o.). Svaki stubić predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) vremena provedenog na *rotarod*-u.

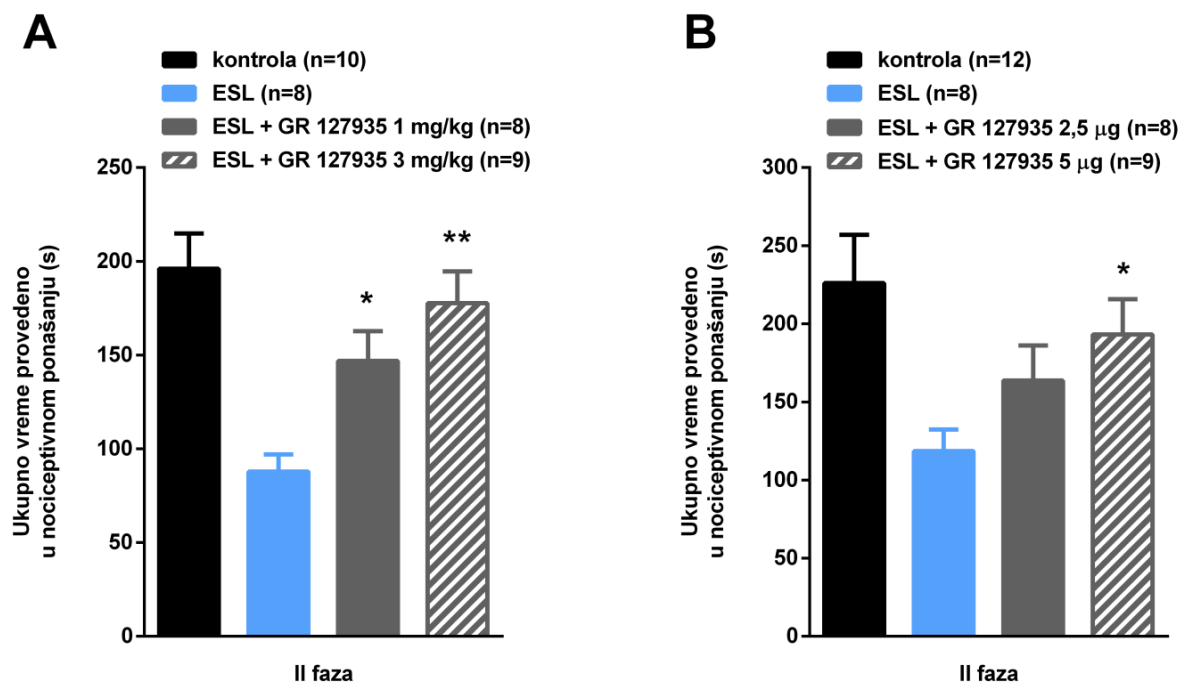
## 4.2. Ispitivanje mehanizama dejstva ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

### 4.2.1. Uticaj antagoniste serotoninskih 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora na antinociceptivni efekat ESL

U drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa, sistemska primena selektivnog antagoniste serotoninskih 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora, GR 127935 (1 i 3 mg/kg; i.p.), je dovela do značajnog smanjenja antinociceptivnog efekta ESL (60 mg/kg; p.o.), na dozno-zavisan način ( $P = 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.7A**). Stepeni inhibicije antinociceptivnog efekta ESL su bili 52,6 i 72,9% za doze GR 127935 od 1 i 3 mg/kg, redom (nije prikazano).

Lokalna periferna primena GR 127935 (2,5 i 5  $\mu$ g/mišu; s.c.) je takođe inhibirala antinociceptivni efekat ESL (15  $\mu$ g/mišu; s.c.) na značajan i dozno-zavisan način ( $P = 0,049$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.7B**), a stepeni inhibicije antinociceptivnog efekta ESL su bili 41,7 i 69% za manju i veću dozu, redom (nije prikazano).

Najveća ispitana sistemska (3 mg/kg i.p.) i lokalna doza GR 127935 (5  $\mu$ g/mišu; s.c.) nisu imale značajan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa kada su primenjene bez ESL ( $P = 0,760$  za sistemska primenu i  $P = 0,368$  za lokalnu perifernu primenu GR 127935; Studentov *t*-test) (nije prikazano).



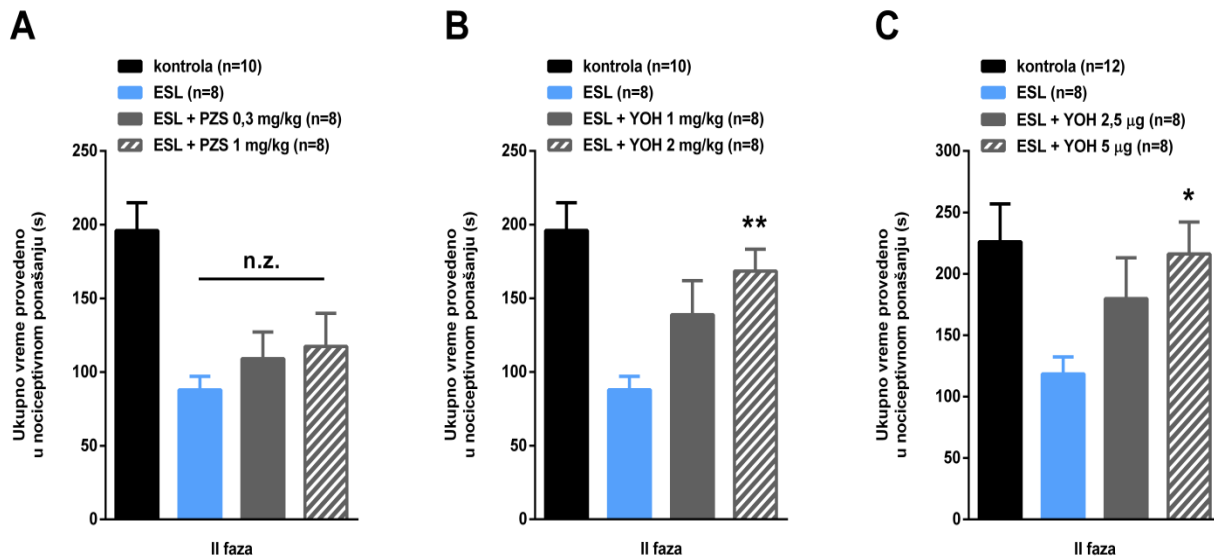
**Slika 4.7.** Uticaj antagoniste serotoninskih 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora (**GR 127935**) na antinociceptivni efekat eslikarbazepin acetata (**ESL**) u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. GR 127935 je primenjivan i.p. odmah nakon ESL (60 mg/kg; p.o.), 60 min pre injekcije formalina (**A**). Dodatno, GR 127935 je primenjivan s.c. u perinazalnu regiju zajedno sa ESL (15 µg/mišu; s.c.), 20 min pre injekcije formalina (**B**). Stubići predstavljaju srednje vrednosti (± standardna greška) ukupnog vremena provedenog u trljanju njuške u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. Statistička značajnost (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Tukey testom) je određena u odnosu na odgovarajuću ESL grupu. i.p. = intraperitonealno; p.o. = peroralno; s.c. = supkutano.

#### 4.2.2. Uticaj antagonista adrenergičkih receptora na antinociceptivni efekat ESL

Sistemska primena selektivnog antagoniste  $\alpha_1$ -adrenergičkih receptora, prazosina (0,3 i 1 mg/kg; i.p.), nije imala značajan uticaj na antinociceptivni efekat ESL (60 mg/kg; p.o.) u ovom modelu bola ( $P = 0,477$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.8A**). Selektivni antagonist  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora, johimbina (1 i 2 mg/kg; i.p.), je smanjio antinociceptivni efekat ESL (60 mg/kg; p.o.) u drugoj fazi testa na dozno-zavisno način ( $P = 0,010$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.8B**). Stepene inhibicije antinociceptivnog efekta ESL su bili 47,3 i 74,6% za 1 i 2 mg/kg johimbina, redom (nije prikazano).

Slični rezultati su dobijeni nakon lokalne periferne primene johimbina. Lokalna periferna primena johimbina (2,5 i 5 µg/mišu; s.c.) je statistički značajno i dozno-zavisno umanjila efekat ESL (15 µg/mišu; s.c.) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ( $P = 0,042$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.8C**) i proizvela stepene inhibicije od 56,8% (2,5 µg/mišu) i 90,3% (5 µg/mišu) (nije prikazano).

Najveće testirane doze prazosina (1 mg/kg; i.p.) i johimbina (2 mg/kg; i.p. i 5 µg/mišu; s.c.) nisu imale značajan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u drugoj fazi testa kada su primenjene bez ESL ( $P = 0,553$  za prazosin,  $P = 0,928$  za sistemska primenu johimbina i  $P = 0,742$  za lokalnu perifernu primenu johimbina; Studentov *t*-test), (nije prikazano).



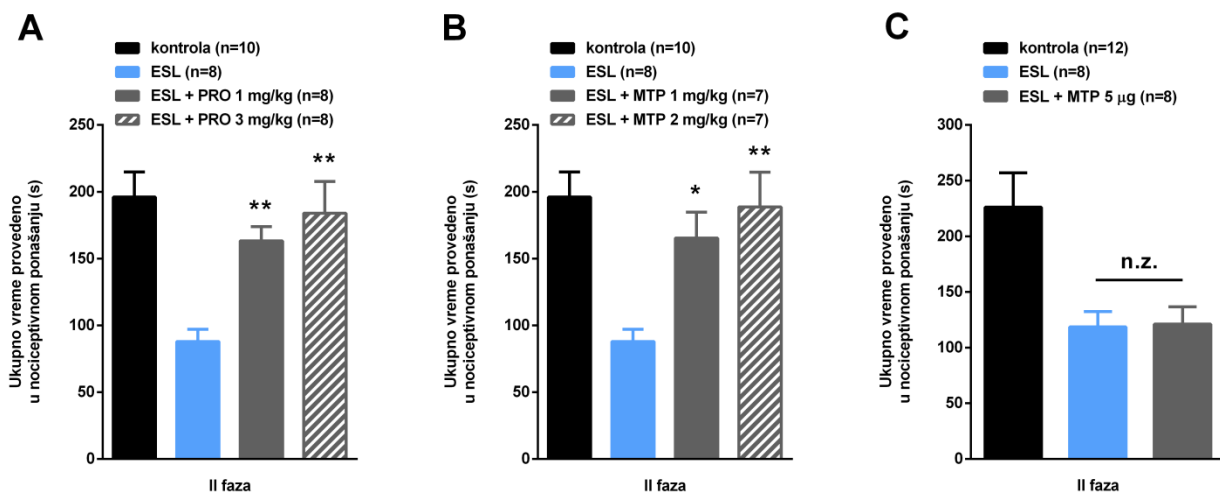
**Slika 4.8.** Uticaj antagonista  $\alpha$ -adrenergičkih receptora, prazosina (PZS) (A) i johimbina (YOH) (B i C) na antinociceptivni efekat eslikarbazepin acetata (ESL) u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. PZS i YOH su primenjivani i.p. odmah nakon ESL (60 mg/kg; p.o.), 60 min pre injekcije formalina (A i B). Dodatno, YOH je primenjivan s.c. u perinazalnu regiju zajedno sa ESL (15  $\mu$ g/mišu; s.c.), 20 min pre injekcije formalina (C). Stubići predstavljaju srednje vrednosti ( $\pm$  standardna greška) ukupnog vremena provedenog u trljanju njuške u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. Statistička značajnost (n.z. – nema značajne razlike; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Tukey testom) je određena u odnosu na odgovarajuću ESL grupu. i.p. = intraperitonealno; p.o. = peroralno; s.c. = supkutano.

Primena neselektivnog antagoniste  $\beta$ -adrenergičkih receptora propranolola (1 i 3 mg/kg; i.p.) i selektivnog  $\beta_1$ -adrenergičkog antagoniste metoprolola (1 i 2 mg/kg; i.p.) je značajno i dozno-zavisno ( $P < 0,001$  za propranolol i  $P = 0,003$  za metoprolol; jednofaktorska ANOVA) inhibirala efekat ESL (60 mg/kg; p.o.) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa (Slika 4.9, A i B). Stepeni inhibicije koji je postigao propranolol su bili 69,8 i 89% (1 i 3 mg/kg, redom), a metoprolol 71,1 i 93,2% (1 i 2 mg/kg, redom) (nije prikazano).

Sa druge strane, lokalna periferna primena metoprolola (5  $\mu$ g/mišu; s.c.) nije imala značajan uticaj ( $P = 0,900$ ; Studentov *t*-test) na efikasnost lokalno periferno primenjenog ESL (15  $\mu$ g/mišu; s.c.) (Slika 4.9C). Veća doza metoprolola (10  $\mu$ g/mišu; s.c.) je pokazala tendenciju da *per se* smanji dužinu nociceptivnog ponašanja u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa (efekat oko 32%; nije prikazano) i nismo ispitali uticaj većih lokalnih doza metoprolola na efekat ESL.

Sistemska primena najvećih testiranih doza  $\beta$ -adrenergičkih antagonista (3 mg/kg propranolola i 2 mg/kg metoprolola) bez ESL nije značajno uticala na dužinu nociceptivnog ponašanja u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ( $P = 0,965$  za propranolol i  $P = 0,391$  za metoprolol; Studentov *t*-test) (nije prikazano). Dodatno, lokalna periferna primena metoprolola u dozi od 5  $\mu$ g/mišu (s.c.) bez ESL nije imala značajan efekat na dužinu druge faze testa ( $P = 0,476$ ; Studentov *t*-test) (nije prikazano).





**Slika 4.9.** Uticaj antagonista  $\beta$ -adrenergičkih receptora, propranolola (**PRO**) (**A**) i metoprolola (**MTP**) (**B** i **C**) na antinociceptivni efekat eslikarbazepin acetata (**ESL**) u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. **PRO** i **MTP** su primenjivani i.p. odmah nakon **ESL** (60 mg/kg; p.o.), 60 min pre injekcije formalina (**A** i **B**). Dodatno, **MTP** je primenjivan s.c. u perinazalnu regiju zajedno sa **ESL** (15  $\mu$ g/mišu; s.c.), 20 min pre injekcije formalina (**C**). Stubići predstavljaju srednje vrednosti ( $\pm$  standardna greška) ukupnog vremena provedenog u trljanju njuške u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. Statistička značajnost (n.z. – nema značajne razlike; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Tukey testom ili Studentov *t*-test) je određena u odnosu na odgovarajuću **ESL** grupu. i.p. = intraperitonealno; p.o. = peroralno; s.c. = supkutano.

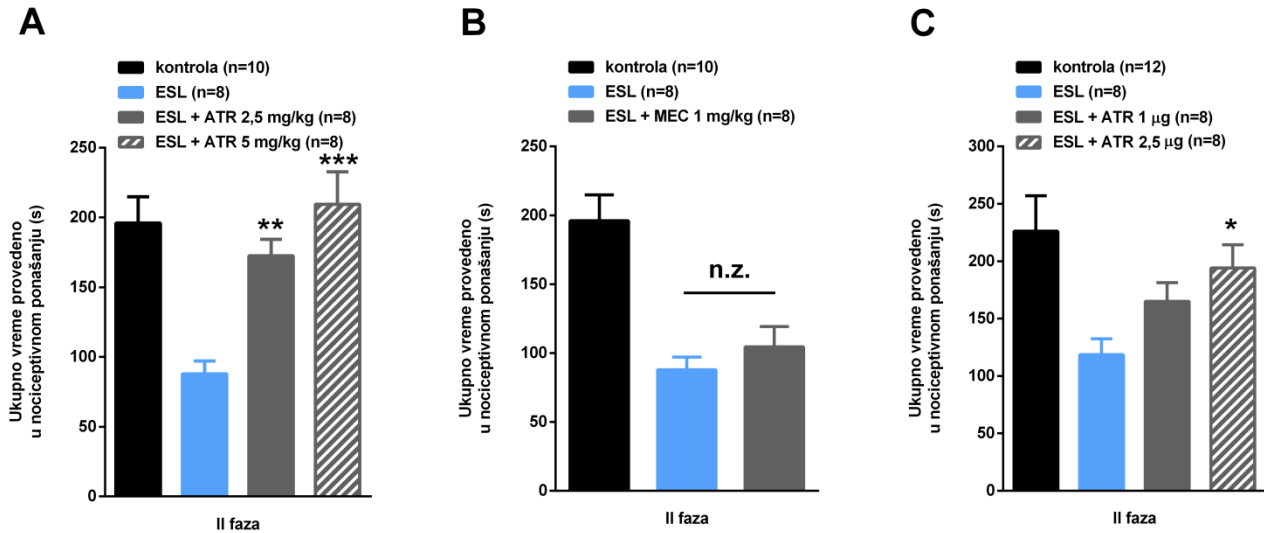
#### 4.2.3. Uticaj antagonista holinergičkih receptora na antinociceptivni efekat **ESL**

Atropin (2,5 i 5 mg/kg; i.p.), neselektivni antagonist muskarinskih holinergičkih receptora, doveo je do značajne i dozno-zavisne inhibicije antinociceptivnog efekta **ESL** (60 mg/kg; p.o.) nakon sistemske primene ( $P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.10A**). Stepennost inhibicije antinociceptivnog efekta **ESL** koji je postigao atropin je bio 78,4% za dozu od 2,5 mg/kg i 100% za dozu od 5 mg/kg (nije prikazano). Sa druge strane, sistemska primena mekamilamina (1 mg/kg; i.p.), neselektivnog antagoniste nikotinskih holinergičkih receptora, nije imala značajan uticaj na antinociceptivni efekat **ESL** (60 mg/kg; p.o.) u orofacijalnom formalinskom testu ( $P = 0,353$ ; Studentov *t*-test) (**Slika 4.10B**). Nismo ispitali uticaj većih doza mekamilamina na antinociceptivni efekat **ESL**, jer je doza od 3 mg/kg (i.p.) imala izvestan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u orofacijalnom formalinskom testu kada je primenjena samostalno (pronociceptivni efekat u prvoj fazi, a antinociceptivni efekat u drugoj fazi testa) (nije prikazano).

Dodatno, lokalna periferna primena atropina (1 i 2,5  $\mu$ g/mišu; s.c.) je takođe značajno inhibirala efekat **ESL** (15  $\mu$ g/mišu; s.c.) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ( $P = 0,016$ ; jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.10C**). Stepennost inhibicije antinociceptivnog efekta **ESL** ostvareni nakon lokalne periferne primene atropina su bili 43 i 70%, za manju i veću dozu, redom.



Najveće testirane doze atropina, nisu imale značajan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u drugoj fazi testa kada su primenjene bez ESL ( $P = 0,862$  za sistemsku primenu i  $P = 0,946$  za lokalnu perifernu primenu; Studentov  $t$ -test) (nije prikazano). Takođe, sistemska primena mekamilamina u dozi od 1 mg/kg bez ESL nije imala značajan efekat ( $P = 0,541$ ; Studentov  $t$ -test) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa (nije prikazano).



**Slika 4.10.** Uticaj antagonista holinergičkih receptora, atropina (ATR) (A i C) i mekamilamina, (MEC) (B) na antinociceptivni efekat eslikarbazepin acetata (ESL) u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. ATR i MEC su primenjivani i.p. odmah nakon ESL (60 mg/kg; p.o.), 60 min pre injekcije formalina (A i B). Dodatno, ATR je primenjivan s.c. u perinazalnu regiju zajedno sa ESL (15 µg/mišu; s.c.), 20 min pre injekcije formalina (C). Stubići predstavljaju srednje vrednosti ( $\pm$  standardna greška) ukupnog vremena provedenog u trljanju njuške u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. Statistička značajnost (n.z. – nema značajne razlike; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Tukey testom ili Studentov  $t$ -test) je određena u odnosu na odgovarajuću ESL grupu. i.p. = intraperitonealno; p.o. = peroralno; s.c. = supkutano.

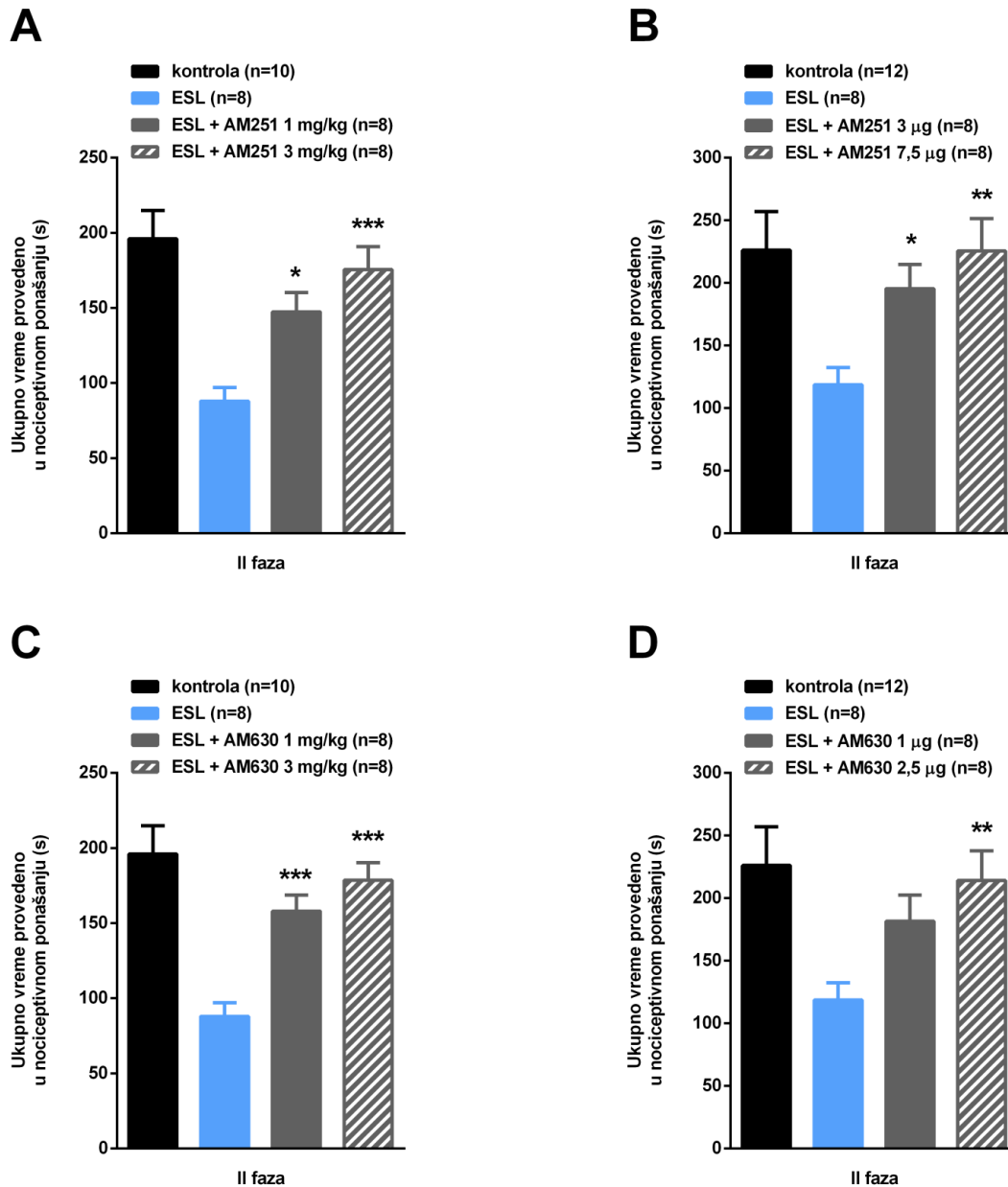
#### 4.2.4. Uticaj antagonista kanabinoidnih receptora na antinociceptivni efekat ESL

Sistemska primena selektivnih antagonista kanabinoidnih CB<sub>1</sub> receptora AM251 (1 i 3 mg/kg; i.p.) i CB<sub>2</sub> receptora AM630 (1 i 3 mg/kg; i.p.) je na dozno-zavisan način umanjila antinociceptivnu efikasnost ESL (60 mg/kg; p.o.) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ( $P < 0,001$  za oba antagonista; jednofaktorska ANOVA) (Slika 4.11, A i C). AM251 je inhibirao efekat sistemski primenjenog ESL za 51,9% i 70,5% (u dozi od 1 i 3 mg/kg, redom), dok je AM630 inhibirao efekat za 63% i 78,4% (u dozi od 1 i 3 mg/kg, redom) (nije prikazano).

Pored sistemske primene, i lokalna periferna primena kanabinoidnih antagonista AM251 (3 i 7,5 µg/mišu; s.c.) i AM630 (1 i 2,5 µg/mišu; s.c.) je značajno umanjila antinociceptivni efekat ESL (15 µg/mišu; s.c.), na dozno-zavisan način ( $P = 0,004$  za AM251 i  $P = 0,009$  za AM630; jednofaktorska ANOVA) (Slika 4.11, B i D). Stepeni inhibicije nakon lokalne periferne primene AM251 su bili 71,1% i 99% (u dozi od 3 i 7,5 µg/mišu, redom), a nakon primene AM630 58,3% i 89% (u dozi od 1 i 2,5 µg/mišu, redom) (nije prikazano).

Sistemski primenjeni AM251 i AM630 nisu imali značajan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa kada su primenjeni bez ESL ( $P = 0,763$  za AM251 i  $P = 0,835$  za AM630; Studentov  $t$ -test) (nije prikazano). Dodatno, lokalna periferna primena najvećih

testiranih doza AM251 (7,5 µg/mišu; s.c.) i AM630 (2,5 µg/mišu; s.c.) bez ESL nije imala značajan uticaj na nociceptivno ponašanje u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ( $P = 0,793$  za AM251 i  $P = 0,700$  za AM630; Studentov  $t$ -test) (nije prikazano).



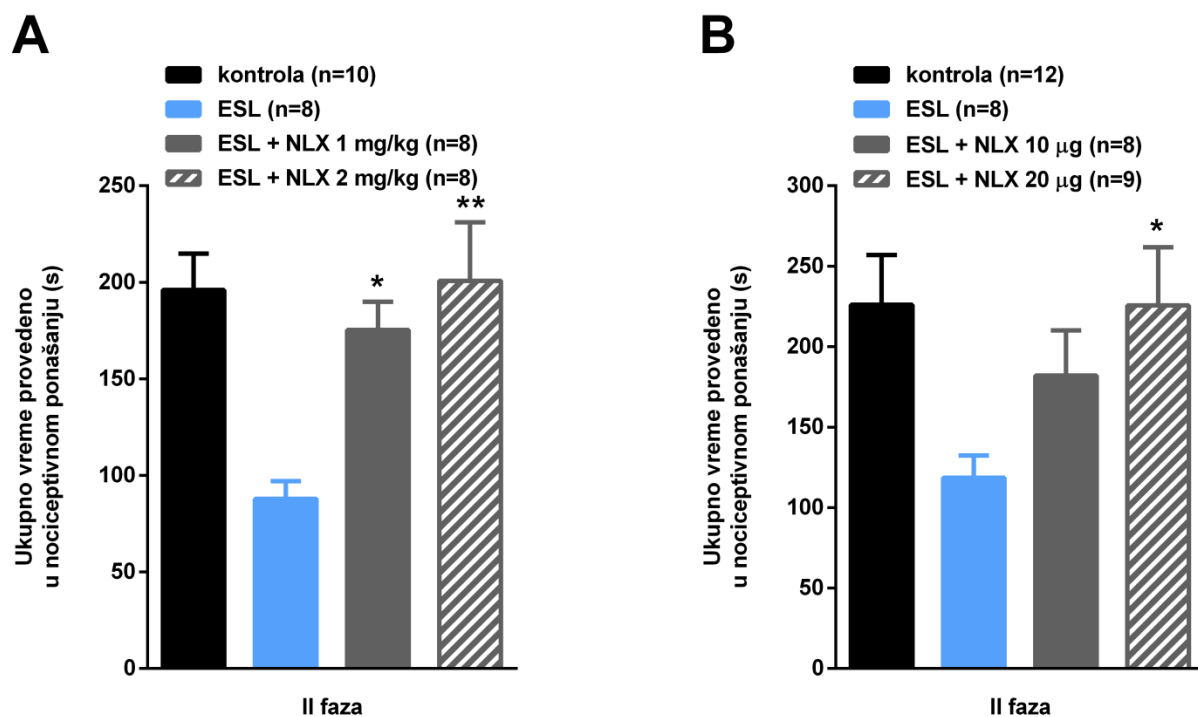
**Slika 4.11.** Uticaj antagonista kanabinoidnih CB<sub>1</sub> receptora AM251 (A i B) i CB<sub>2</sub> receptora AM630 (C i D) na antinociceptivni efekat eslikarbazepin acetata (ESL) u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. AM251 i AM630 su primenjivani i.p. odmah nakon ESL (60 mg/kg; p.o.), 60 min pre injekcije formalina (A i C). Dodatno, AM251 i AM630 su primenjeni s.c. u perinazalnu regiju zajedno sa ESL (15 µg/mišu; s.c.), 20 min pre injekcije formalina (B i D). Stubići predstavljaju srednje vrednosti ( $\pm$  standardna greška) ukupnog vremena provedenog u trljanju njuške u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. Statistička značajnost ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc Tukey* testom) je određena u odnosu na odgovarajuću ESL grupu. i.p. = intraperitonealno; p.o. = peroralno; s.c. = supkutano.

#### 4.2.5. Uticaj opioidnog antagoniste na antinociceptivni efekat ESL

U drugoj fazi testa, sistemska primena neselektivnog antagoniste opioidnih receptora, naloksona (1 i 2 mg/kg; i.p.), je značajno i dozno-zavisno umanjila efekat sistemski primenjenog ESL (60 mg/kg; p.o.) (Slika 4.12A). Stepeni inhibicije efekta ESL koji je ostvario nalokson su bili 80,9% za dozu od 1 mg/kg i 100% za dozu od 2 mg/kg (nije prikazano).

Lokalna primena naloksona (10 i 20 µg/mišu; s.c.) je takođe značajno umanjila efekat lokalno periferno primenjenog ESL (15 µg/mišu; s.c.) (Slika 4.12B) i to za 58,7% i 99% za manju i veću dozu, redom (nije prikazano).

Najveća ispitana sistemska (2 mg/kg; i.p.) i lokalna doza naloksona (20 µg/mišu; s.c.) nisu imale značajan efekat na dužinu nociceptivnog ponašanja u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa kada su primenjeni bez ESL ( $P = 0,957$  za sistemska primenu i  $P = 0,499$  za lokalnu perifernu primenu; Studentov  $t$ -test) (nije prikazano).



**Slika 4.12.** Uticaj antagoniste opioidnih receptora, naloksona (NLX) na antinociceptivni efekat eslikarbazepin acetata (ESL) u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. NLX je primenjen i.p. odmah nakon ESL (60 mg/kg; p.o.), 60 min pre injekcije formalina (A). Dodatno, NLX je primenjen s.c. u perinazalnu regiju zajedno sa ESL (15 µg/mišu; s.c.), 20 min pre injekcije formalina (B). Stubići predstavljaju srednje vrednosti ( $\pm$  standardna greška) ukupnog vremena provedenog u trljanju njuške u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. Statistička značajnost ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Tukey testom) je određena u odnosu na odgovarajuću ESL grupu. i.p. = intraperitonealno; p.o. = peroralno; s.c. = supkutano.

### 4.3. Ispitivanje interakcija između ESL i standardnih/alternativnih analgetika u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

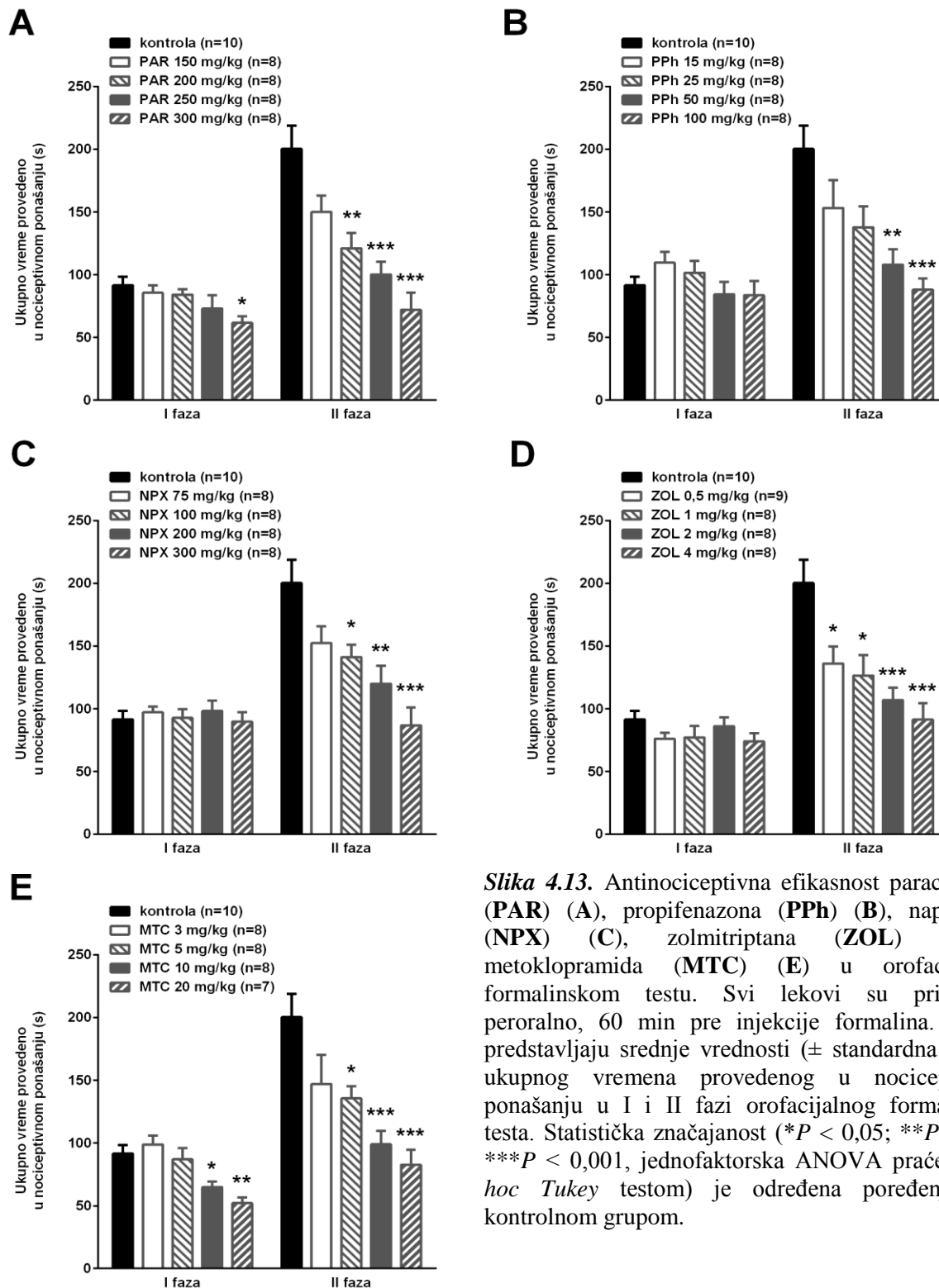
#### 4.3.1. Efekat standardnih/alternativnih analgetika u orofacijalnom formalinskom testu

U prvoj fazi orofacijalnog formalinskog testa, značajan antinociceptivni efekat su ispoljili samo paracetamol i metoklopramid ( $P = 0,039$  za paracetamol i  $P < 0,001$  za metoklopramid; jednofaktorska ANOVA) (Slika 4.13, A i E). U slučaju paracetamola, *post hoc Tukey* test je pokazao da je samo najveća doza od 300 mg/kg (p.o.) značajno smanjila dužinu nociceptivnog ponašanja u prvoj fazi testa (antinociceptivni efekat je bio 32,6%), dok su u slučaju metoklopramida dve najveće testirane doze metoklopramida (10 i 20 mg/kg; p.o.) imale značajan antinociceptivni efekat u prvoj fazi orofacijalnog formalinskog testa (antinociceptivni efekat je bio 29,2% za 10 mg/kg i 43,0% za 20 mg/kg).

U drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa, svi testirani analgetici su ispoljili značajan i dozno-zavisan antinociceptivan efekat ( $P < 0,001$  za sve analgetike, jednofaktorska ANOVA) (Slika 4.13, A-E). Antinociceptivna efikasnost pojedinačnih analgetika u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa je bila:

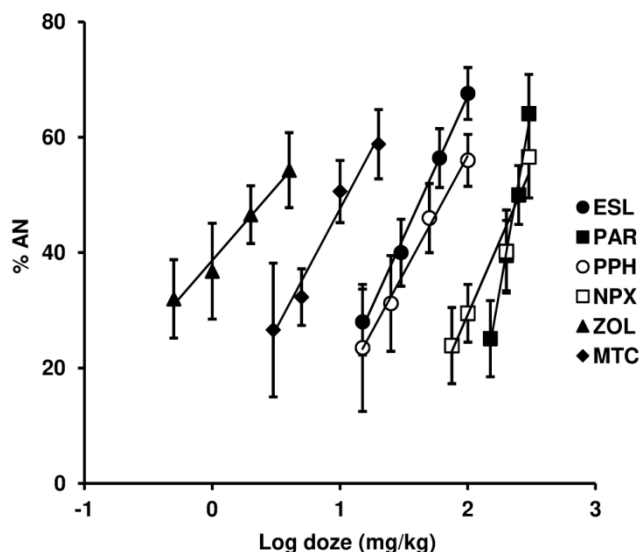
- 25,1-64,1% za paracetamol (150-300 mg/kg; p.o.),
- 23,5-56,0% za propifenazon (15-100 mg/kg; p.o.),
- 23,9-56,6% za naproksen (75-300 mg/kg; p.o.),
- 32,0-54,3% za zolmitriptan (0,5-4 mg/kg; p.o.) i
- 26,6-58,8% za metoklopramid (3-20 mg/kg; p.o.) (Slika 4.14).

Rezultati ispitivanja efekata ESL u orofacijalnom formalinskom testu su prikazani u delu 4.1.1. *Efekat ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola.*



**Slika 4.13.** Antinociceptivna efikasnost paracetamola (PAR) (A), propifenazona (PPh) (B), naproksena (NPX) (C), zolmitriptana (ZOL) (D) i metoklopramida (MTC) (E) u orofacijalnom formalinskom testu. Svi lekovi su primenjeni peroralno, 60 min pre injekcije formalina. Stubići predstavljaju srednje vrednosti ( $\pm$  standardna greška) ukupnog vremena provedenog u nociceptivnom ponašanju u I i II fazi orofacijalnog formalinskog testa. Statistička značajnost (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ , jednofaktorska ANOVA praćena *post hoc* Tukey testom) je određena poređenjem sa kontrolnom grupom.

Srednje efektivne doze pojedinačnih analgetika za drugu fazu orofacijalnog formalinskog testa su određene linearnom regresionom analizom odnosa log doze i antinociceptivnog efekta (Slika 4.14) i prikazane su u Tabeli 4.1.



**Slika 4.14.** Krive odnosa logaritma doze i antinociceptivnog efekta eslikarbazepin acetata (ESL), paracetamola (PAR), propifenazona (PPH), naproksena (NPX), zolmitriptana (ZOL) i metoklopramida (MTC) u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. Tačke predstavljaju srednje vrednosti antinociceptivnog efekta (% AN)  $\pm$  standardna greška, određene u grupama od 7-9 miševa.

#### 4.3.2. Efekat dvokomponentnih kombinacija ESL i analgetika u modelu inflamatornog trigeminalnog bola, i utvrđivanje tipa interakcije (izobolografika analiza)

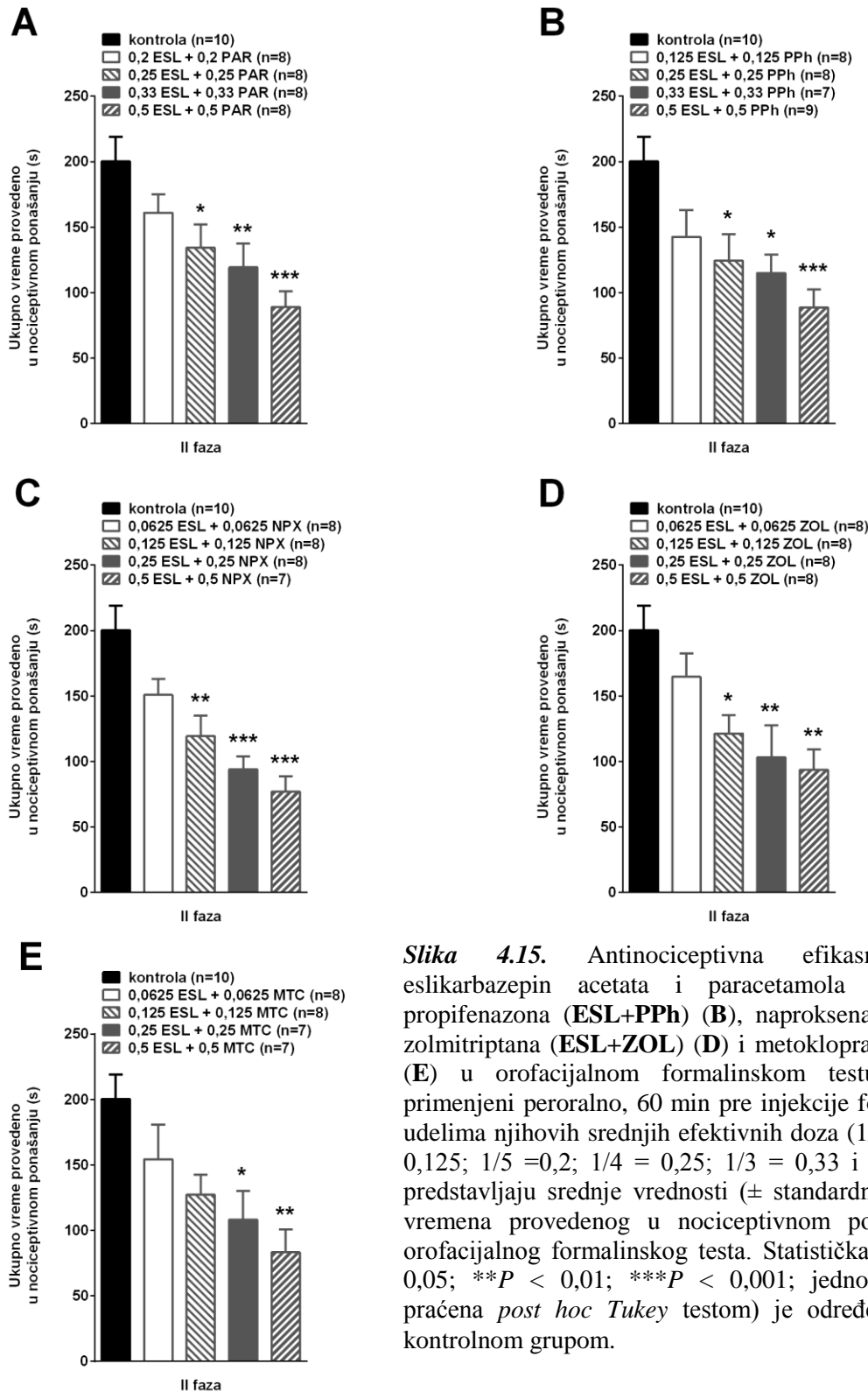
Nijedna od ispitanih dvokomponentnih kombinacija ESL i analgetika nije ispoljila značajan antinociceptivni efekat u prvoj fazi orofacijalnog formalinskog testa (sve  $P \geq 0,089$ , jednofaktorska ANOVA) (nije prikazano).

Dvokomponentne kombinacije ESL i analgetika (paracetamola, propifenazona, naproksena, zolmitriptana i metoklopramida) primenjene u dozama koje odgovaraju fiksnim udelima njihovih  $ED_{50}$  vrednosti (1/16, 1/8, 1/5, 1/4, 1/3 i/ili 1/2  $ED_{50}$ ) su proizvele značajan i dozno-zavisan antinociceptivni efekat u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa (sve  $P \leq 0,002$ , jednofaktorska ANOVA) (**Slika 4.15, A-E**). Antinociceptivni efekti kombinacija u drugoj fazi testa su bile:

- 19,6-55,6% za kombinaciju ESL-paracetamol,
- 28,8-55,7% za kombinaciju ESL-propifenazon,
- 24,7-61,6% za kombinaciju ESL-naproksen,
- 17,7-53,3% za kombinaciju ESL-zolmitriptan i
- 22,9-58,4% za kombinaciju ESL-metoklopramid.

Eksperimentalno određene ( $ED_{50 \text{ mix}}$ ) i teorijske aditivne  $ED_{50}$  vrednosti ( $ED_{50 \text{ add}}$ ) za svaku ispitanu kombinaciju su prikazane u Tabeli 4.1. U slučaju dvokomponentnih kombinacija ESL sa paracetamolom, propifenazonom ili zolmitriptanom, nije postojala značajna razlika između teorijskih  $ED_{50 \text{ add}}$  i eksperimentalnih  $ED_{50 \text{ mix}}$  vrednosti (sve  $P > 0,05$ ; modifikovani  $t$ -test) (**Slika 4.16, A, B i D; Tabela 4.1**), što ukazuje da između ovih lekova postoji aditivna interakcija. Sa druge strane, za kombinaciju ESL sa naproksenom ili metoklopramidom, eksperimentalne  $ED_{50 \text{ mix}}$  vrednosti su bile značajno manje od teorijskih  $ED_{50 \text{ add}}$  vrednosti (sve  $P < 0,05$ ; modifikovani  $t$ -test) (**Slika 4.16, C i E; Tabela 4.1**), što ukazuje da je između ovih lekova prisutna sinergistička interakcija. Na osnovu vrednosti indeksa interakcije (**Tabela 4.1**), postoji oko četvorostruko (kombinacija ESL-naproksen) i trostruko (kombinacija ESL-metoklopramid) sniženje doza oba leka kada su oni primenjeni u kombinaciji, u odnosu na doze lekova koje su potrebne da proizvedu isti nivo antinociceptivnog efekta nakon pojedinačne primene. Dodatno, grafički prikaz  $ED_{50 \text{ mix}}$  i  $ED_{50 \text{ add}}$  vrednosti ispitanih kombinacija na izobologramima pokazuje da se njihovi 95% intervali poverenja preklapaju u slučaju

kombinacija ESL sa paracetamolom, propifenazonom i zolmitriptanom (što potvrđuje aditivnu interakciju), dok se u slučaju ESL-naproksen i ESL-metoklopramid kombinacije ne preklapaju (što potvrđuje sinergističku interakciju) (Slika 4.15, A-E).



**Slika 4.15.** Antinociceptivna efikasnost kombinacija eslikarbazepin acetata i paracetamola (ESL+PAR) (A), propifenazona (ESL+PPh) (B), naproksena (ESL+NPX) (C), zolmitriptana (ESL+ZOL) (D) i metoklopramida (ESL+MTC) (E) u orofacijalnom formalinskom testu. Svi lekovi su primenjeni peroralno, 60 min pre injekcije formalina, u fiksnim udelima njihovih srednjih efektivnih doza ( $1/16 = 0,0625$ ;  $1/8 = 0,125$ ;  $1/5 = 0,2$ ;  $1/4 = 0,25$ ;  $1/3 = 0,33$  i  $1/2 = 0,5$ ). Stubići predstavljaju srednje vrednosti ( $\pm$  standardna greška) ukupnog vremena provedenog u nociceptivnom ponašanju u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. Statistička značajnost ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA praćena *post hoc* Tukey testom) je određena poređenjem sa kontrolnom grupom.

**Tabela 4.1.** Parametri izoblografske analize za kombinacije eslikarbazepin acetata (ESL) i analgetika u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

Lekovi	ED <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± SEM (95% interval poverenja)		
<i>ESL</i>	<b>44,6 ± 1,5 mg/kg</b> (38,5 – 51,5 mg/kg)		
<i>paracetamol</i>	<b>240,4 ± 5,2 mg/kg</b> (218,9 – 264,0 mg/kg)		
<i>propifenazon</i>	<b>68,4 ± 3,6 mg/kg</b> (54,5 – 85,9 mg/kg)		
<i>naproksen</i>	<b>255,5 ± 31,7 mg/kg</b> (149,7 – 435,9 mg/kg)		
<i>zolmitriptan</i>	<b>2,8 ± 0,3 mg/kg</b> (1,9 – 4,2 mg/kg)		
<i>metoklopramid</i>	<b>11,5 ± 1,1 mg/kg</b> (7,5 – 17,7 mg/kg)		
Kombinacije lekova	ED <sub>50 add</sub> <sup>b</sup>	ED <sub>50 mix</sub> <sup>c</sup>	γ <sup>d</sup>
<i>ESL + paracetamol</i>	142,5 ± 3,2 mg/kg (131,9 – 147,6 mg/kg)	121,1 ± 5,7 mg/kg (99,9 - 147,0 mg/kg)	0,85
<i>ESL + propifenazon</i>	56,5 ± 1,3 mg/kg (53,2 – 59,7 mg/kg)	48,6 ± 6,1 mg/kg (28,4 – 83,2 mg/kg)	0,86
<i>ESL + naproksen</i>	<b>150,1 ± 6,3 mg/kg</b> (135,2 – 166,3 mg/kg)	<b>70,4 ± 5,4 mg/kg</b> (50,7 - 97,8 mg/kg)*	<b>0,47</b>
<i>ESL + zolmitriptan</i>	23,7 ± 0,9 mg/kg (20,7 – 25,3 mg/kg)	15,5 ± 3,6 mg/kg (6,2 - 38,8 mg/kg)	0,65
<i>ESL + metoklopramid</i>	<b>28,0 ± 1,1 mg/kg</b> (25,4 – 30,8 mg/kg)	<b>17,0 ± 0,7 mg/kg</b> (14,3 – 20,3 mg/kg)*	<b>0,61</b>

<sup>a</sup> ED<sub>50</sub> = doza potrebna za postizanje 50% antinociceptivnog efekta.

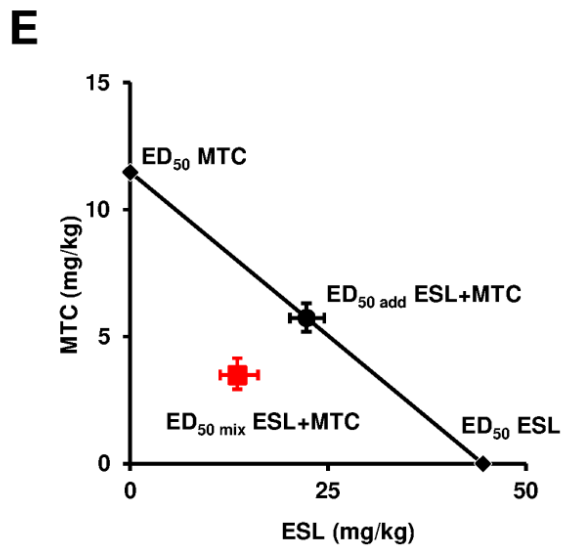
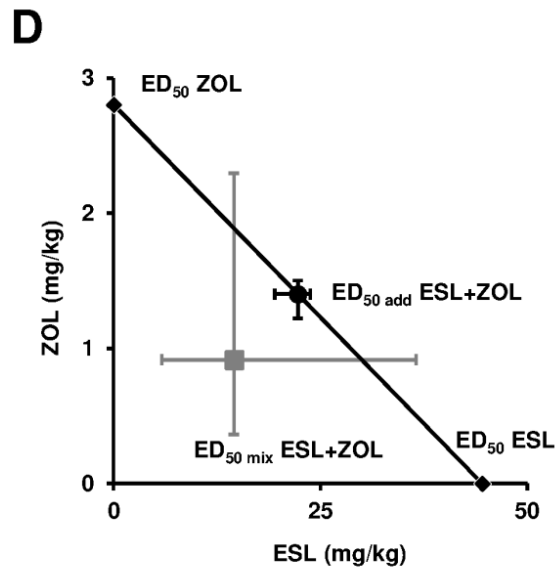
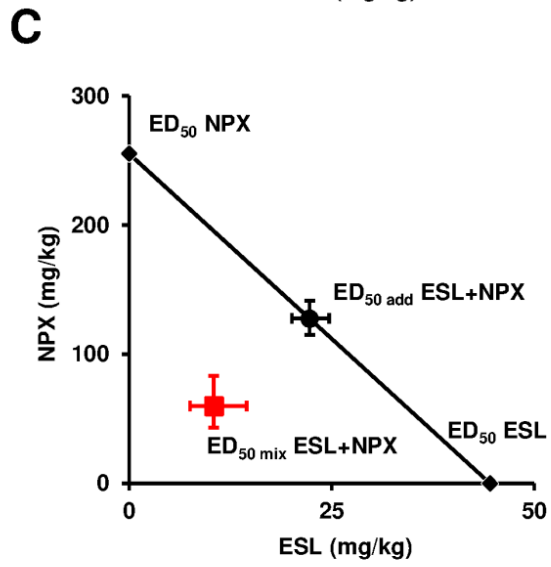
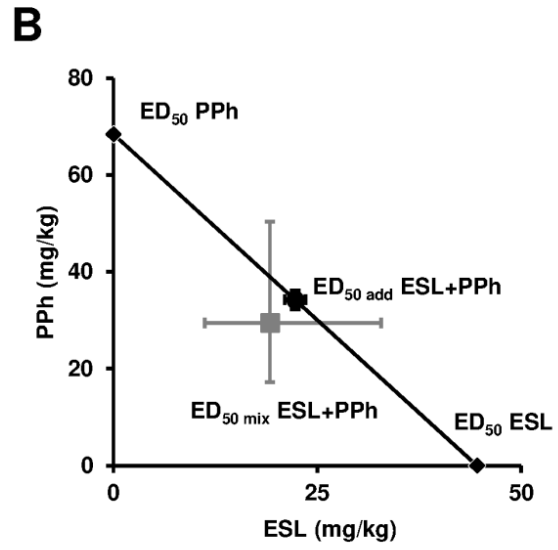
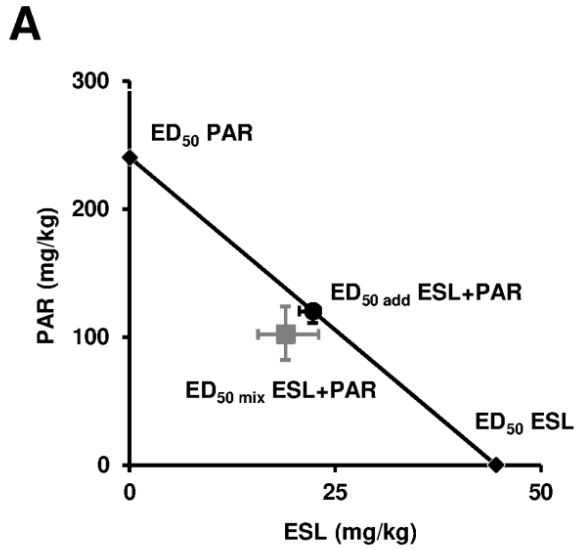
<sup>b</sup> ED<sub>50 add</sub> = teorijska aditivna ED<sub>50</sub> za kombinaciju lekova.

<sup>c</sup> ED<sub>50 mix</sub> = eksperimentalna ED<sub>50</sub> za kombinaciju lekova.

<sup>d</sup> γ = indeks interakcije. Vrednosti oko 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 ukazuju na sinergističku interakciju (Tallarida, 2002).

\*P < 0,05 između ED<sub>50 add</sub> i ED<sub>50 mix</sub> (modifikovani t-test), ukazuje na sinergističku interakciju (Tallarida i sar., 1997).



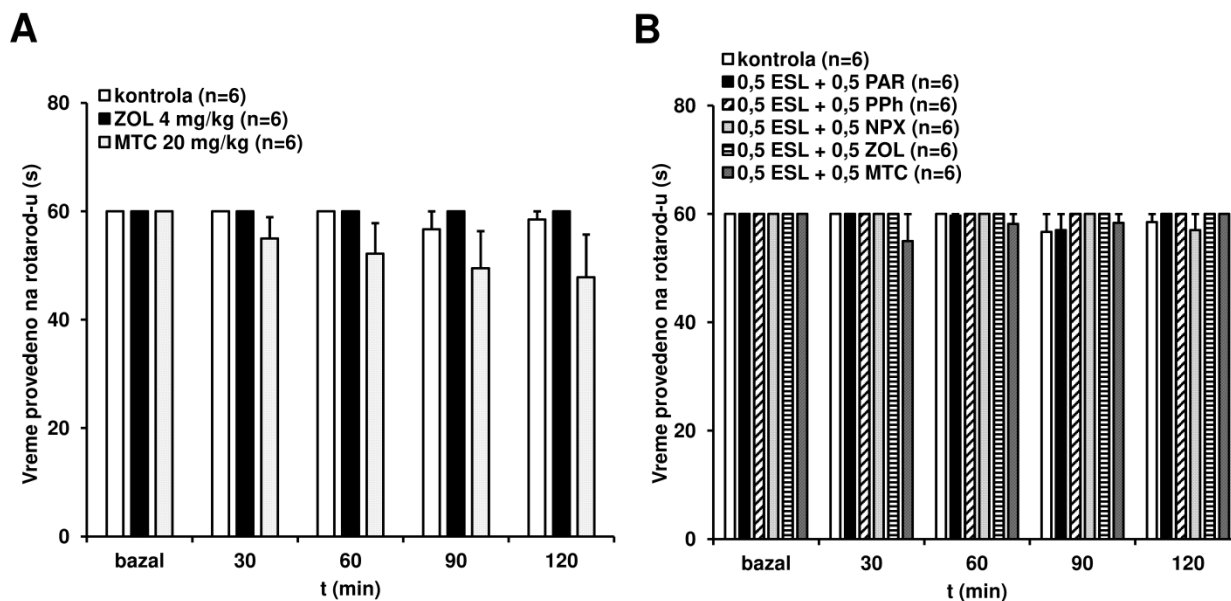


**Slika 4.16.** Izoblogrami za kombinacije eslikarbazepin acetata i paracetamola (**ESL+PAR**) (A), propifenazona (**ESL+PPh**) (B), naproksena (**ESL+NPX**) (C), zolmitriptana (**ESL+ZOL**) (D) i metoklopramida (**ESL+MTC**) (E) u II fazi orofacijalnog formalinskog testa. Na osama su prikazane ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova. Prava linija koja povezuje ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova je linija aditivnosti. Tačka na ovoj liniji je teorijska aditivna ED<sub>50</sub> (ED<sub>50 add</sub>). Za kombinacije ESL+PAR, ESL+PPh i ESL+ZOL nije bilo značajne razlike ( $P > 0,05$ ; modifikovani  $t$ -test) između ED<sub>50 add</sub> i ED<sub>50 mix</sub> (eksperimentalna ED<sub>50</sub> vrednost kombinacije) što ukazuje na aditivnu interakciju između lekova u ovim kombinacijama (A, B i D). Za kombinacije ESL+NPX i ESL+MTC, ED<sub>50 mix</sub> vrednosti su bile značajno manje od ED<sub>50 add</sub> vrednosti ( $P < 0,05$ ; modifikovani  $t$ -test), što ukazuje na sinergističku interakciju između lekova u ovim kombinacijama (C i E).

### 4.3.3. Ispitivanje uticaja pojedinačnih analgetika i kombinacija ESL i standardnih/alternativnih analgetika na motornu spretnost miševa u *rotarod* testu

Najveće doze zolmitriptana (4 mg/kg; p.o.) i metoklopramida (20 mg/kg; p.o.) koje su ispitane u orofacijalnom formalinskom testu nisu imale značajan uticaj na motornu spretnost miševa u *rotarod* testu (sve  $P \geq 0,394$  u svim vremenskim tačkama; *Mann-Whitney U-test*) (Slika 4.17A). ESL nije značajno uticao na motornu spretnost miševa kada je primenjen u dozi od 500 mg/kg p.o. (videti deo 4.1.4. *Uticaj ESL na motoriku eksperimentalnih životinja*).

Dodatno, najveće testirane doze kombinacija ESL i standardnih/alternativnih analgetika (koje su se sastojale od polovine  $ED_{50}$  vrednosti ESL i analgetika), takođe nisu imale značajan efekat u *rotarod* testu (sve  $P \geq 0,699$  u svim vremenskim tačkama; *Mann-Whitney U-test*) (Slika 4.17B).

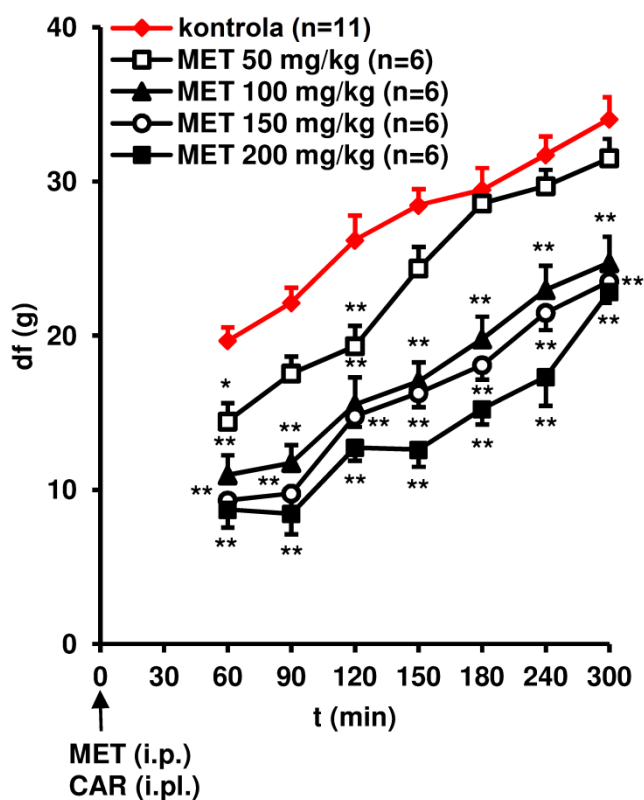


**Slika 4.17.** Vremenski tok uticaja pojedinačnih lekova, zolmitriptana (ZOL) i metoklopramida (MTC) (A), i dvokomponentnih kombinacija eslikarbazepin acetata sa paracetamolom (ESL+PAR), propifenazonom (ESL+PPh), naproksenom (ESL+NPX), zolmitriptanom (ESL+ZOL) i metoklopramidom (ESL+MTC) (B) na motornu spretnost miševa, izraženo kao vreme provedeno na *rotarod*-u (s). Bazalno vreme (pre primene tretmana) provedeno na *rotarod*-u je određeno pre peroralne primene ZOL (4 mg/kg), MTC (20 mg/kg), i kombinacija ESL+PAR, ESL+PPh, ESL+NPX, ESL+ZOL i ESL+MTC (koje su se sastojale od polovine  $ED_{50}$  svakog leka u kombinaciji). Svaki stubić predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) vremena provedenog na *rotarod*-u. Statistička značajnost (*Mann-Whitney U-test*) je određena u poređenju sa kontrolnom grupom.

#### 4.4. Efikasnost metformina u eksperimentalnim modelima bola

##### 4.4.1. Efekat metformina u modelu inflamatornog somatskog bola

U modelu inflamatornog somatskog bola, sistemska primena metformina (50-200 mg/kg; i.p.) dovela je do značajne i dozno-zavisne redukcije mehaničke hiperalgezije indukovane karageninom (Slika 4.18). Oba testirana faktora (vrsta tretmana i vreme nakon primene tretmana) su imala značajan uticaj na df vrednost koju smo merili uz pomoć električnog *Von Frey* aparata ( $P < 0,001$  za oba faktora;  $P = 0,059$  za interakciju). Za većinu ispitanih doza, maksimalni antihiperalgezijski efekti su postignuti 90 min nakon indukcije inflamacije/primene metformina i iznosili su 21,0-62,0%. Srednja efektivna doza ( $\pm$  standardna greška) za metformin u ovom modelu je bila  $125 \pm 7,1$  mg/kg (Slika 4.18).

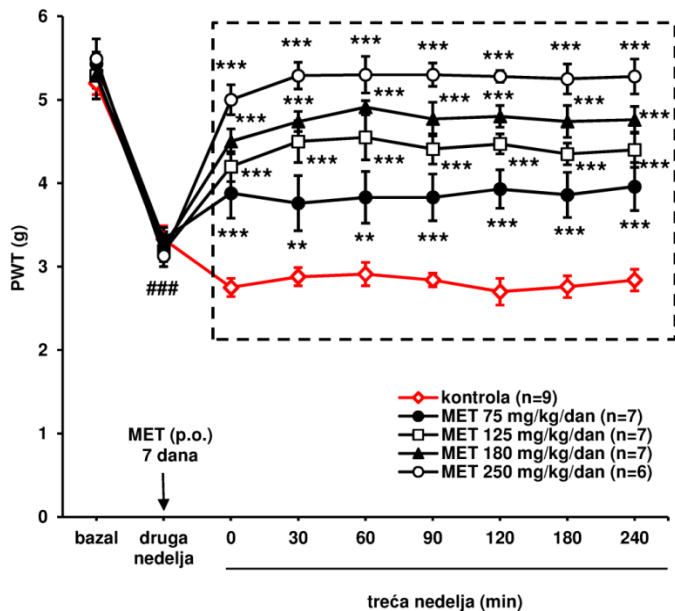


Slika 4.18. Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta metformina (MET) u modelu karageninom (CAR) indukovane hiperalgezije šape. Rezultati su izraženi kao razlika u gramima (df) između mehaničkog praga povlačenja šape pre i posle primene CAR. MET je primenjen istovremeno sa CAR (označeno strelicom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) df (g). Statistička značajnost ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, praćena *post hoc* Tukey testom) je određena u poređenju sa krivom za kontrolnu grupu. i.p. = intraperitonealno; i.pl. = intraplantarno.

##### 4.4.2. Efekat metformina u modelu bolne dijabetesne neuropatije

U modelu bolne dijabetesne neuropatije, ponavljana primena metformina (75-250 mg/kg/dan; p.o. tokom 7 dana) je proizvela dozno-zavisan antihiperalgezijski efekat. Statistička analiza je pokazala značajan uticaj vrste tretmana i vremena na PWT parametar koji je određen uz pomoć *Von Frey* aparata ( $P < 0,001$  za oba faktora) (Slika 4.19). Takođe, statističkom analizom je utvrđeno postojanje značajne interakcije između dva testirana faktora ( $P < 0,001$ ), zbog čega smo dodatno analizirali podatke primenom jednofaktorske ANOVA-e, kako bismo utvrdili u kojim vremenskim tačkama, u trećoj nedelji nakon indukcije dijabetesa, je prisutna značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu. Jednofaktorska ANOVA je pokazala da u svim vremenskim tačkama u trećoj nedelji postoji statistički značajan uticaj tretmana metforminom na PWT vrednost u odnosu na kontrolnu grupu (sve  $P < 0,001$ ).

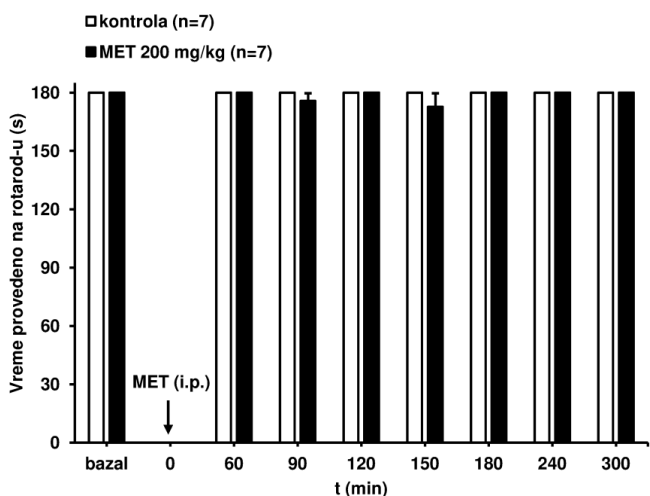
(Slika 4.19). Antihiperalgezijski efekat metformina je bio dozno-zavisan i kretao se u rasponu 32,1-90,1%, a ED<sub>50</sub> vrednost ( $\pm$  standardna greška) za metformin u ovom modelu bola je bila 100,4  $\pm$  7,6 mg/kg (Slika 4.19).



**Slika 4.19.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta metformina (MET) u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Rezultati su izraženi kao mehanički prag povlačenja šape (engl. *Paw Withdrawal Threshold* - PWT) u gramima, pre (bazal) i posle indukcije dijabetesa (u 2. i 3. nedelji). U svim eksperimentalnim grupama je PWT vrednost u 2. nedelji bila značajno manja, nego bazalna PWT vrednost pre indukcije dijabetesa ( $###P < 0,001$ ). MET je primenjivan oralno (p.o.) tokom 7 dana, počev od 2. nedelje nakon indukcije dijabetesa (označeno strelicom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) PWT (g). Statistička značajnost ( $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc Tukey* testom) je određena u poređenju sa krivom za kontrolnu grupu.

#### 4.4.3. Uticaj metformina na motoriku eksperimentalnih životinja

Primena najveće ispitane doze metformina (200 mg/kg; i.p.) nije imala značajan uticaj na motornu spretnost pacova ni u jednoj vremenskoj tački u *rotarod* testu (sve  $P \geq 0,710$ ; *Mann-Whitney U*-test) (Slika 4.20). Uticaj metformina na motoriku dijabetičnih miševa nije ispitivan, jer je njegova analgetička aktivnost ispitivana 24h nakon poslednje primene (7-dnevna primena). Imajući u vidu da metformin nema sklonost ka ispoljavanju depresornih efekata na centralni nervni sistem ni neposredno nakon primene, smatrali smo da je mogućnost ispoljavanja ovakvih efekata 24h sata nakon primene malo verovatna.



**Slika 4.20.** Vremenski tok uticaja metformina (MET) na motornu spretnost pacova, izraženog kao vreme provedeno na *rotarod*-u (s). Bazalno vreme provedeno na *rotarod*-u je određeno pre primene MET (200 mg/kg; i.p.). Svaki stubić predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) vremena provedenog na *rotarod*-u. Statistička značajnost (*Mann-Whitney U*-test) je određena u poređenju sa kontrolnom grupom. i.p. = intraperitonealno.

## 4.5. Ispitivanje interakcija između metformina i standardnih/alternativnih analgetika u eksperimentalnim modelima bola

### 4.5.1. Ispitivanje interakcija između metformina i standardnih/alternativnih analgetika u modelu inflamatornog somatskog bola

#### 4.5.1.1. Efekat standardnih/alternativnih analgetika u modelu somatskog inflamatornog bola

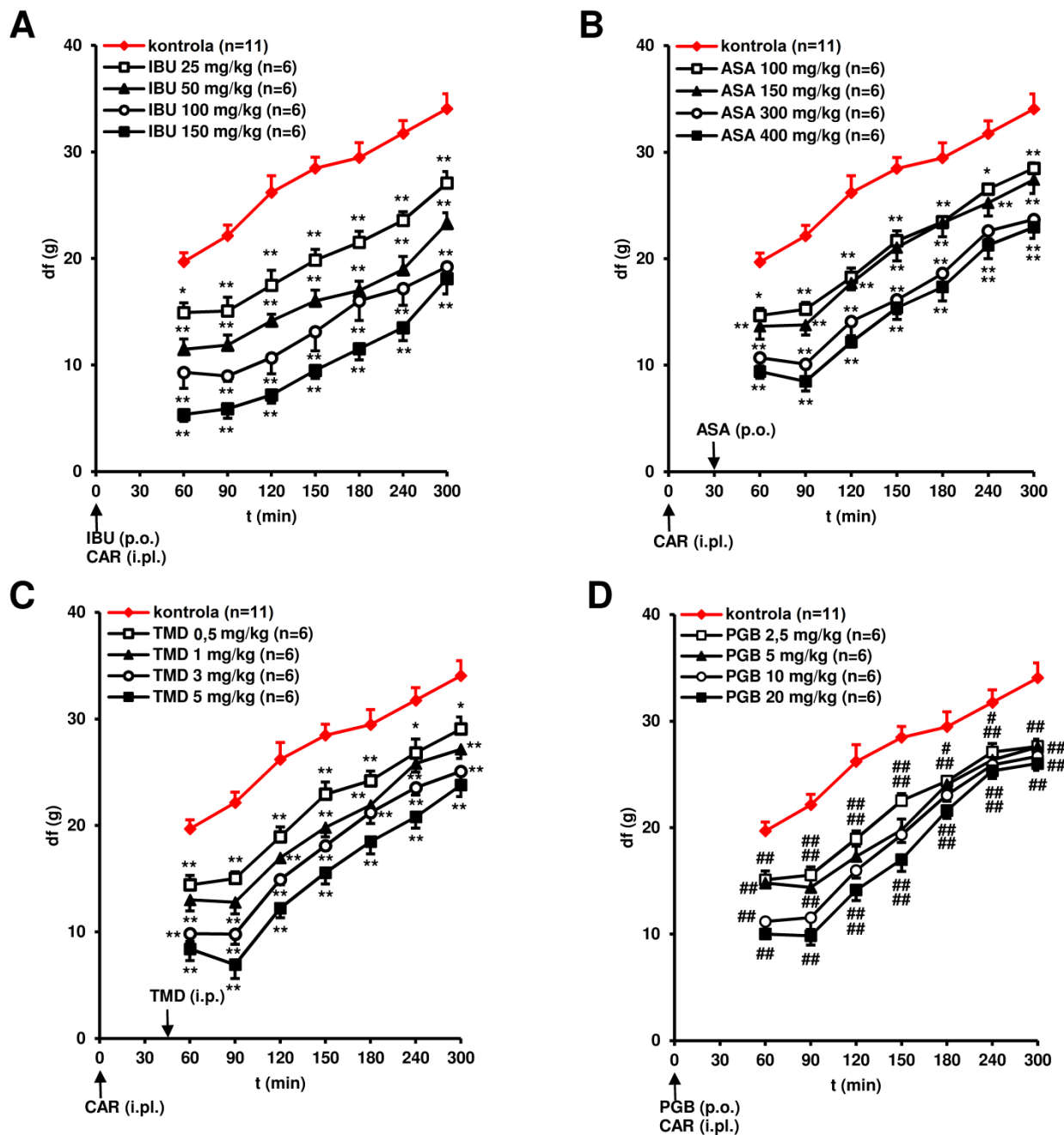
Ibuprofen, aspirin, tramadol i pregabalina su značajno redukovali inflamatornu mehaničku hiperalgeziju indukovanu karageninom. Statistička analiza je pokazala značajan uticaj vrste tretmana i vremena na parametar  $df$  (sve  $P < 0,001$  za oba testirana faktora i sva četiri ispitana analgetika; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) (**Slika 4.21, A-D**). Dodatno, za većinu lekova interakcija između dva testirana faktora nije bila značajna (sve  $P \geq 0,169$ ), sem u slučaju pregabalina ( $P = 0,002$ ). Iz ovog razloga su rezultati ispitivanja antihiperalezijskog efekta pregabalina dodatno analizirani primenom jednofaktorske ANOVA-e u svim vremenskim tačkama, kako bi utvrdili koja grupa tretirana pregabalinom je proizvela značajan antihiperalezijski efekat. Ova analiza je pokazala značajan uticaj pregabalina na parametar  $df$  u svim testiranim vremenskim tačkama u odnosu na kontrolnu grupu (sve  $P < 0,001$ ).

Svi analgetici su proizveli maksimalni antihiperalezijski efekat 90 min nakon indukcije inflamacije. Maksimalni antihiperalezijski efekti su bili:

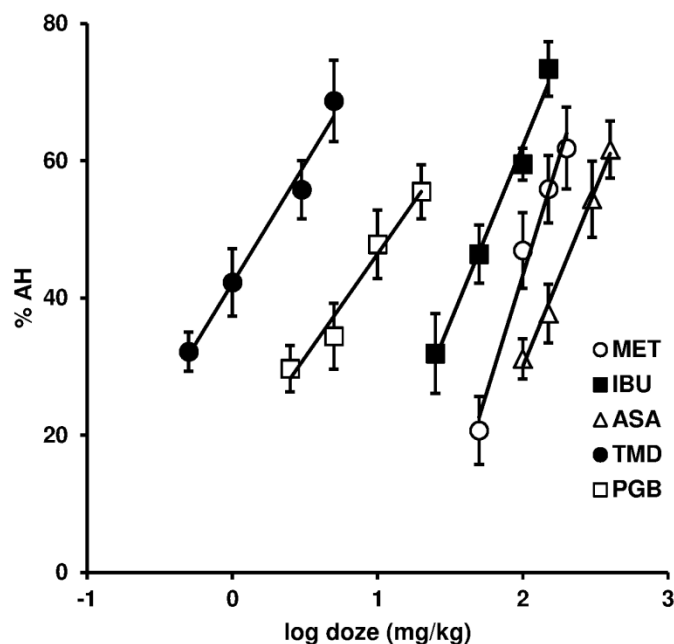
- 31,9-73,4% za ibuprofen (25-150 mg/kg; p.o.),
- 31,1-61,6% za aspirin (100-400 mg/kg; p.o.),
- 32,2-68,7% za tramadol (0,5-5 mg/kg; i.p.) i
- 28,2-55,5% za pregabalina (2,5-20 mg/kg; p.o.) (**Slika 4.22**).

Srednje efektivne doze pojedinačnih analgetika su određene linearnom regresionom analizom kriva zavisnosti log doze i antihiperalezijskog efekta (za efekat 90 min nakon indukcije inflamacije) (**Slika 4.22**) i prikazane su u Tabeli 4.2.

Rezultati ispitivanja antihiperalezijskih efekata metformina u modelu karageninom indukovane mehaničke hiperalgezije su prikazani u delu 4.4.1. *Efekat metformina u modelu inflamatornog somatskog bola.*



**Slika 4.21.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta ibuprofena (**IBU**) (**A**), aspirina (**ASA**) (**B**), tramadola (**TMD**) (**C**) i pregabalina (**PGB**) (**D**) u modelu karageninom (**CAR**) indukovane hiperalgezije šape. Rezultati su izraženi kao razlika u gramima (*df*) između mehaničkog praga povlačenja šape pre i posle primene **CAR**. Lekovi su primenjeni istovremeno sa (**IBU** i **PGB**) ili posle injekcije **CAR** (30 min za **ASA**, odnosno 45 min za **TMD**) (označeno strelicama). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) *df* (g). Statistička značajnost ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, praćena *post hoc Tukey* testom;  $\#P < 0,05$ ;  $\##P < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA praćena *post hoc Tukey* testom) je određena u poređenju sa krivom za kontrolnu grupu. i.p. = intraperitonealno; i.pl. = intraplantarno; p.o. = peroralno.



*Slika 4.22.* Krive odnosa log doze i antihiperalgezijskog efekta metformina (MET), ibuprofena (IBU), aspirina (ASA), tramadola (TMD) i pregabalina (PGB) u modelu somatskog inflamatornog bola (prikazane vrednosti se odnose na efekte 90 min nakon indukcije inflamacije). Tačke predstavljaju srednje vrednosti antihiperalgezijskih efekata (%AH)  $\pm$  standardna greška, određenih u 6 pacova.

#### 4.5.1.2. Efekti dvokomponentnih kombinacija metformina i standardnih/alternativnih analgetika u modelu inflamatornog somatskog bola, i utvrđivanje tipa interakcije (izoblografska analiza)

Dvokomponentne kombinacije metformina i standardnih/alternativnih analgetika (ibuprofena, aspirina, tramadola i pregabalina) primenjene u dozama koje odgovaraju fiksnim udelima njihovih  $ED_{50}$  vrednosti (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2  $ED_{50}$ ) su dovele do značajne redukcije inflamatorne mehaničke hiperalgezije šape indukovane karageninom (Slika 4.23, A-D). Dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima je pokazala značajan uticaj vrste tretmana i vremena na parametar  $df$  (sve  $P < 0,001$  za oba faktora i za sve četiri ispitane kombinacije). Za većinu ispitanih kombinacija, interakcija između dva ispitana faktora nije bila značajna (sve  $P \geq 0,233$ ), sa izuzetkom kombinacije metformina i pregabalina ( $P < 0,001$ ). Zbog prisustva značajne interakcije između dva ispitana faktora, podaci za kombinaciju metformin-pregabalin su dodatno analizirani primenom jednofaktorske ANOVA-e, koja je pokazala značajan uticaj primene kombinacije na  $df$  parametar u svim vremenskim tačkama (sve  $P < 0,001$ ).

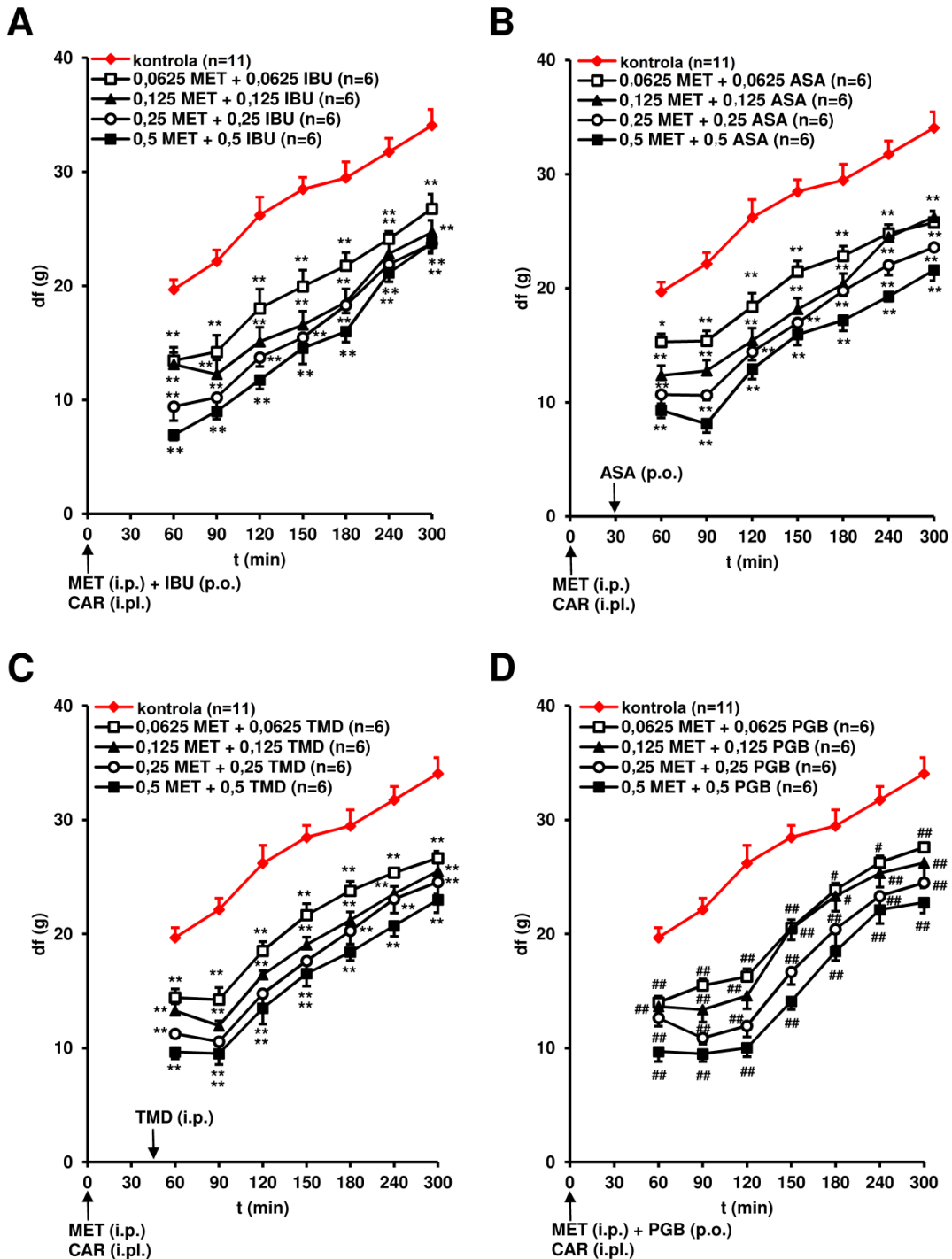
Maksimalni antihiperalgezijski efekti kombinacija su postignuti 90 min (kombinacije metformina sa ibuprofenom, aspirinom ili tramadolom) ili 120 min nakon indukcije inflamacije (kombinacija metformina i pregabalina) i bili su:

- 35,9-64,9% za kombinaciju metformin-ibuprofen,
- 30,5-63,3% za kombinaciju metformin-aspirin,
- 35,6-57,0% za kombinaciju metformin-tramadol i
- 37,9-61,8% za kombinaciju metformin-pregabalin.

$ED_{50 \text{ mix}}$  vrednosti za dvokomponentne kombinacije metformina i analgetika su određene linearnom regresionom analizom odnosa log doze i antihiperalgezijskog efekta i prikazane su u Tabeli 4.2. Za sve ispitane kombinacije  $ED_{50 \text{ mix}}$  vrednosti su bile značajno manje od  $ED_{50 \text{ add}}$  vrednosti (sve  $P < 0,05$ ; modifikovani  $t$ -test), a vrednosti indeksa interakcije su bile manje od 1 (Slika 4.24, A-D; Tabela 4.2), što ukazuje da između metformina i ispitanih analgetika postoji sinergistička interakcija. Na osnovu vrednosti indeksa interakcije (Tabela 4.2), postojao je sličan stepen potencijacije efekta (sinergizma) u

svim ispitanim kombinacijama, sa otprilike 5-ostrukim smanjenjem doza lekova kada su primenjeni u kombinaciji u poređenju sa dozama lekova koje su potrebne da proizvedu isti nivo efekta nakon pojedinačne primene. Dodatno, grafički prikaz na izobologramima, pokazuje da se 95% intervali poverenja  $ED_{50 \text{ mix}}$  i  $ED_{50 \text{ add}}$  vrednosti ne preklapaju, što je takođe potvrda sinergističke prirode interakcija između ovih lekova (**Slika 4.24, A-D**).





**Slika 4.23.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta kombinacija metformina i ibuprofena (**MET+IBU**) (**A**), aspirina (**MET+ASA**) (**B**), tramadola (**MET+TMD**) (**C**) i pregabalina (**MET+PGB**) (**D**) u modelu karageninom (CAR) indukovane hiperalgezije šape. Rezultati su izraženi kao razlika u gramima (df) između mehaničkog praga povlačenja šape pre i posle primene CAR. Lekovi su primenjeni istovremeno sa (MET, IBU i PGB) ili posle CAR injekcije (30 min za ASA, odnosno 45 min za TMD) (označeno strelicama) u fiksnim udelima njihovih pojedinačnih ED<sub>50</sub> vrednosti (1/16 = 0,0625; 1/8 = 0,125; 1/4 = 0,25; 1/2 = 0,5). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost (± standardna greška) df (g). Statistička značajnost (\**P* < 0,05; \*\**P* < 0,01; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, praćena *post hoc* Tukey testom; #*P* < 0,05; ##*P* < 0,01; jednofaktorska ANOVA praćena *post hoc* Tukey testom) je određena u poređenju sa krivom za kontrolnu grupu. i.p. = intraperitonealno; i.pl. = intraplantarano; p.o. = peroralno.

**Tabela 4.2.** Parametri izoblografske analize za kombinacije metformina i analgetika u modelu somatskog inflamatornog bola

Lekovi	ED <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± SEM (95% interval poverenja)		
<i>metformin</i>	<b>125,1 ± 7,1 mg/kg</b> (98,1 – 159,6 mg/kg)		
<i>ibuprofen</i>	<b>58,0 ± 3,3 mg/kg</b> (45,5 – 74,1 mg/kg)		
<i>aspirin</i>	<b>243,9 ± 7,4 mg/kg</b> (213,8 – 278,2 mg/kg)		
<i>tramadol</i>	<b>1,7 ± 0,1 mg/kg</b> (1,2 – 2,5 mg/kg)		
<i>pregabalin</i>	<b>13,2 ± 1,6 mg/kg</b> (7,8 – 22,3 mg/kg)		
Kombinacije lekova	ED <sub>50 add</sub> <sup>b</sup>	ED <sub>50 mix</sub> <sup>c</sup>	γ <sup>d</sup>
<i>metformin + ibuprofen</i>	<b>91,6 ± 2,9 mg/kg</b> (84,3 – 98,7 mg/kg)	<b>37,0 ± 2,2 mg/kg</b> (28,8 – 47,6 mg/kg)*	<b>0,40</b>
<i>metformin + aspirin</i>	<b>184,5 ± 4,7 mg/kg</b> (172,8 – 196,0 mg/kg)	<b>78,8 ± 1,6 mg/kg</b> (72,1 – 86,1 mg/kg)*	<b>0,43</b>
<i>metformin + tramadol</i>	<b>63,4 ± 2,8 mg/kg</b> (55,3 – 68,9 mg/kg)	<b>28,0 ± 2,9 mg/kg</b> (18,0 – 43,6 mg/kg)*	<b>0,44</b>
<i>metformin + pregabalin</i>	<b>69,1 ± 3,1 mg/kg</b> (60,1 – 75,5 mg/kg)	<b>25,3 ± 1,1 mg/kg</b> (20,9 – 30,8 mg/kg)*	<b>0,37</b>

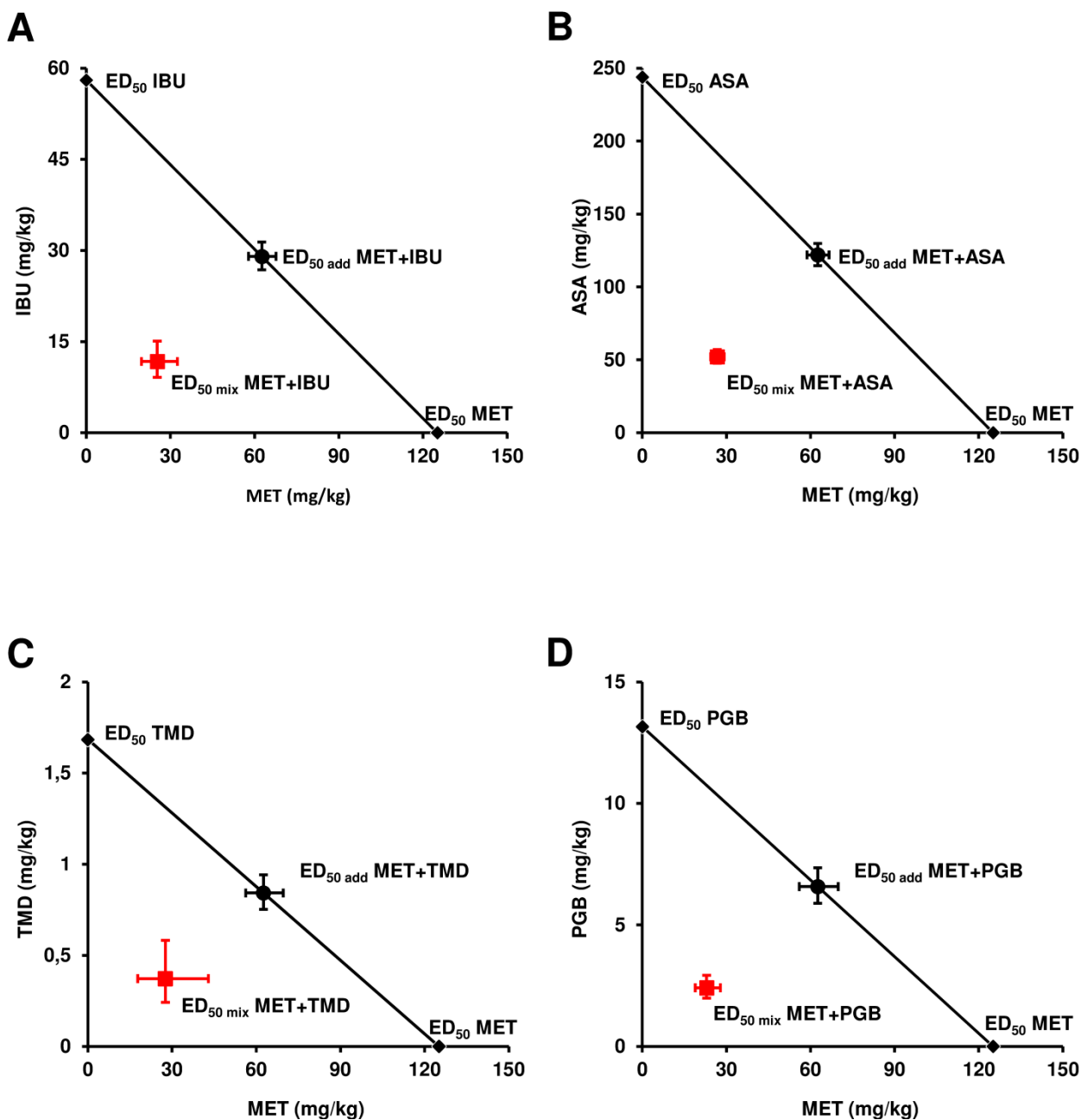
<sup>a</sup> ED<sub>50</sub> = doza potrebna za postizanje 50% antihiperalgezijskog efekta.

<sup>b</sup> ED<sub>50 add</sub> = teorijska aditivna ED<sub>50</sub> za kombinaciju lekova.

<sup>c</sup> ED<sub>50 mix</sub> = eksperimentalna ED<sub>50</sub> za kombinaciju lekova.

<sup>d</sup> γ = indeks interakcije. Vrednosti oko 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 ukazuju na sinergističku interakciju (Tallarida, 2002).

\*P < 0,05 između ED<sub>50 add</sub> i ED<sub>50 mix</sub> (modifikovani t-test), ukazuje na sinergističku interakciju (Tallarida i sar., 1997).



**Slika 4.24.** Izoblogrami za kombinacije metformina i ibuprofena (MET+IBU) (A), aspirina (MET+ASA) (B), tramadola (MET+TMD) (C) i pregabalina (MET+PGB) (D) u modelu somatskog inflamatornog bola. Na osama su prikazane ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova. Prava linija koja povezuje ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova je linija aditivnosti. Tačka na ovoj liniji je teorijska aditivna ED<sub>50</sub> (ED<sub>50</sub> add). Za sve kombinacije ED<sub>50</sub> mix vrednosti (eksperimentalne ED<sub>50</sub> vrednosti kombinacija) su bile značajno manje od ED<sub>50</sub> add vrednosti, što ukazuje na sinergističku interakciju između lekova u ovim kombinacijama ( $P < 0,05$ ; modifikovani  $t$ -test).

#### 4.5.1.3. Analiza dužine trajanja antihiperalgezijskih efekata metformina, analgetika i dvokomponentnih kombinacija metformina i analgetika u modelu inflamatornog somatskog bola

Dužina antihiperalgezijskog dejstva metformina, standardnih/alternativnih analgetika i dvokomponentnih kombinacija metformin-analgetik je izražena kao nagib regresionih prava koje opisuju zavisnost parametra  $\Delta\text{PIK}$  od maksimalnog antihiperalgezijskog efekta leka/kombinacije lekova (videti *Materijal i metode* za objašnjenje). Vrednosti nagiba ovih regresionih prava su prikazane u Tabeli 4.3. Na osnovu veličine nagiba ovih regresionih prava, zaključili smo da metformin ima značajno duži antihiperalgezijski efekat od pregabalina ( $P = 0,011$ ; test paralelizma), i sličnu dužinu antihiperalgezijskog dejstva kao ibuprofen, aspirin i tramadol (sve  $P \geq 0,024$ ; test paralelizma) (**Tabela 4.3**).

Na osnovu vrednosti odgovarajućih nagiba, dužina dejstva metformina je bila nepromenjena kada je primenjen u kombinaciji sa analgeticima (sve  $P \geq 0,030$ ; test paralelizma). Većina testiranih analgetika takođe je imalo sličnu dužinu dejstva kada je primenjeno u kombinaciji sa metforminom (sve  $P \geq 0,083$ ; test paralelizma), sa izuzetkom pregabalina čiji efekat je bio produžen kada je primenjen u kombinaciji sa metforminom tj. nagib za kombinaciju metformin-pregabalin je bio značajno veći od nagiba za pregabalin ( $P = 0,008$ ; test paralelizma) (**Tabela 4.3**).

U slučaju većine ispitanih kombinacija metformina i analgetika, maksimalni antihiperalgezijski efekti su postignuti u istom trenutku kao maksimalni efekti nakon pojedinačne primene metformina ili analgetika (90 min posle indukcije inflamacije). Jedini izuzetak je kombinacija metformina i pregabalina, čiji maksimalni efekat je postignut 120 min nakon indukcije inflamacije (tj. 30 min kasnije u odnosu na individualnu primenu metformina i pregabalina).

**Tabela 4.3.** Parametri dužine antihiperalgezijskih efekata metformina, analgetika i dvokomponentnih kombinacija metformina i analgetika u modelu inflamatornog somatskog bola

Lek/kombinacija lekova	Nagib <sup>a</sup> ± standardna greška 98,7% i/ili 97,5% intervali poverenja (IP)	r <sup>b</sup>
<i>metformin</i>	59 ± 4,4 98,7% IP: 20-97   97,5% IP: 31-86	0,99
<i>ibuprofen</i>	56 ± 2,8 98,7% IP: 32-80   97,5% IP: 38-73	1
<i>aspirin</i>	48 ± 2,5 98,7% IP: 27-69   97,5% IP: 33-63	1
<i>tramadol</i>	41 ± 1,5 98,7% IP: 28-54   97,5% IP: 32-50	1
<i>pregabalin</i>	30 ± 3,8 <sup>¥</sup> 98,7% IP: -3,5-63   97,5% IP: 5,9-53	0,98
<i>metformin + ibuprofen</i>	46 ± 4,3 97,5% IP: 19-73	0,99
<i>metformin + aspirin</i>	41 ± 1,6 97,5% IP: 31-51	1
<i>metformin + tramadol</i>	52 ± 5 97,5% IP: 20-83	0,99
<i>metformin + pregabalin</i>	54 ± 3 <sup>§</sup> 97,5% IP: 36-72	1

<sup>a</sup>Nagib %AH-ΔPIK regresione prave je relativna mera dužine dejstva koje proizvodi lek/kombinacija lekova; tretmani sa značajno većim nagibom imaju duže antihiperalgezijsko dejstvo (Tomić i sar., 2013; Yaksh i sar., 1986).

<sup>b</sup>r = koeficijent korelacije %AH-ΔPIK regresione prave; vrednosti bliske 1 ukazuju da je dužina dejstva leka/kombinacije lekova dozno-zavisna (Tomić i sar., 2013; Yaksh i sar., 1986).

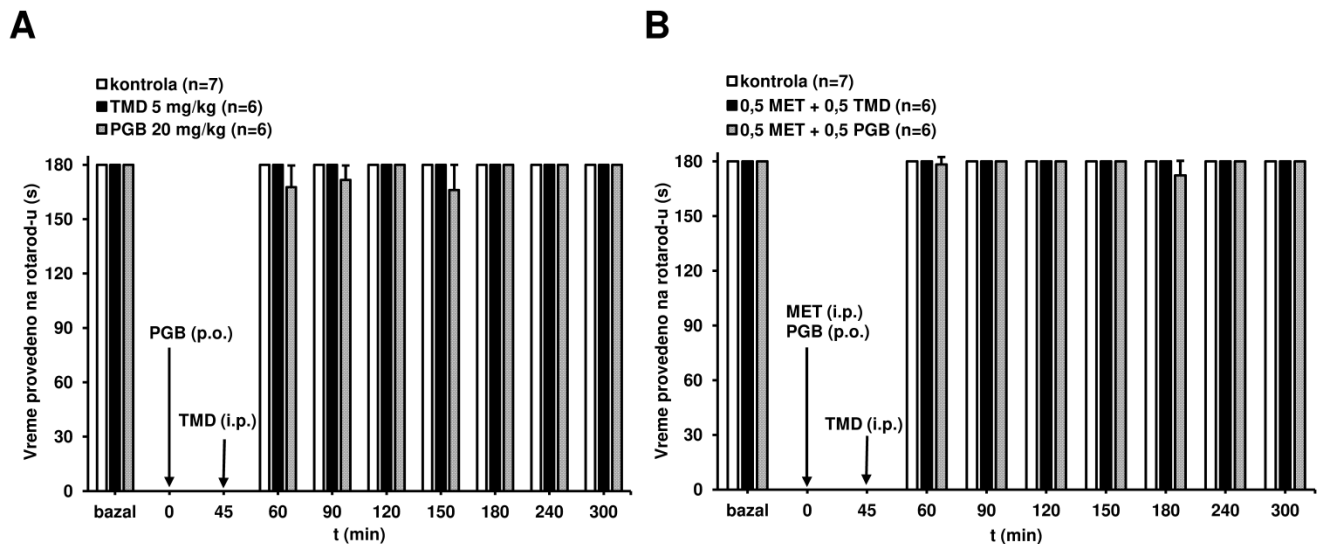
<sup>¥</sup>P < 0,013; u poređenju sa nagibom za metformin nakon individualne primene, test paralelizma.

<sup>§</sup>P < 0,025; u poređenju sa nagibom za analgetik (pregabalin) nakon individualne primene, test paralelizma.

#### 4.5.1.4. Ispitivanje uticaja metformina, analgetika i dvokomponentnih kombinacija metformina i analgetika na motornu spretnost pacova u *rotarod* testu

Najveće testirane doze tramadola (5 mg/kg; i.p.) i pregabalina (20 mg/kg; p.o.) nisu imale značajan uticaj na motornu spretnost pacova u *rotarod* testu (sve  $P \geq 0,628$  u svim vremenskim tačkama; *Mann-Whitney U-test*) (**Slika 4.25A**). Najveća testirana doza metformina (200 mg/kg; i.p.) nije imala značajan uticaj na motornu spretnost pacova u *rotarod* testu (*videti deo 4.4.3. Uticaj metformina na motoriku eksperimentalnih životinja*).

Takođe, najveće ispitane doze kombinacija metformina i tramadola/pregabalina (koje su se sastojale od 1/2  $ED_{50}$  metformina i 1/2  $ED_{50}$  tramadola/pregabalina) nisu proizvele značajan efekat kod pacova u *rotarod* testu (sve  $P \geq 0,628$  u svim vremenskim tačkama; *Mann-Whitney U-test*) (**Slika 4.25B**).



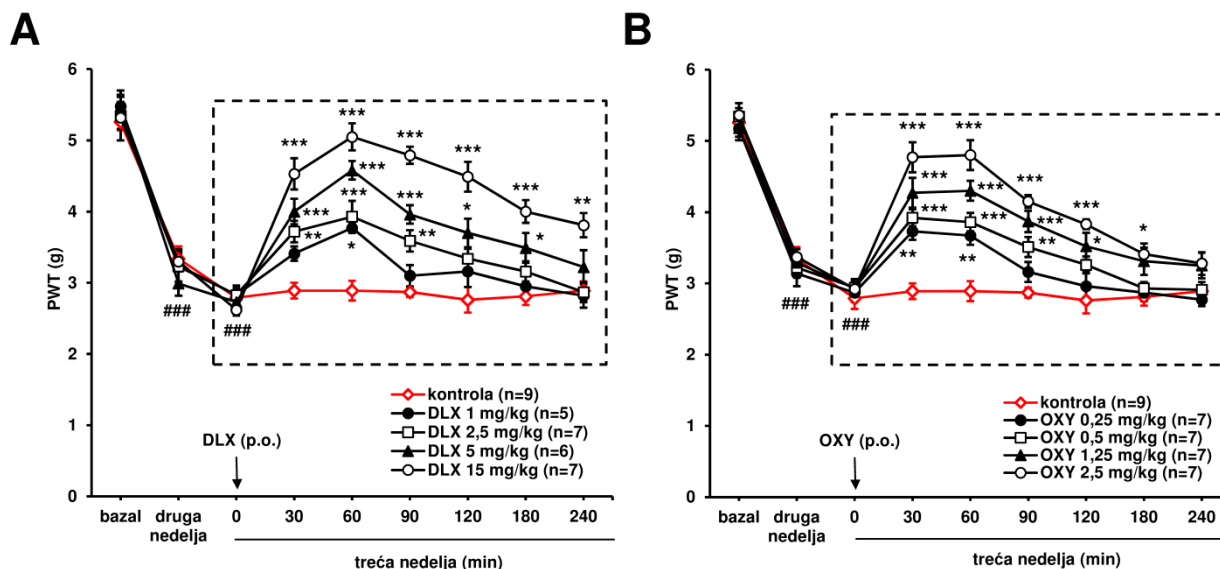
**Slika 4.25.** Vremenski tok uticaja pojedinačnih lekova, metformina (**MET**), tramadola (**TMD**) i pregabalina (**PGB**) (**A**), kao i dvokomponentnih kombinacija metformina sa tramadolom (**MET+TMD**) i pregabalinom (**MET+PGB**) (**B**) na motornu spretnost pacova, izraženog kao vreme provedeno na *rotarod*-u (s). Bazalno vreme (pre primene tretmana) provedeno na *rotarod*-u je određeno pre primene MET (200 mg/kg; i.p.), TMD (5 mg/kg; i.p.), PGB (20 mg/kg; p.o.), i kombinacija MET+TMD i MET+PGB (koje su se sastojale od polovine  $ED_{50}$  svakog leka u kombinaciji). Svaki stubić predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) vremena provedenog na *rotarod*-u. Statistička značajnost (*Mann-Whitney U-test*) je određena u poređenju sa kontrolnom grupom.

## 4.5.2. Ispitivanje interakcije između metformina i standardnih/alternativnih analgetika u modelu bolne dijabetesne neuropatije

### 4.5.2.1. Efekat duloksetina, oksikodona i vitamina B<sub>12</sub> u modelu bolne dijabetesne neuropatije

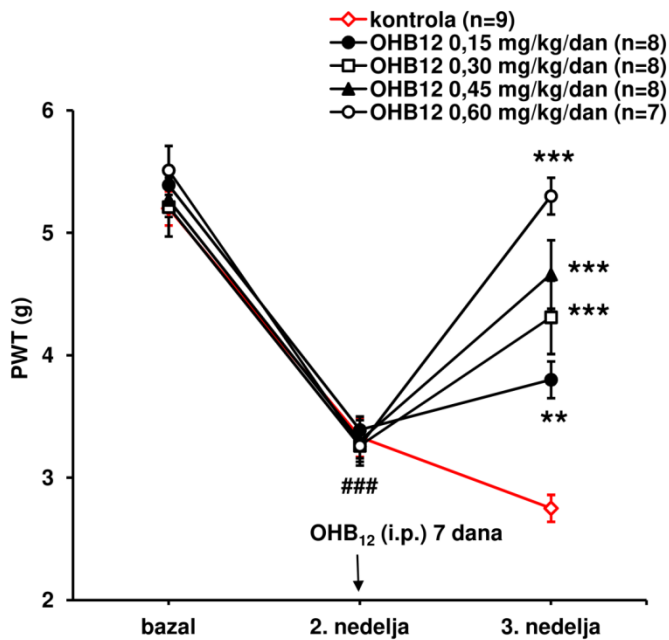
Akutna primena duloksetina (1-15 mg/kg; p.o.) i oksikodona (0,25-2,5 mg/kg; p.o.), u 3. nedelji nakon indukcije dijabetesa, je značajno redukovala mehaničku hiperalgeziiju kod dijabetičnih miševa, na dozno-zavisan i vremenski-zavisan način ( $P < 0,001$  za oba testirana faktora; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) (Slika 4.26, A i B). Interakcija između dva testirana faktora je bila značajna i u slučaju duloksetina i oksikodona ( $P < 0,001$ ), zbog čega smo dodatno analizirali podatke primenom jednofaktorske ANOVA-e. Ova analiza je pokazala da duloksetin (sve  $P \leq 0,001$ ) i oksikodon (sve  $P \leq 0,042$ ) u svim vremenskim tačkama značajno povećavaju parametar PWT u odnosu na kontrolnu grupu. Duloksetin je postigao maksimalne antihiperalgezijske efekte 60 min nakon primene (35,3-86,0%), a oksikodon 30-60 min nakon primene (37,0-78,4%) (Slika 4.28). Srednje efektivne doze duloksetina i oksikodona u ovom modelu, određene linearnom regresionom analizom krivi odnosa log doze i efekta, su prikazane u Tabeli 4.4.

Rezultati ispitivanja antihiperalgezijskih efekata metformina i ESL u modelu bolne dijabetesne neuropatije su prikazani u delovima 4.4.2. Efekat metformina u modelu bolne dijabetesne neuropatije i 4.1.3. Efekat ESL u modelu bolne dijabetesne neuropatije.



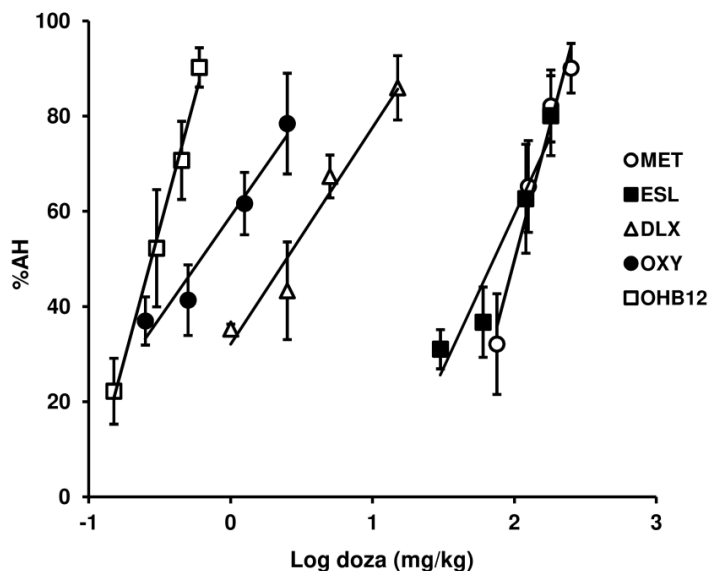
**Slika 4.26.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta duloksetina (DLX) (A) i oksikodona (OXY) (B) u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Rezultati su izraženi kao mehanički prag povlačenja šape (engl. Paw Withdrawal Threshold - PWT) u gramima, pre (bazal) i posle indukcije dijabetesa (u 2. i 3. nedelji). U svim eksperimentalnim grupama je PWT vrednost u 2. i 3. nedelji bila značajno manja, nego bazalna PWT vrednost pre indukcije dijabetesa ( $###P < 0,001$ ). DLX i OXY su primenjeni peroralno (p.o.) u pojedinačnoj dozi, 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa (označeno strelicom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) PWT (g). Statistička značajnost ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Tukey testom) je određena u poređenju sa krivom za kontrolnu grupu.

Sedmodnevna primena vitamina B<sub>12</sub> (0,15-0,6 mg/kg/dan; i.p.) je takođe značajno smanjila mehaničku hiperalgeziju kod dijabetičnih miševa u 3. nedelji nakon indukcije dijabetesa ( $P < 0,001$  za oba testirana faktora; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) (Slika 4.27). Kao i u slučaju duloksetina i oksikodona, interakcija između dva testirana faktora je bila značajna ( $P < 0,001$ ), te smo podatke dodatno analizirali primenom jednofaktorske ANOVA-e. Ova analiza je pokazala da u 3. nedelji nakon indukcije dijabetesa, u svim grupama tretiranim vitaminom B<sub>12</sub> su PWT vrednosti bile značajno veće od kontrolnih (sve  $P \leq 0,001$ ). Antihiperalgezijski efekti vitamina B<sub>12</sub> u ovom modelu su bili u rasponu 22,2-90,2% (Slika 4.28). Srednja efektivna doza vitamina B<sub>12</sub> je prikazana u Tabeli 4.4.



Slika 4.27. Antihiperalgezijski efekat vitamina B<sub>12</sub> (OHB12) u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Rezultati su izraženi kao mehanički prag povlačenja šape (engl. *Paw Withdrawal Threshold* - PWT) u gramima, pre (bazal) i posle indukcije dijabetesa (u 2. i 3. nedelji). U svim eksperimentalnim grupama je PWT vrednost u 2. nedelji bila značajno manja, nego bazalna PWT vrednost pre indukcije dijabetesa ( $###P < 0,001$ ). OHB12 je primenjen intraperitonealno (i.p.) tokom 7 dana, počev od 2. nedelje nakon indukcije dijabetesa (označeno strelicom). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) PWT (g). Statistička značajnost ( $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Tukey testom) je određena u poređenju sa krivom za kontrolnu grupu.



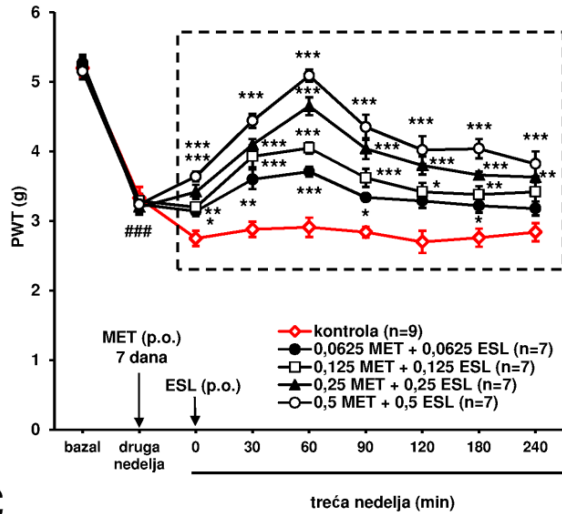
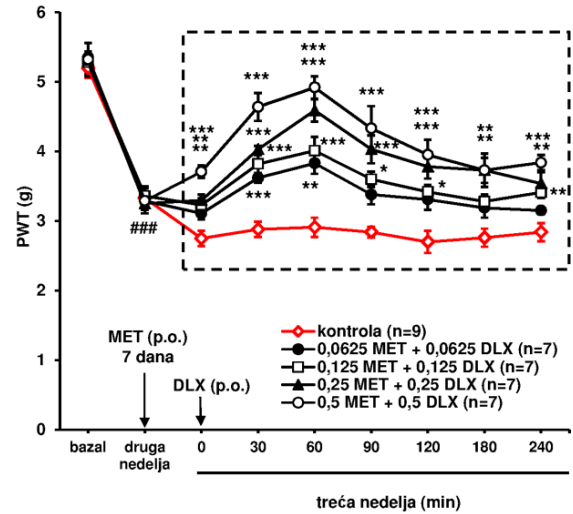
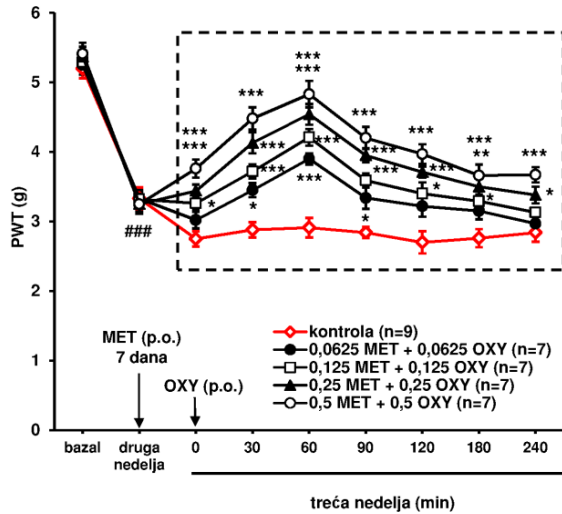


**Slika 4.28.** Krive odnosa log doze i antihiperalgezijskog efekta metformina (MET), eslikarbazepin acetata (ESL), duloksetina (DLX), oksikodona (OXY) i vitamina B<sub>12</sub> (OHB12) u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Tačke predstavljaju srednje vrednosti maksimalnih antihiperalgezijskih efekata (%AH) ± standardna greška, određenih u 5-8 dijabetičnih miševa.

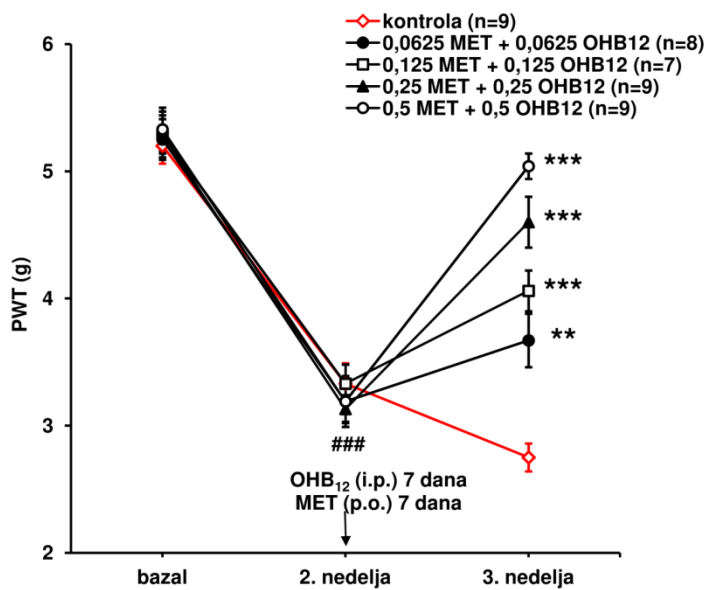
#### 4.5.2.2. Efekti dvokomponentnih kombinacija metformina i standardnih/alternativnih analgetika u modelu bolne dijabetesne neuropatije, i utvrđivanje tipa interakcije (izoblografska analiza)

Kombinacije metformin i ESL/duloksetina/oksikodona/vitamina B<sub>12</sub> kada su primenjene u dozama koje odgovaraju fiksnim udelima njihovih srednjih efektivnih doza (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2 ED<sub>50</sub>) su proizvele značajan i dozno-zavisan antihiperalgezijski efekat u modelu bolne dijabetesne neuropatije (**Slika 4.29, A-C i Slika 4.30**). U ovim eksperimentima metformin i vitamin B<sub>12</sub> su primenjivani svakodnevno tokom 7 dana (počev od druge nedelje nakon indukcije dijabetesa), a ESL/duloksetin/oksikodon su primenjeni u pojedinačnoj dozi, u trećoj nedelji nakon indukcije dijabetesa. Dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima je pokazala značajan uticaj vrste tretmana i vremena na parametar PWT koji je izmeren pomoću *Von Frey* aparata (sve  $P < 0,001$  za oba faktora i sve četiri ispitane kombinacije), kao i značajnu interakciju (sve  $P < 0,001$  za sve četiri ispitane kombinacije). Dodatnom analizom podataka primenom jednofaktorske ANOVA-e, utvrdili smo da u svim vremenskim tačkama u trećoj nedelji nakon indukcije dijabetesa tretman značajno povećao parametar PWT u odnosu na kontrolne vrednosti (sve  $P < 0,001$  za sve četiri ispitane kombinacije). Sve kombinacije sa akutnim tretmanima su postigle maksimalni antihiperalgezijski efekat u 60 min nakon primene ESL/duloksetina/oksikodona. Maksimalni antihiperalgezijski efekti su bili:

- 22,6-93,9% za kombinaciju metformin-ESL,
- 24,8-81,5% za kombinaciju metformin-duloksetin,
- 29,4-75,2% za kombinaciju metformin-oksikodon i
- 22,8-83,2% za kombinaciju metformin-vitamin B<sub>12</sub>.

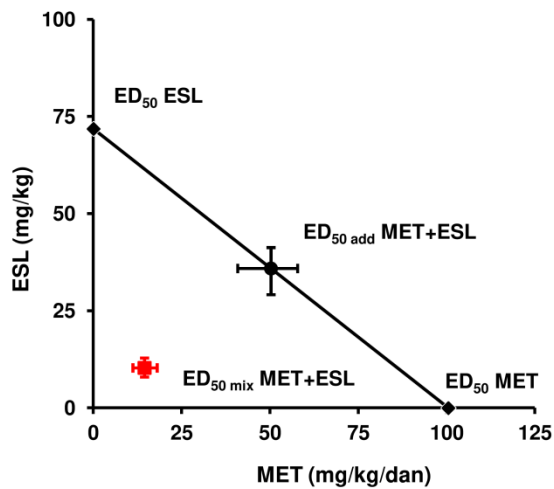
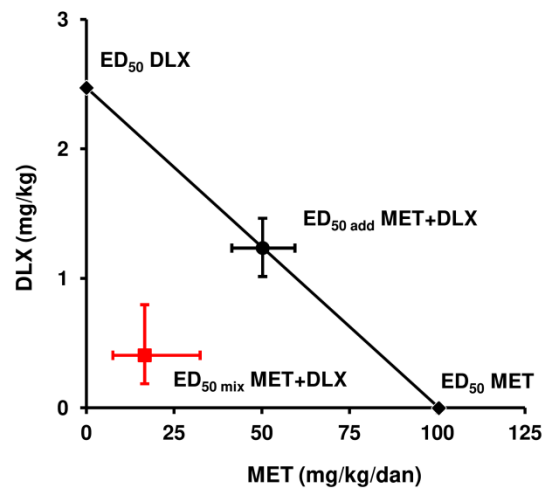
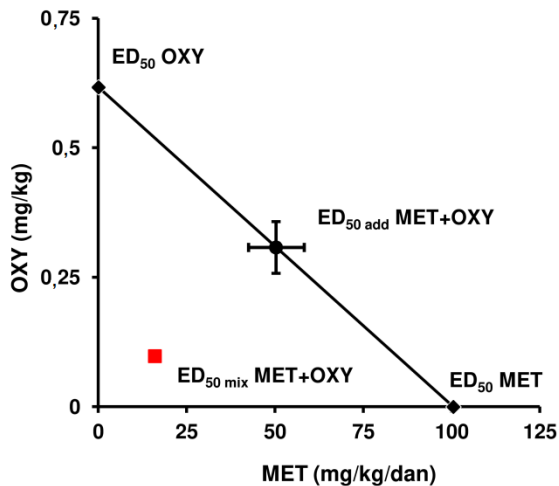
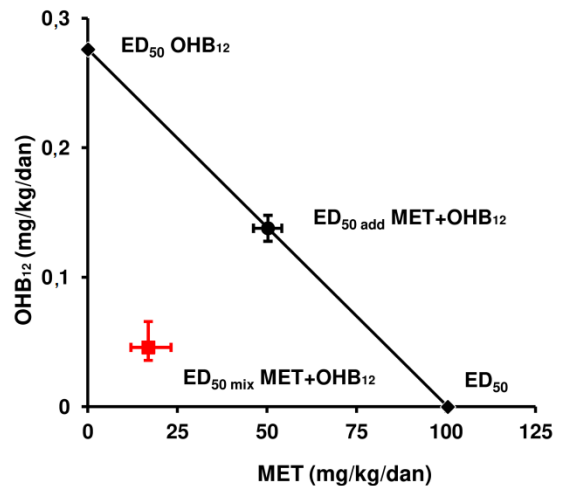
**A****B****C**

**Slika 4.29.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta kombinacija metformina i eslikarbazepin acetata (MET+ESL) (A), duloksetina (MET+DLX) (B) i oksikodona (MET+OXY) (C) u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Rezultati su izraženi kao mehanički prag povlačenja šape (engl. *Paw Withdrawal Threshold* - PWT) u gramima, pre (bazal) i posle indukcije dijabetesa (u 2. i 3. nedelji). U svim eksperimentalnim grupama je PWT vrednost u 2. nedelji bila značajno manja, nego bazalna PWT vrednost pre indukcije dijabetesa ( $###P < 0,001$ ). MET je primenjivan oralno (p.o.) tokom 7 dana, počev od 2. nedelje nakon indukcije dijabetesa, a ESL, DLX i OXY p.o. u pojedinačnoj dozi u 3. nedelji nakon indukcije dijabetesa (označeno strelicama). Lekovi su primenjivi u dozama koje odgovaraju fiksnim udelima njihovih  $ED_{50}$  vrednosti ( $1/16 = 0,0625$ ;  $1/8 = 0,125$ ;  $1/4 = 0,25$ ;  $1/2 = 0,5$ ). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) PWT (g). Statistička značajnost ( $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Tukey testom) je određena u poređenju sa krivom za kontrolnu grupu.



**Slika 4.30.** Antihiperalgezijski efekat kombinacije metformina i vitamina B<sub>12</sub> (MET+OHB12) u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Rezultati su izraženi kao mehanički prag povlačenja šape (engl. *Paw Withdrawal Threshold* - PWT) u gramima, pre (bazal) i posle indukcije dijabetesa (u 2. i 3. nedelji). U svim eksperimentalnim grupama je PWT vrednost u 2. nedelji bila značajno manja, nego bazalna PWT vrednost pre indukcije dijabetesa (###*P* < 0,001). MET je primenjivan oralno (p.o.), a OHB12 intraperitonealno (i.p.) tokom 7 dana, počev od 2. nedelje nakon indukcije dijabetesa (označeno strelicom). Lekovi su primenjeni u dozama koje odgovaraju fiksnim udelima njihovih ED<sub>50</sub> vrednosti (1/16 = 0,0625; 1/8 = 0,125; 1/4 = 0,25; 1/2 = 0,5). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost (± standardna greška) PWT (g). Statistička značajnost (\*\**P* < 0,01; \*\*\**P* < 0,001; jednofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Tukey testom) je određena u poređenju sa krivom za kontrolnu grupu.

U Tabeli 4.4. prikazane su ED<sub>50 mix</sub> i ED<sub>50 add</sub> vrednosti za dvokomponentne kombinacije metformina i ESL/duloksetina/oksikodona/vitamina B<sub>12</sub> u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Za sve ispitane kombinacije ED<sub>50 mix</sub> vrednosti su bile značajno manje od ED<sub>50 add</sub> vrednosti (sve *P* < 0,05; modifikovani *t*-test), a indeksi interakcije manji od 1 (Slika 4.31, A-D; Tabela 4.4), što ukazuje da metformin stupa u sinergističku interakciju sa ESL/duloksetinom/oksikodonom/vitaminom B<sub>12</sub> u ovom modelu bola. Na osnovu vrednosti indeksa interakcije (Tabela 4.4), u kombinaciji metformin-ESL smo utvrdili 7-struko smanjenje, a u kombinacijama metformin-duloksetin, metformin-oksikodon i metformin-vitamin B<sub>12</sub> 6-ostruko smanjenje doza lekova kada su primenjeni u kombinaciji u poređenju sa dozama lekova koje su potrebne da proizvedu isti nivo efekta nakon pojedinačne primene. Takođe, 95% intervali poverenja ED<sub>50 mix</sub> i ED<sub>50 add</sub> vrednosti (prikazano na izobologramima) za kombinacije metformina i analgetika se ne preklapaju, što je takođe potvrda sinergističke prirode interakcija između ovih lekova (Slika 4.31, A-D).

**A****B****C****D**

**Slika 4.31.** Izoblogrami za kombinacije metformina i eslikarbazepin acetata (MET+ESL) (A), duloksetina (MET+DLX) (B), oksikodona (MET+OXY) (C) i vitamina B<sub>12</sub> (MET+OHB<sub>12</sub>) (D) u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Na osama su prikazane ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova. Prava linija koja povezuje ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova je linija aditivnosti. Tačka na ovoj liniji je teorijska aditivna ED<sub>50</sub> (ED<sub>50</sub> add). Za sve kombinacije ED<sub>50</sub> add vrednosti su bile značajno manje od ED<sub>50</sub> mix vrednosti (eksperimentalna ED<sub>50</sub> vrednost kombinacije) što ukazuje na sinergističku interakciju između lekova u ovim kombinacijama ( $P < 0,05$ ; modifikovani  $t$ -test).

**Tabela 4.4.** Parametri izoblografske analize za kombinacije metformina i analgetika u modelu bolne dijabetesne neuropatije

Lekovi	ED <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± SEM (95% interval poverenja)		
<i>metformin</i>	<b>100,4 ± 7,6 mg/kg</b> (55,1 – 130,3 mg/kg)		
<i>eslikarbazepin acetat (ESL)</i>	<b>71,9 ± 10,1 mg/kg</b> (14,8 – 189,9 mg/kg)		
<i>duloksetin</i>	<b>2,5 ± 0,4 mg/kg</b> (0,7 – 4,8 mg/kg)		
<i>oksikodon</i>	<b>0,6 ± 0,1 mg/kg</b> (0,2 – 1,1 mg/kg)		
<i>vitamin B<sub>12</sub></i>	<b>0,3 ± 0,01 mg/kg</b> (0,2 – 0,3 mg/kg)		
Kombinacije lekova	ED <sub>50 add</sub> <sup>b</sup>	ED <sub>50 mix</sub> <sup>c</sup>	γ <sup>d</sup>
<i>metformin + ESL</i>	<b>86,1 ± 6,3 mg/kg</b> (70,0 – 99,1 mg/kg)	<b>24,8 ± 1,3 mg/kg</b> (19,1 – 30,9 mg/kg)*	<b>0,29</b>
<i>metformin + duloksetin</i>	<b>51,5 ± 3,7 mg/kg</b> (39,8 – 58,3 mg/kg)	<b>17,0 ± 2,1 mg/kg</b> (7,7 – 33,2 mg/kg)*	<b>0,33</b>
<i>metformin + oksikodon</i>	<b>50,5 ± 3,2 mg/kg</b> (40,2 – 56,0 mg/kg)	<b>16,0 ± 0,1 mg/kg</b> (15,7 – 16,3 mg/kg)*	<b>0,32</b>
<i>metformin + vitamin B<sub>12</sub></i>	<b>50,4 ± 1,6 mg/kg</b> (46,3 – 54,2 mg/kg)	<b>16,9 ± 1,2 mg/kg</b> (12,0 – 23,2 mg/kg)*	<b>0,33</b>

<sup>a</sup> ED<sub>50</sub> = doza potrebna za postizanje 50% antihiperalgezijskog efekta.

<sup>b</sup> ED<sub>50 add</sub> = teorijska aditivna ED<sub>50</sub> za kombinaciju lekova.

<sup>c</sup> ED<sub>50 mix</sub> = eksperimentalna ED<sub>50</sub> za kombinaciju lekova.

<sup>d</sup> γ = indeks interakcije. Vrednosti oko 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 ukazuju na sinergističku interakciju (Tallarida, 2002).

\*P < 0,05 između ED<sub>50 add</sub> i ED<sub>50 mix</sub> (modifikovani t-test), ukazuje na sinergističku interakciju (Tallarida i sar., 1997).

#### 4.5.2.3. Analiza dužine trajanja antihiperalgezijskih efekata analgetika i dvokomponentnih kombinacija metformina i analgetika u modelu bolne dijabetesne neuropatije

Dužina dejstva akutno primenjenih analgetika (ESL, duloksetina i oksikodona), kao i njihovih dvokomponentnih kombinacija sa metforminom je izražena kao nagib regresionih prava koje opisuju zavisnost parametra  $\Delta$ PIK od maksimalnog antihiperalgezijskog efekta leka/kombinacije lekova (videti *Materijal i metode* za objašnjenje).

Na bazi vrednosti nagiba nakon pojedinačne primene analgetika i primene analgetika u kombinaciji sa metforminom (**Tabela 4.5**), zaključili smo:

- antihiperalgezijski efekat ESL u modelu bolne dijabetesne neuropatije je bio kraći kada je ovaj lek kombinovan sa metforminom, ali je razlika između nagiba bila na granici statističkog značaja ( $P = 0,058$ ; test paralelizma)
- dužina dejstva duloksetina je bila značajno kraća kada je primenjen u kombinaciji sa metforminom, nego nakon pojedinačne primene ( $P = 0,027$ ; test paralelizma),
- dužina dejstva oksikodona je bila nepromenjena kada je primenjen zajedno sa metforminom ( $P = 0,725$ ; test paralelizma).

Dužina dejstva nije računata za metformin i vitamin B<sub>12</sub> u ovom modelu, imajući u vidu da su ova dva leka primenjivana hronično i da je izmeren efekat bio relativno konstantan u toku perioda praćenja u trećoj nedelji nakon indukcije dijabetesa.

**Tabela 4.5.** Parametri dužine antihiperalgezijskih efekata analgetika i dvokomponentnih kombinacija metformina i analgetika u modelu bolne dijabetesne neuropatije

Lek/kombinacija lekova	Nagib <sup>a</sup> ± standardna greška 95% intervali poverenja (IP)	r <sup>b</sup>
<i>eslikarbazepin acetat (ESL)</i>	5,1 ± 1,0 95% IP: 0,9 – 9,2	0,97
<i>duloksetin</i>	5,1 ± 0,6 95% IP: 2,6 - 7,6	0,99
<i>oksikodon</i>	4,2 ± 0,4 95% IP: 2,4 - 6,0	0,99
<i>metformin + ESL</i>	2,8 ± 0,1 <sup>¥</sup> 95% IP: 2,4-3,3	1
<i>metformin + duloksetin</i>	3,0 ± 0,2 <sup>§</sup> 95% IP: 2,1-4,0	0,99
<i>metformin + oksikodon</i>	4,0 ± 0,2 95% IP: 3,2-4,8	1

<sup>a</sup>Nagib %AH- $\Delta$ PIK regresione prave je relativna mera dužine dejstva koje proizvodi lek/kombinacija lekova; tretmani sa značajno većim nagibom imaju duže antihiperalgezijsko dejstvo (Tomić i sar., 2013; Yaksh i sar., 1986).

<sup>b</sup> r = koeficijent korelacije %AH- $\Delta$ PIK regresione prave; vrednosti bliske 1 ukazuju da je dužina dejstva leka/kombinacije lekova dozno-zavisna (Tomić i sar., 2013; Yaksh i sar., 1986).

<sup>¥</sup>  $P = 0,058$ ; u poređenju sa nagibom za ESL nakon individualne primene, test paralelizma.

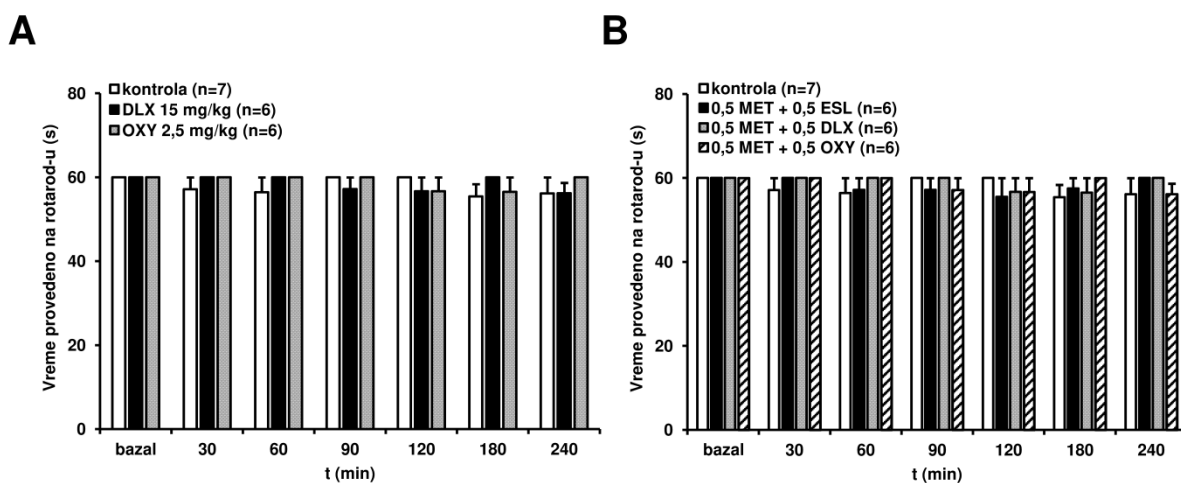
<sup>§</sup>  $P < 0,05$ ; u poređenju sa nagibom za duloksetin nakon individualne primene, test paralelizma.

#### 4.5.2.4. Ispitivanje uticaja analgetika i dvokomponentnih kombinacija metformina i analgetika na motornu spretnost dijabetičnih miševa u *rotarod* testu

Primena najvećih testiranih doza duloksetina (15 mg/kg; p.o.) i oksikodona (2,5 mg/kg; p.o.) nije imala statistički značajan uticaj na motornu spretnost dijabetičnih miševa u *rotarod* testu (sve  $P > 0,05$ ; *Mann-Whitney U-test*) (Slika 4.32A). ESL nije imao značajan uticaj na motornu spretnost dijabetičnih miševa kada je primenjen u dozi od 240 mg/kg p.o. (videti deo 4.1.4. *Uticaj ESL na motoriku eksperimentalnih životinja*).

Uticaj najvećih ispitanih doza metformina i vitamina B<sub>12</sub> na motornu spretnost dijabetičnih životinja nije ispitan, jer su ovi lekovi primenjivani svakodnevno tokom 7 dana, a antihiperalgezijski efekti su procenjeni oko 24h nakon poslednje doze, pa je uticaj na motoriku eksperimentalnih životinja malo verovatan.

Takođe, primena najvećih testiranih doza dvokomponentnih kombinacija metformina sa ESL/duloksetinom/oksikodonom nije značajno narušila motornu spretnost dijabetičnih miševa (sve  $P > 0,05$ ; *Mann-Whitney U-test*) (Slika 4.32B).



**Slika 4.32.** Vremenski tok uticaja pojedinačnih lekova, duloksetina (**DLX**) i oksikodona (**OXY**) (**A**), i dvokomponentnih kombinacija metformina sa eslikarbazepin acetatom (**MET+ESL**), duloksetinom (**MET+DLX**) i oksikodonom (**MET+OXY**) (**B**) na motornu spretnost dijabetičnih miševa, izraženog kao vreme provedeno na *rotarod*-u (s). Bazalno vreme (pre primene tretmana) provedeno *rotarod*-u je određeno pre peroralne primene ESL, DLX, OXY (individualno ili u obliku dvokomponentnih kombinacija sa MET koje su se sastojale od polovine ED<sub>50</sub> svakog leka u kombinaciji). ESL, DLX i OXY su primenjeni akutno u pojedinačnoj dozi, a MET svakodnevno tokom 7 dana. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost ( $\pm$  standardna greška) vremena provedenog na *rotarod*-u. Statistička značajnost (*Mann-Whitney U-test*) je određena u poređenju sa kontrolnom grupom.

## 5. Diskusija

---

### 5.1. Antinociceptivna/antihiperalgezijska efikasnost ESL u eksperimentalnim modelima bola

U okviru ove disertacije pokazali smo da sistemska (peroralna) primena ESL proizvodi dozno-zavisan antinociceptivni/antihiperalgezijski efekat u modelima trigeminalnog (druga faza orofacijalnog formalinskog testa), visceralnog (test grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom) i neuropatskog bola (model bolne dijabetesne neuropatije). ESL je pokazao sličnu efikasnost u ovim modelima bola, ali se razlikovala njegova potentnost između modela. Najmanje doze su bile potrebne za ublažavanje visceralne nocicepcije ( $ED_{50} = 19,3$  mg/kg), a najveće za ublažavanje hiperalgezije u modelu bolne dijabetesne neuropatije ( $ED_{50} = 71,9$  mg/kg za mehaničku i  $ED_{50} = 124,7$  mg/kg za termičku hiperalgeziju). Slično našim rezultatima, prethodne studije su pokazale efikasnost starijih predstavnika dibenzazepina, karbamazepina i/ili okskarbazepina, nakon sistemske primene u modelima trigeminalnog bola (**Foong i sar., 1982**), visceralnog bola (**Stepanović-Petrović i sar., 2008**) i bolne dijabetesne neuropatije (**Kiguchi i sar., 2004; Tomić i sar., 2010a**). Značajno je naglasiti da je efikasnost ESL ispitana na različitim sojevima miševa, imajući u vidu da nakon oralne primene ESL u miševa dolazi do njegove brze i gotovo potpune transformacije do eslikarbazepina, kao i kod ljudi (**Soares-da-Silva i sar., 2015**).

Dodatno, pokazali smo da lokalna periferna primena ESL (s.c. u perinazalnu regiju) na dozno-zavisan način ublažava nociceptivno ponašanje u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Doze ESL koje su korišćene lokalno su bila znatno niže od onih koje su korišćene sistemski ( $ED_{50}$  vrednost za lokalni s.c. put primene je bila preko 60 puta niža od  $ED_{50}$  vrednosti za oralni put primene). Ovaj nalaz može ukazati da se nakon sistemske primene ESL postižu dovoljni nivoi leka u perifernom tkivu, i da postoji doprinos perifernih efekata sveukupnoj antinociceptivnoj efikasnosti ESL. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodnim rezultatima koji su opisali efikasnost karbamazepina i okskarbazepina nakon lokalne periferne primene u modelima inflamatornog bola (**Tomić i sar., 2007; Vučković i sar., 2007**), a naši rezultati su proširili postojeća saznanja podatkom da je lokalni efekat od značaja i za ublažavanje bola u trigeminalnoj regiji.

U eksperimentalnim modelima koji su korišćeni za ispitivanje antinociceptivne/antihiperalgezijske efikasnosti ESL, senzitivizacija nociceptivnih puteva igra značajnu ulogu u razvoju nociceptivnog ponašanja/hiperalgezije. Nociceptivno ponašanje u okviru druge faze formalinskog testa, kao i u testu grčeva nastaje kao posledica direktne stimulacije nociceptora od strane hemijskih algogena (nocicepcija) i periferne inflamacije koja dovodi do senzitivizacije perifernih i centralnih nociceptivnih puteva (**Deraedt i sar., 1980; Giamberardino, 1997; Sawynok i Liu, 2003; Sokolov i sar., 2012**). U modelu bolne dijabetesne neuropatije hiperalgezija prema termičkim i mehaničkim stimulusima nastaje zbog pojačane aktivacije perifernih nociceptora, čija povećana aktivnost dovodi do senzitivizacije centralnih neurona zaduženih za prenošenje informacija o bolnim senzacijama (**Bishnoi i sar., 2011; Fuchs i sar., 2010**). U svim ovim modelima ESL je ispoljio dozno-zavisnu efikasnost. Sa druge strane, ESL je posedovao nižu efikasnost u prvoj fazi orofacijalnog formalinskog testa, za koju se smatra da predstavlja „čist” nociceptivni bol koji nije u vezi sa senzitivizacijom nociceptivnih puteva (**Sawynok i Liu, 2003**). Naši rezultati ukazuju da ESL možda ispoljava svoj efekat prevashodno ublažavanjem senzitivizacije nociceptivnih puteva, kao i da bi mogao da bude značajan u terapiji inflamatornih i neuropatskih bolova u kojima ulogu igra senzitivizacija nociceptivnih puteva (**Woolf, 2004; 2011**). Ova pretpostavka je u skladu sa nalazima iz kliničkih studija, koji su pokazali da srodan dibenzazepin, okskarbazepin, je više efikasan u ublažavanju perifernog neuropatskog bola kod pacijenata sa znacima senzorne hiperekscitabilnosti (tzv. fenotip iritabilnog nociceptora) (**Demant i sar., 2014**).



Doze ESL koje su proizvele značajan antinociceptivni/antihiperalgezijski efekat su bile znatno niže od doza koje su dovodile do narušavanja motorne spretnosti eksperimentalnih životinja u *rotarod* testu. Naši rezultati su pokazali da su ED<sub>50</sub> vrednosti oko 6-10 (u modelu dijabetesne neuropatije), 15 (orofacijalni formalinski test) i 38 puta manje (test grčeva) od TD<sub>50</sub> vrednosti određene u *rotarod* testu. Poređenja radi, u prethodnom radu je pokazano da su ED<sub>50</sub> vrednosti karbamazepina i okskarbazepina u testu grčeva 2 i 15 puta manje od TD<sub>50</sub> vrednosti određene u *rotarod* testu (**Stepanović-Petrović i sar., 2008**). Ovaj nalaz ukazuje na povoljniji bezbednosni profil ESL u odnosu na karbamazepin/okskarbazepin, što je u skladu sa rezultatima iz kliničkih studija koje su pokazale bolju podnošljivost ESL u odnosu na ova dva leka u terapiji epilepsija (**Lawthom i sar., 2018**).

## 5.2. Mehanizam dejstva ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

U okviru ovog rada ispitali smo mehanizam dejstva ESL korišćenjem farmakološkog pristupa. Ovim eksperimentima je pokazano da sistemska primena antagonista serotoninskih 5-HT<sub>1B/1D</sub>,  $\alpha_2$ -adrenergičkih,  $\beta$ -adrenergičkih (neselektivnog i  $\beta_1$ -selektivnog antagoniste), muskarinskih holinergičkih, kanabinoidnih CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> i opioidnih receptora dovodi do dozno-zavisne inhibicije antinociceptivnog efekta ESL u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Suprotno ovim rezultatima, sistemska primena antagonista  $\alpha_1$ -adrenergičkih i nikotinskih holinergičkih receptora nije imala značajan uticaj na antinociceptivni efekat ESL. Slični rezultati su dobijeni kada su antagonisti primenjeni lokalno periferno, u perinazalnu regiju eksperimentalnih životinja. Lokalna periferna primena antagonista serotoninskih 5-HT<sub>1B/1D</sub>,  $\alpha_2$ -adrenergičkih, muskarinskih holinergičkih, kanabinoidnih CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> i opioidnih receptora je inhibirala efekat lokalno periferno primenjenog ESL na dozno-zavisan način (u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa), dok je lokalna periferna primena antagoniste  $\beta_1$ -adrenergičkih receptora bila bez značajnog uticaja na antinociceptivni efekat ESL.

Dostupni eksperimentalni podaci ukazuju da eslikarbazepin (glavni metabolit ESL odgovoran za njegovu farmakološku aktivnost) nema značajan afinitet prema serotoninskim 5-HT<sub>1B</sub> i 5-HT<sub>1D</sub>,  $\alpha_2$ -adrenergičkim, muskarinskim holinergičkim, kanabinoidnim CB<sub>1</sub> i opioidnim receptorima (**Soares-da-Silva i sar. 2015**). Dodatno, starije studije su pokazale da karbamazepin, lek strukturno sličan ESL, nema afinitet za  $\beta$ -adrenergičke receptore (**Marangos i sar. 1983**), što bi moglo da ukaže da ni ESL ni njegov metabolit nemaju značajan afinitet ka vezivanju za ove receptore. Ovi eksperimentalni podaci isključuju mogućnost direktne interakcije ESL sa pomenutim receptorima i ukazuju da ESL utiče na njihovu funkciju indirektno, verovatno modulisanjem endogene serotoninske, adrenergičke, holinergičke, kanabinoidne i opioidne neurotransmisije.

### 5.2.1. Uloga serotoninskih receptora u antinociceptivnom efektu ESL

Sistemska primena antagoniste serotoninskih 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora dovela je do značajne inhibicije antinociceptivnog efekta ESL u modelu trigeminalnog bola. Kao što je ranije naznačeno, malo je verovatno da ESL direktno aktivira ove receptore, međutim postoje eksperimentalni podaci da dibenzazepinski antiepileptici (uključujući i likarbazepin, koji predstavlja racemsku smešu eslikarbazepina i R-likarbazepina) povećavaju oslobađanje serotonina u centralnom nervnom sistemu (**Baf i sar., 1994; Clinckers i sar., 2005; Tanahashi i sar., 2012**). Serotonin ima kompleksan uticaj na bolnu senzaciju, i može imati antinociceptivnu ili pronociceptivnu ulogu u zavisnosti od (pod)tipa receptora na koji deluje i njegove lokalizacije u okviru bolnog puta (**Bardin, 2011; Kayser i sar., 2010**). Od svih opisanih serotoninskih receptora, verovatno najveći značaj za ublažavanje bolne senzacije u trigeminalnoj regiji imaju receptori 5-HT<sub>1B/1D</sub> tipa, koji predstavljaju ciljno mesto dejstva lekova iz grupe triptana (**Ong i Felice, 2018**). Ovi receptori se nalaze na nekoliko lokacija u centralnom

nervnom sistemu koje su uključene u transmisiju ili modulaciju bolne senzacije. Konkretno, za agoniste serotoninskih 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora je pokazano da deluju na nivou sinapse u okviru medularnih dorzalnih rogova gde otežavaju transmisiju nociceptivnih impulsa sa centralnih grana nociceptora (primarnih neurona bolnog puta) na sekundarne neurone koji su smešteni u okviru medularnih dorzalnih rogova (Levy i sar., 2004). Takođe, 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptori su locirani u okviru PAG, za koju je poznato da igra značajnu ulogu u descendentnoj inhibitornoj modulaciji bola (Akerman i sar., 2013; Jeong i sar., 2008). U skladu sa tim, za aktivaciju 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora se pretpostavlja da dovodi do dezinhibicije neurona PAG i do aktiviranja nishodnih inhibitornih puteva koji otežavaju prenošenje nociceptivnih informacija (Akerman i sar., 2013; Jeong i sar., 2008). Imajući u vidu da je za dibenzazepinske antiepileptike takođe pokazano da analgetički efekat ispoljavaju putem efekata na neurone medularnog dorzalnog roga i PAG (Foong i Satoh, 1984b; 1985), moguće da je putem povećanja serotonergičke neurotransmisije na ovim mestima proizvode analgetički efekat u trigeminalnoj regiji koji je posredovan stimulacijom 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora.

Dodatno, pokazali smo da i lokalna periferna primena antagoniste 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora može umanjiti antinociceptivnu aktivnost ESL u orofacijalnom formalinskom testu. Koliko nam je poznato, u literaturi nije opisan uticaj dibenzazepinskih antiepileptika na oslobađanje serotonina na nivou perifernih tkiva, ali kao što je već rečeno jeste za centralni nervni sistem (Baf i sar., 1994; Clinckers i sar., 2005; Tanahashi i sar., 2012), što ukazuje da postoji mogućnost da se sličan efekat viđa i na periferiji. Na nivou perifernog nervnog sistema, serotonin se uglavnom smatra pronociceptivnim medijatorom (Bardin, 2011; Loyd i sar., 2013) i postoje dokazi da periferno oslobađanje serotonina doprinosi nastanku nociceptivnog ponašanja u formalinskom testu, putem aktivacije ekscitatornih 5-HT receptora (5-HT<sub>2</sub> i 5-HT<sub>3</sub>) (Kayser i sar., 2007; Nakajima i sar., 2009; Zeitz i sar., 2002). Međutim, periferni nociceptori neurona trigeminalnih ganglija pored ekscitatornih pronociceptivnih 5-HT receptora, takođe eksprimiraju i inhibitorne receptore (5-HT<sub>1B</sub> i 5-HT<sub>1D</sub>) koji imaju antinociceptivnu ulogu (Loyd i sar., 2011). Možemo pretpostaviti da pod uticajem ESL dolazi do povećanog oslobađanja serotonina, i da u okolnostima kada je prisutna veća koncentracija ovog monoamina na nivou perifernog nervnog sistema dolazi do paralelne aktivacije antinociceptivnih (5-HT<sub>1B/1D</sub>), pored pronociceptivnih 5-HT receptora (što doprinosi ublaženju bolne senzacije). U prilog ovoj hipotezi govore sledeći eksperimentalni podaci: 1) male-umerene koncentracije serotonina aktiviraju trigeminalne nociceptore, dok se pri većim koncentracijama taj efekat gubi (verovatno zbog simultane aktivacije pronociceptivnih i antinociceptivnih receptora) (Loyd i sar., 2011); 2) lokalna periferna primena inhibitora preuzimanja serotonina (fluoksetina), koji povećavaju lokalne nivoe serotonina, može imati dvojak uticaj na nociceptivno ponašanje u formalinskom testu - male doze fluoksetina imaju pronociceptivne efekte (Cervantes-Durán i sar., 2013), dok primena većih doza smanjuje nociceptivno ponašanje u drugoj fazi formalinskog testa (Cervantes-Durán i sar., 2013; Sawynok i sar., 1999).

### 5.2.2. Uloga adrenergičkih receptora u antinociceptivnom efektu ESL

Naši rezultati su u skladu sa prethodnim radovima u kojima je pokazano da sistemska primena antagonista  $\alpha$ -adrenergičkih (neselektivnih i  $\alpha_2$ -selektivnih) i  $\beta$ -adrenergičkih receptora (neselektivnih) može umanjiti antinociceptivne efekte karbamazepina/okskarbazepina u različitim eksperimentalnim modelima bola, uključujući i u modelima trigeminalnog bola (Vučković i sar., 2006; Foong i Satoh, 1984a).

Kao što je ranije naznačeno, malo je verovatno da se ESL direktno vezuje za adrenergičke receptore. Međutim, u literaturi je opisana sposobnost dibenzazepina da povećaju aktivnost noradrenergičkih neurona i nivoe noradrenalina u centralnom nervnom sistemu (Baf i sar., 1994; Olpe i Jones, 1983). Posebno značajan je rad Olpe i Jones-a (1983) koji su pokazali da karbamazepin na dozno-zavisian

način povećava aktivnost *locus coeruleus*-a, glavnog mesta sinteze noradrenalina u okviru centralnog nervnog sistema (**Samuels i Szabadi, 2008**). Ovaj nalaz je od potencijalnog značaja za analgetičku efikasnost dibenzazepinskih antiepileptika, kada se uzmu u obzir činjenice da: *locus coeruleus* inerviše trigeminalna senzorna jedra (uključujući i neurone medularnog dorzalnog roga, koji su zaduženi za obradu nociceptivnih informacija iz orofacijalne regije) i da ima značajnu ulogu u modulisanju trigeminalne nocicepcije (**Samuels i Szabadi, 2008; Tsuruoka i sar., 2003**). Bihevioralne i/ili elektrofiziološke studije su pokazale da aktivacija  $\alpha_2$  i  $\beta$ -adrenergičkih receptora na neuronima medularnih dorzalnih rogova inhibira orofacijalnu nocicepciju, dok  $\alpha_1$ -adrenergički receptori izgleda igraju pronociceptivnu ulogu u ovoj regiji (**Han i sar., 2007; Wang i sar., 2002; 2013**). Ukoliko pretpostavimo da je ESL sposoban da aktivira neurone *locus coeruleus*-a (poput karbamazepina) mogao bi da smanji trigeminalnu nocicepciju, bar delom, putem povećanja noradrenergičke stimulacije  $\alpha_2$  i  $\beta$ -adrenergičkih receptora na neuronima medularnih dorzalnih rogova. Naši rezultati su u skladu sa ovom pretpostavkom, imajući u vidu da je sistemski primena antagonista  $\alpha_2$  i  $\beta$ -adrenergičkih receptora na dozno-zavisani način inhibirala antinociceptivni efekat ESL u modelu trigeminalnog bola, dok je primena  $\alpha_1$ -adrenergičkog antagoniste bila bez efekta.

Takođe smo pokazali da je efekat lokalno periferno primenjenog ESL posredovan perifernim  $\alpha_2$ -adrenergičkim, ali ne i  $\beta_1$ -adrenergičkim receptorima. Koliko nam je poznato, ne postoje eksperimentalni podaci u vezi sposobnosti dibenzazepinskih antiepileptika da menjaju/modulišu periferne nivoe noradrenalina. Međutim, dibenzazepini mogu da povećaju centralnu noradrenergičku neurotransmisiju (**Baf i sar., 1994; Olpe i Jones, 1983**), pa se može pretpostaviti da se sličan efekat viđa i u perifernim tkivima. Naši rezultati su u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da periferni  $\alpha_2$ -adrenergički receptori doprinose antinociceptivnoj efikasnosti karbamazepina/okskarbazepina (**Tomić i sar., 2007; Vučković i sar., 2007**), ali i sa prethodno opisanim ulogama perifernih adrenoceptora u modulisanju nocicepcije. Brojne bihevioralne i/ili neurofiziološke studije su pokazale da aktivacija perifernih  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora proizvodi antinociceptivne efekte u različitim modelima bola (**Pertovaara, 2009**). Dodatno, farmakološka blokada perifernih  $\beta$ -adrenergičkih receptora (uključujući i  $\beta_1$ -adrenoceptora) proizvodi antinociceptivne efekte u modelima orofacijalnog bola (uključujući i orofacijalni formalinski test), što ukazuje da poseduju pronociceptivnu ulogu u ovoj regiji (**Chichorro i sar., 2004; Fávoro-Moreira i sar., 2012**). Samim tim, naš nalaz o izostanku uloge perifernih  $\beta_1$ -adrenoceptora u antinociceptivnom efektu ESL nije neočekivan.

### 5.2.3. Uloga holinergičkih receptora u antinociceptivnom efektu ESL

Na osnovu naših eksperimentalnih rezultata može se zaključiti da je antinociceptivni efekat ESL posredovan muskarinskim, ali ne i nikotinskim holinergičkim receptorima. Prethodno su Foong i Satoh (**1984a**) pokazali da sistemski primena atropina može delimično smanjiti antinociceptivnu efikasnost karbamazepina u modelu trigeminalnog bola (međutim, nivo inhibicije nije dostigao statistički značaj). Koliko nam je poznato, ne postoje eksperimentalni podaci u vezi sposobnosti ESL da utiče na nivo acetilholina u telu. Međutim, za karbamazepin je prethodno pokazano da može povećati nivoe acetilholina u različitim regijama centralnog nervnog sistema (**Mizuno i sar., 2000; Zhu i sar., 2002**). Radovi u kojima je ispitivana uloga muskarinskih receptora u modulaciji trigeminalnog bola su se uglavnom fokusirali na značaj muskarinskih  $M_2$ -receptora i našli su da aktivacija ovih receptora može umanjiti orofacijalnu nocicepciju (**Dussor i sar., 2004; Jeong i sar., 2013**). Konkretno, Jeong i sar. (**2013**) su pokazali da aktivacija presinaptičkih  $M_2$ -receptora (od strane acetilholina ili muskarina) na trigeminalnim primarnim aferentnim vlaknima smanjuje transmisiju nociceptivnih signala putem inhibicije oslobađanja glutamata iz centralnih grana ovih neurona bolnog puta i posledično smanjene aktivacije sekundarnih neurona medularnog dorzalnog roga. Dodatno, u istom radu je pokazano da

primena nikotina (agoniste nikotinskih receptora) nema nikakav uticaj na glutamatergičku neurotransmisiju u okviru medularnog dorzalnog roga.

Dodatno, aktivacija perifernih  $M_2$ -receptora dovodi do dozno-zavisne inhibicije nocicepcije u orofacijalnom formalinskom testu, kao i do inhibicije aktivnosti perifernih nociceptora u orofacijalnim tkivima (**Dussor i sar., 2004**). U navedenoj referenci je takođe pokazano da aktivacija nikotinskih receptora dovodi do povećanja aktivnosti perifernih nociceptora.

Ukoliko pretpostavimo da je ESL, poput karbamazepina, sposoban da poveća nivo acetilholina mogao bi da smanji trigeminalnu nocicepciju, barem delimično, putem aktivacije presinaptičkih  $M_2$ -receptora u okviru medularnog dorzalnog roga, kao i putem aktivacije perifernih  $M_2$ -receptora. Naši rezultati su u skladu sa ovom hipotezom, imajući u vidu da je sistemska i lokalna periferna primena atropina dovela do umanjenja antinociceptivne efikasnosti ESL. Izostanak uticaja mekamilamina je u skladu sa opisanim ulogama nikotinskih receptora na centralnom nivou (**Jeong i sar., 2013**), kao i na perifernom nivou (**Dussor i sar., 2004**), gde je opisano da aktivacija ovih receptora nema uticaja na nociceptivnu transmisiju ili da ima pronociceptivnu ulogu.

#### 5.2.4. Uloga kanabinoidnih receptora u antinociceptivnom efektu ESL

Pokazali smo da sistemska primena antagonista  $CB_1$  i  $CB_2$  receptora na dozno-zavisan način inhibira antinociceptivnu efikasnost ESL u orofacijalnom formalinskom testu. Trenutno postoji malo podataka u vezi interakcije antiepileptika i endokanabinoidnog sistema, i ovo je prvi rad u kome je pokazan značaj kanabinoidnih receptora u nastanku antinociceptivnih efekata jednog antiepileptika. Kao što je ranije navedeno, glavni aktivni metabolit ESL (eslikarbazepin) se ne vezuje u značajnoj meri za  $CB_1$  kanabinoidne receptore (**Soares-da-Silva i sar., 2015**), dok podaci u vezi vezivanja za  $CB_2$  tip receptora ne postoje. Međutim, imajući u vidu da eslikarbazepin nema afinitet za kanabinoidni  $CB_1$  receptor, može se pretpostaviti da se ne vezuje za srodni  $CB_2$  receptor.

Drugi način na koji bi ESL mogao da izazove antinociceptivni efekat posredovan kanabinoidnim receptorima je putem oslobađanja endokanabinoida. Ranije studije su pokazale da povećanje nivoa endokanabinoida farmakološkim putem dovodi do antinociceptivnih efekata u modelima inflamatornog i neuropatskog bola (uključujući i orofacijalni bol), koji su posredovani aktivacijom kanabinoidnih  $CB_1$  i/ili  $CB_2$  receptora (**Hohmann i Rice, 2013; Hossain i sar., 2020; Jhaveri i sar., 2007**). Koliko nam je poznato, u literaturi nije opisan uticaj dibenzazepinskih antiepileptika na endokanabinoidnu neurotransmisiju, ali bi njihova uključenost mogla da se objasni sposobnošću ove grupe antiepileptika da poveća oslobađanje drugih neurotransmitera, poput serotonina i acetilholina. Konkretnije, **Akerman i sar. (2013)** opisali su postojanje funkcionalne interakcije između aktivacije serotoninskih  $5-HT_{1B/1D}$  receptora i kanabinoidnih  $CB_1$  receptora u okviru PAG, kao i da aktivacija oba tipa receptora u ovoj moždanoj regiji može dovesti do inhibicije trigeminalne nocicepcije. Ako se uzmu u obzir raniji rezultati koji ukazuju da dibenzazepini mogu povećati serotonergičku neurotransmisiju (**Baf i sar., 1994; Clinckers i sar., 2005; Tanahashi i sar., 2012**), kao i da serotonin izaziva oslobađanje endokanabinoida u okviru centralnog nervnog sistema (**Burratini i sar., 2014**), moguće je da ESL putem povećanog oslobađanja serotonina i aktivacije serotoninskih receptora (čiji smo značaj pokazali u okviru ove disertacije) dovodi do povećanog stvaranja endokanabinoida i do smanjenja trigeminalne nocicepcije putem aktivacije centralnih kanabinoidnih receptora. Dodatna podrška ovoj hipotezi je i raniji nalaz da dibenzazepini ublažavaju trigeminalnu nocicepciju putem uticaja na PAG (**Foong i Satoh, 1984b**). Slična interakcija je pokazana između muskarinskih receptora i endokanabinoidne neurotransmisije na nivou PAG. Aktivacija muskarinskih  $M_1$  receptora u okviru PAG dovodi do smanjenja GABAergičke neurotransmisije, putem oslobađanja endokanabinoida i aktivacije kanabinoidnih  $CB_1$  receptora (poznato je da je inhibicija GABAergičke neurotransmisije u vezi sa

dezinhibicijom nishodnih puteva iz PAG-a koji dovode do ublaženja bola) (Lau i Vaughan, 2008). Kao što je ranije naznačeno, dibenzazepini su pokazali sposobnost da povećaju oslobađanje acetilholina u različitim regijama centralnog nervnog sistema (Mizuno i sar., 2000; Zhu i sar., 2002), pa bi i na ovaj način mogli da dovode i do povećanog oslobađanja endokanabinoida, i nastanka antinociceptivnih efekata posredovan centralnim kanabinoidnim receptorima.

Dodatno, u okviru ovog rada smo pokazali i da lokalna periferna primena antagonista CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub> kanabinoidnih receptora dovodi do dozno-zavisnog smanjenja antinociceptivnog efekta ESL, što ukazuje na značaj perifernih kanabinoidnih receptora u nastanku antinociceptivnih efekata ESL. Naši eksperimentalni rezultati su u skladu sa prethodno opisanom ulogom perifernih kanabinoidnih receptora. Oba tipa kanabinoidnih receptora su eksprimirana na nivou perifernih nervnih završetaka (uključujući i na perifernim završecima trigeminalnih senzornih neurona) (Hossain i sar., 2020; Wong i sar., 2017) i njihova aktivacija, bilo direktna od strane selektivnih agonista ili indirektna putem inhibicije razgradnje endokanabinoida, je u vezi sa nastankom antinociceptivnih efekata u različitim modelima bola, tako i u modelima trigeminalnog bola (Hossain i sar., 2020; Sánchez Robles i sar., 2012; Wong i sar., 2017).

### 5.2.5. Uloga opioidnih receptora u antinociceptivnom efektu ESL

Sistemska i lokalna periferna primena naloksona dovela je do smanjenja antinociceptivne efikasnosti ESL u modelu trigeminalnog bola. Prethodne studije koje su koristile farmakološki pristup za ispitivanje uloge opioidnog sistema u nastanku antinociceptivnih efekata dibenzazepina su dobile suprotstavljene rezultate (Foong i Satoh, 1984a; Mashimoto i sar., 1998; Stepanović-Petrović i sar., 2007). Postoje brojne metodološke razlike između ovih radova i eksperimentalnog pristupa koji je korišćen u ovoj disertaciji (npr. upotreba različitih eksperimentalnih modela, vrsta životinja, doze naloksona) što otežava direktna poređenja.

Jedan značajan prethodni rezultat koji bi mogao da objasni učešće opioidnog sistema je rad Foong i Satoh-a (1984b). U okviru ovog rada, autori su utvrdili da centralna primena karbamazepina u regiju PAG dovodi do nastanka antinociceptivnog efekta u modelu trigeminalnog bola. Dobro je poznato da je PAG značajan za nishodnu inhibitornu modulaciju bolne senzacije, kao i da je značajno mesto dejstva opioidnih analgetika (Heinricher i Fields, 2013). Smatra se da je antinociceptivni efekat aktivacije PAG neurona, barem delom, posredovan oslobađanjem endogenih opioida na različitim centralnim mestima (Heinricher i Fields, 2013). U skladu sa ovim viđenjem, pokazano je da aktivacija PAG neurona može da inhibira orofacijalnu nocicepciju, kao i da se ovaj efekat može delimično antagonizovati sistemskom primenom naloksona (Sessle i sar., 1981). Ukoliko pretpostavimo da ESL, poput karbamazepina, deluje na neurone PAG i da ima sposobnost da ih aktivira, mogao bi da smanjuje orofacijalnu nocicepciju povećanjem oslobađanja endogenih opioida na centralnim mestima. Jedan od mogućih načina kako bi ESL mogao da aktivira PAG neurone je putem svog, verovatno indirektnog, uticaja na serotoninске 5-HT<sub>1B/1D</sub> i kanabinoidne CB<sub>1</sub> receptore. Oba receptora su prisutna u regiji PAG-a, i za njihovu aktivaciju se pretpostavlja da može da dezinhibira nishodne inhibitorne puteve i smanji trigeminalnu nocicepciju (Akerman i sar., 2013; Jeong i sar., 2008).

Sličan mehanizam bi mogao da omogući ESL da proizvede periferni antinociceptivni efekat posredovan opioidnim receptorima, i da pruži objašnjenje za inhibiciju dejstva ESL pod uticajem lokalno periferno primenjenog naloksona. Konkretno, u ovoj disertaciji je pokazano da je antinociceptivna efikasnost ESL zavisna od perifernih  $\alpha_2$ -adrenergičkih i CB<sub>2</sub> kanabinoidnih receptora. Ovi receptori imaju sposobnost da kontrolišu perifernu opioidnu neurotransmisiju (Busch-Dienstfertig i Stein, 2010), i za njihovu aktivaciju je pokazano da dovodi do perifernog oslobađanja endogenih opioida i do nastanka opioidno-zavisnih antinociceptivnih efekata u različitim modelima

bola/nociceptivnim testovima (Binder i sar., 2004; Ibrahim i sar., 2005; Nakamura i Ferreira, 1988).

### 5.3. Interakcije između ESL i analgetika u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

Dobijeni eksperimentalni rezultati su pokazali da ESL stupa u povoljne interakcije sa nekoliko standardnih i alternativnih analgetika - u aditivnu interakciju sa paracetamolom, propifenazonom i zolmitriptanom, i u sinergističku interakciju sa naproksenom i metoklopramidom. Prethodni eksperimentalni radovi koji su ispitivali interakcije između karbamazepina/okskarbazepina i analgetika u modelima inflamatornog bola su pokazali da ova dva antiepileptika takođe stupaju u povoljne interakcije sa različitim analgeticima (Tomić i sar., 2018). Interesantno je napomenuti da su ove studije pokazale da okskarbazepin stupa u sinergističku interakciju sa paracetamolom, i u različite tipove interakcija sa predstavnicima iz grupe NSAIL (sinergističku sa ibuprofenom i aditivnu sa etodolakom) (Stepanović-Petrović i sar., 2011; Tomić i sar., 2010b), dok smo mi pokazali da ESL stupa u aditivnu interakciju sa paracetamolom i u sinergističku interakciju sa predstavnikom NSAIL (naproksenom). Ove razlike u tipu interakcije mogu biti posledica metodoloških razlika između ove disertacije i citiranih radova (npr. korišćene su različite životinjske vrste i eksperimentalni modeli), ali bi takođe mogle da ukažu na razlike u mehanizmu dejstva između ESL i starijih predstavnika dibenzazepina koje su prethodno opisane (različiti modalitet blokade voltažno-zavisnih Na<sup>+</sup> kanala, sposobnost blokade Ca<sup>2+</sup> kanala T-tipa, odsustvo potencijacije aktivnosti GABA<sub>A</sub> receptora) (Lawthom i sar., 2018).

Interakcija između dva leka može biti posledica različitih mehanizama/mesta dejstva lekova (farmakodinamska interakcija), ili posledica promene farmakokinetičkih osobina pojedinačnih lekova (farmakokinetička interakcija). Mi nismo ispitivali farmakokinetičke interakcije između ESL i standardnih/alternativnih analgetika u okviru ove disertacije, ali pretpostavljamo da je njihov uticaj na vrstu interakcije između ESL i analgetika mali, zbog akutne primene lekova, kratkog vremena trajanja nociceptivnog testa koji je korišćen i relativno niskog potencijala ESL da stupa u farmakokinetičke interakcije (Lawthom i sar., 2018; Shirley i Dhillon 2016). U slučaju farmakodinamskih interakcija, obično se aditivna interakcija između dva leka razvija kao posledica sličnih mehanizama/mesta dejstva, dok su sinergističke interakcije obično rezultat različitih mehanizama/mesta dejstva (Miranda i sar., 2002; Tallarida, 2000). Na osnovu ovih pretpostavki i naših eksperimentalnih rezultata, može se sugerisati da ESL i paracetamol/propifenazon/zolmitriptan smanjuju trigeminalnu nocicepciju putem pretežno sličnih antinociceptivnih mehanizama, dok ESL i naproksen/metoklopramid proizvode antinociceptivne efekte putem različitih, ali komplementarnih mehanizama dejstva.

#### 5.3.1. Interakcija između ESL i paracetamola/propifenazona/naproksena

Za paracetamol, propifenazon i naproksen se smatra da ublažavaju bol smanjenjem sinteze prostaglandina putem inhibicije COX enzima, pri čemu se inhibicija COX-2 izoenzima smatra glavnim mehanizmom analgetičkog dejstva (Brogden, 1986; Brune i Patrignani, 2015; Graham i sar., 2013). U skladu sa ovim viđenjem, eksperimentalni podaci iz modela trigeminalnog bola su pokazali da nakon povrede orofacijalne regije dolazi do povećane ekspresije COX-2 izoenzima na centralnim i perifernim mestima u okviru sistema za transmisiju nociceptivnih informacija (Gao i Duan, 2010; Kooshiki i sar., 2018; Syoji i sar., 2018), kao i da selektivna inhibicija COX-2 na ovim mestima može ublažiti orofacijalnu nocicepciju (Chichooro i sar., 2004; Choi i sar., 2003). Sa druge strane, eslikarbazepin (glavni metabolit ESL odgovoran za farmakološku aktivnost) nema značajan afinitet za COX-2 izoenzim (Soares-da-Silva i sar., 2015). Na bazi ovih eksperimentalnih nalaza, očekivalo bi se da ESL stupa u sinergističke interakcije sa sva tri ispitana standardna analgetika. Međutim, ESL je stupio u

aditivnu interakciju sa paracetamolom/propifenazonom što ukazuje da poseduju slične mehanizme dejstva, i u sinergističku interakciju sa naproksenom što ukazuje na različite mehanizme analgetičkog dejstva.

U skladu sa ovim pretpostavkama, određeni eksperimentalni nalazi su doveli u pitanje značaj inhibicije COX enzima kao mehanizma odgovornog za nastanak analgetičkih efekata paracetamola i propifenazona (Mallet i sar., 2017; Nassini i sar., 2015), i ukazali su da bi drugi mehanizmi mogli biti od većeg značaja. Konkretno, za paracetamol su studije koje su upotrebljavale farmakološke pristupe i/ili *knock-out* životinje pokazale da je antinociceptivni efekat paracetamola u modelima inflamatornog bola zavisao od njegove sposobnosti da povećava centralnu kanabinoidnu i serotonergičku neurotransmisiju (i posledično aktivira kanabinoidne CB<sub>1</sub> i različite tipove serotoninskih receptora) (Klinger-Gratz i sar., 2018; Mallet i sar., 2008; 2017; Tjølsen i sar., 1991). Slično paracetamolu, antinociceptivna svojstva pirazolona su dovedena u vezu sa njihovom sposobnošću da povećaju nishodnu inhibitornu serotonergičku/noradrenergičku neurotransmisiju i aktivacijom različitih serotoninskih i  $\alpha_2/\beta$ -adrenergičkih receptora (Gencer i sar., 2015), kao i sa sposobnošću da aktiviraju centralne opioidne i kanabinoidne mehanizme (Escobar i sar., 2012; Vasquez i sar., 2005). Imajući u vidu da ESL takođe potencijalno smanjuje trigeminalnu nocicepciju modulacijom serotonergičke, adrenergičke, opioidne i kanabinoidne neurotransmisije (što je pokazano u ovoj disertaciji), moglo bi se sugerisati da je zbog ovih sličnosti u mehanizmu dejstva stupio u aditivnu interakciju sa paracetamolom i propifenazonom. Sa druge strane, naproksen uglavnom proizvodi analgetički efekat putem centralne/periferne inhibicije COX-2 izoenzima i sinteze prostaglandina (Brune i Patrignani, 2015) i stupio je u sinergističku interakciju sa ESL, što je u skladu sa izostankom afiniteta eslikarbazepina prema COX-2 (Soares-da-Silva i sar., 2015).

### 5.3.2. Interakcija između ESL i zolmitriptana/metoklopramida

Utvdili smo da ESL intereaguje na aditivan način sa zolmitriptanom i sinergistički sa metoklopramidom, dva leka koja se uobičajeno koriste u terapiji napada migrene (Evers i sar., 2009; Ong i De Felice, 2018; Orr i sar., 2016). Kao što je ranije diskutovano, ovakav rezultat bi mogao da ukaže da ESL i zolmitriptan uglavnom deluju putem sličnog mehanizma dejstva, dok ESL i metoklopramid poseduju različite mehanizme antinociceptivne aktivnosti.

Zolmitriptan je specifični antimigrenski analgetik i deluje kao agonist serotoninskih 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora (Ong i De Felice, 2018). Za triptane se pretpostavlja da proizvode svoje analgetičke efekte kroz uticaj na periferna tkiva, kao i putem delovanja na centralna mesta uključena u transmisiju/modulaciju trigeminalnog bola (poput neurona medularnog dorzalnog roga i PAG) (Ahn i Basbaum, 2005; Akerman i sar., 2013; Jeong i sar., 2008; Levy i sar., 2004). Aditivna priroda interakcije između ESL i zolmitriptana bi mogla da bude posledica činjenice da su slična mesta/mehanizmi dejstva prethodno opisani da doprinose analgetičkim svojstvima dibenzazepinskih antiepileptika. Konkretno, za dibenzazepinske antiepileptike je pokazano da smanjuju trigeminalni bol putem efekata na periferiji (ova disertacija), neuronima medularnog dorzalnog roga (Foong i Satoh, 1985) i PAG (Foong i Satoh, 1984b). Dodatno, prethodni radovi su pokazali da dibenzazepinski antiepileptici (uključujući i likarbazepin) mogu povećati serotonergičku neurotransmisiju, a mi smo u okviru ove disertacije pokazali da su serotoninski 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptori značajni za nastanak antinociceptivnih efekata ESL.

Metoklopramid ima multimodalni mehanizam dejstva i ponaša se kao antagonist serotoninskih 5-HT<sub>3</sub> i dopaminskih D<sub>2</sub> receptora, ali i kao agonist serotoninskih 5-HT<sub>4</sub> receptora (Sanger i Andrews, 2018). Od pomenutih receptorskih efekata, antagonizam na nivou serotoninskih 5-HT<sub>3</sub> receptora najverovatnije doprinosi antinociceptivnim efektima metoklopramida u modelu bola u kome smo

ispitali njegovu efikasnost, imajući u vidu da su prethodni radovi pokazali da farmakološka blokada perifernih i centralnih serotoninских 5-HT<sub>3</sub> receptora (sa odgovarajućim selektivnim antagonistima) dovodi do antinociceptivnih efekata u modelima inflamatornog bola (**Okamoto i sar., 2004; 2005; 2006**). Ove studije mogu pružiti i objašnjenje za sinergističku interakciju između ESL i metoklopramida pokazanu u ovoj disertaciji imajući u vidu da je ovaj mehanizam različit od mehanizama dejstva koje smo opisali za ESL.

U ovoj disertaciji smo takođe ispitali potencijal dvokomponentnih kombinacija ESL-analgetika da dovedu do narušavanja motorne spretnosti eksperimentalnih životinje. Nismo uočili da je potencijal ESL da izazove sedaciju/motornu inkoordinaciju pojačan od strane bilo kog od ispitanih analgetika kada su primenjeni u obliku kombinacije. Ovaj nalaz je od posebnog značaja za kombinacije ESL sa zolmitriptanom i metoklopramidom, dva leka za koje je poznato da imaju izvesni sedativni potencijal (**Dodick i Martin, 2004; Orr i sar., 2016**) i mogli bi teorijski da povećaju intenzitet ovih neželjenih efekata kada se upotrebe zajedno sa ESL u kombinaciji.

Povoljna priroda interakcija između ESL i standardnih/alternativnih analgetika koju smo pokazali u ovoj disertaciji sugerise da bi kombinovana primena ovih lekova mogla da omogući primenu manjih (i potencijalno bezbednijih) doza analgetika za postizanje zadovoljavajućeg ublaženja bola. Dodatno, nalaz sinergističkih interakcija između ESL i naproksena/metoklopramida sugerise da ove kombinacije mogu pružiti efikasniju terapiju kompleksnih bolnih stanja u trigeminalnoj regiji (u poređenju sa monoterapijom), delovanjem na različite mehanizme koji doprinose nastanku bola (**Gilron i sar., 2013; Sessle, 2011; Straube i sar., 2011**).

Takođe, treba napomenuti da kombinacije ESL-analgetika mogu biti od posebne koristi u određenim populacijama pacijenata. Na primer, bolna stanja u trigeminalnoj regiji (poput glavobolja) su veoma prevalentna kod starih pacijenata, i njihova terapija u ovoj populaciji može biti izazovna zbog gastrointestinalnih i/ili kardiovaskularnih rizika koji se viđa prilikom primene većine NSAIL i triptana (**Hershey i Bednarczyk, 2013**). Kombinacije ESL i paracetamola/propifenazona/naproksena bi mogle da budu pogodne farmakološke opcije za lečenje trigeminalnog bola kod starih pacijenata i pacijenata sa kardiovaskularnim komorbiditetima, ako se uzme obzir da ovi analgetici imaju nizak potencijal da dovedu do kardiovaskularnih neželjenih efekata (**Wehling, 2014**). Dodatno, sinergistička priroda interakcije između ESL i naproksena bi mogla da dovede do značajnog smanjenja potrebne doze naproksena za proizvodnju analgezije, što bi moglo da umanjí glavni rizik povezan sa njegovom primenom (gastrointestinalni neželjeni efekti) (**Wehling, 2014**).

#### **5.4. Antihiperalgezijska efikasnost metformina u eksperimentalnim modelima bola**

Pokazali smo da akutno primenjen metformin (50-200 mg/kg; i.p.) na dozno-zavisan način ublažava inflamatornu mehaničku hiperalgeziiju indukovanu karageninom. Najveća testirana doza metformina nije imala značajan uticaj na motoriku pacova u *rotarod* testu, što ukazuje da antihiperalgezijska aktivnost metformina nije bila posledica narušene motorne spretnosti eksperimentalnih životinja. Efikasnost metformina je bila uporediva sa drugim analgeticima koje smo ispitali u ovom modelu (ibuprofen, aspirin, tramadol i pregabalin). Metformin je bio potentniji od aspirina, a manje potentan od ibuprofena, tramadola i pregabalina u ostvarivanju antihiperalgezijskih efekata. Naš nalaz je u skladu sa rezultatima **Russe i sar. (2013)**, koji su pokazali da sistemska primena metformina (100 mg/kg; i.p.) može da smanji inflamatornu mehaničku hiperalgeziiju izazvanu zimosanom, kao i nociceptivno ponašanje u drugoj (inflamatornoj) fazi formalinskog testa. Rezultati ove disertacije su proširili postojeće podatke o antihiperalgezijskim svojstvima metformina u inflamatornim modelima bola, nalazom da je efekat prisutan u širem doznom opsegu, kao i da je dozno-zavisan.



Metformin se ponaša kao aktivator AMP-zavisne protein kinaze (engl. *AMP-activated protein kinase* - AMPK), enzima koji je prisutan u mnogim tkivima u kojima igra značajnu ulogu u regulaciji energetske homeostaze, sinteze proteina i niza drugih procesa. Za ovaj mehanizam je ustanovljeno da je odgovoran za antihiperalgezijsku efikasnost metformina u modelima inflamatornog bola (**Russe i sar., 2013**). Za nekoliko ciljnih mesta je sugerisano da su od značaja za nastanak antinociceptivnih/antihiperalgezijskih efekata AMPK aktivatora, ali je verovatno najviše ispitana uloga mitogenom-aktiviranih protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase* - MAPK) i mTOR kinaza (engl. *mammalian target of rapamycin*) (**Price i Dussor, 2013**). MAPK i mTOR kinaze igraju značajnu ulogu u senzitivaciji nociceptivnih puteva i nastanku inflamatorne hiperalgezije nakon povrede tkiva, putem različitih ne-transkripcionih (npr. modulacija aktivnosti različitih jonskih kanala i membranskih receptora) i transkripcionih mehanizama (indukcija ekspresije pronociceptivnih gena) (**Ji i sar., 2009; Lisi i sar., 2015**). Studije su pokazale da AMPK aktivatori ublažavaju nocicepciju u inflamatornim modelima bola tako što inhibiraju aktivnost MAPK i mTOR kinaze na nivou centralnih ili perifernih nociceptivnih neurona. AMPK aktivator AICAR (5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribozid) je ispoljio antinociceptivni efekat u inflamatornoj fazi formalinskog testa nakon sistemske primene, putem inhibicije aktivnosti MAPK na nivou kičmene moždine (**Russe i sar., 2013**). Periferna primena drugog AMPK aktivatora (rezveratrola) je ublažila mehaničku alodiniju šape indukovanu hirurškom incizijom putem inhibicije aktivnosti mTOR i MAPK kinaza u primarnim senzornim neuronima (**Tillu i sar., 2012**). Inhibicija MAPK i mTOR kinaza bi mogla da bude od značaja i za sposobnost metformina da ublaži karageninsku hiperalgeziju, ako se ima u vidu da povećana aktivnost ovih kinaza doprinosi nastanku hiperalgezije u karageninskom modelu inflamacije (**Bas i sar., 2015; Galan i sar., 2002; Kwon i sar., 2014; Norsted Gregory i sar., 2010**), kao i da selektivni inhibitori različitih MAPK i mTOR kinaza mogu ublažiti karageninsku hiperalgeziju (**Bas i sar., 2015; Obara i sar., 2011; Sammons i sar., 2000**). Imajući u vidu da metformin poseduje sposobnost da prođe krvno-moždanu barijeru (**Labuzek i sar., 2010**), moguće je da nakon sistemske primene izaziva antihiperalgezijski efekat dejstvom na periferne i centralne neurone sistema za transmisiju nociceptivnih informacija.

Pored efikasnosti u modelu somatskog inflamatornog bola, pokazali smo da produžena sedmodnevna primena metformina (75-250 mg/kg/dan; p.o.) dovodi do dozno-zavisnog smanjenja mehaničke hiperalgezije u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Kao i u slučaju inflamatornog bola, antihiperalgezijska efikasnost metformina je bila uporediva sa drugim standardnim/alternativnim analgeticima koje smo ispitali u ovom modelu (ESL, duloksetin, oksikodon i vitamin B<sub>12</sub>). Naši rezultati su u skladu sa prethodnim nalazima o efikasnosti metformina u ublažavanju mehaničke preosetljivosti u modelima bolne dijabetesne neuropatije (**Byrne i sar., 2015; Huang i sar., 2016; Ma i sar., 2015; Wang i sar., 2018**), kao i sa kliničkim podacima da je primena metformina (u kombinaciji sa tiazolidindionima) u vezi sa nižom prevalencijom bolne dijabetesne neuropatije kod pacijenata sa dijabetesom (**Pop-Busui i sar., 2009**).

Slično kao i u slučaju inflamatornog bola, sposobnost metformina da ublaži bolnu preosetljivost u modelima neuropatskog bola je dovedena u vezu sa njegovom sposobnošću da aktivira AMPK. U modelu streptozotocinom-indukovane dijabetesne neuropatije pokazano je da je aktivnost AMPK snižena u ćelijama ganglija dorzalnog roga kičmene moždine i u perifernim nervnim vlaknima, kao i da primena metformina može da dovede do povećane aktivacija AMPK u ovim tkivima (**Hasanvand i sar., 2016; Ma i sar., 2015**). Nishodna ciljna mesta čiju aktivnost moduliše AMPK kako bi ublažila neuropatsku bolnu preosetljivost su slična kao i u slučaju modela inflamatornog bola. Tako je u radu **Melemedjian i sar. (2011)** sposobnost metformina i drugih AMPK aktivatora da ublaže neuropatski bol (izazvan podvezivanjem spinalnih nerava) dovedena u vezu sa njihovim uticajem na aktivnost MAPK i mTOR kinaza. Autori ovog rada su u *in vitro* uslovima pokazali da metformin smanjuje

aktivnost mTOR kinaze u neuronima čija je aktivacija izazvana NGF-om (nervnim faktorom rasta), proteinom koji igra značajnu ulogu u nastanku neuropatske bolne preosetljivosti (uključujući i preosetljivosti koja se viđa u modelu streptozotocinom indukovane dijabetesne neuropatije [Wild i sar., 2007]), dok je drugi AMPK aktivator (AICAR) snizio aktivnost i MAPK i mTOR kinaze. Takođe, u istom radu je pokazano da metformin smanjuje povećanu ekscitabilnost perifernih nociceptora (indukovanu NGF-om) u *in vitro* uslovima. U saglasnosti sa ovim rezultatima, u modelu bolne dijabetesne neuropatije indukovane streptozotocinom je pokazana povećana aktivnost MAPK i mTOR kinaze u ćelijama ganglija dorzalnog roga kičmene moždine (Daulhac i sar., 2006; He i sar., 2016; Purves i sar., 2001) i same kičmene moždine (Ciruela i sar., 2003; Daulhac i sar., 2006; He i sar., 2019), kao i da selektivna inhibicija ovih kinaza može ublažiti mehaničku preosetljivost u ovom modelu neuropatskog bola (Cirueal i sar., 2003; Daulhac i sar., 2006; He i sar., 2016; 2019).

Dodatno, efikasnost metformina u ublažavanju bolne dijabetesne neuropatije je dovedena i u vezu sa njegovom sposobnošću da putem AMPK smanji aktivnost TRPA1 kanala (koji igraju značajnu ulogu u procesu transdukcije nociceptivnih signala različite prirode od strane nociceptora) (Wang i sar., 2018). U ovim eksperimentima je pokazano da metformin u *in vitro* uslovima smanjuje aktivnost TRPA1 kanala (čija aktivnost je bila povećana pod uticajem hiperglikemije), putem smanjenja količine ovih kanala u membrani neurona dorzalnog roga kičmene moždine. Dodatno, u istom radu je pokazano da metformin ublažava mehaničku alodiniju kod *db/db* miševa (model dijabetesa tipa 2), nakon hronične sistemske primene, ali i nakon akutne intraplantarne primene, što sugeriše i perifernu komponentu antihiperalgzijskog efekta. Slični rezultati su dobijeni i u radu Huang i sar. (2016) koji su bolnu preosetljivost kod streptozotocinom indukovane dijabetesne neuropatije doveli u vezu sa aktivacijom TRPA1 kanala od strane metilglioksala (reaktivnog medijatora koji nastaje u procesu glikolize). Metformin je i u ovom radu ublažio mehaničku preosetljivost, ali nakon akutne sistemske primene.

Još jedan mehanizam koji bi potencijalno mogao da doprinosi antihiperalgzijskim efektima metformina u modelu streptozotocinom-indukovanog dijabetesa je smanjenje nivoa glukoze u krvi, i na taj način prevencija oštećenja perifernih nerava od strane hiperglikemije. U literaturi jeste opisana antihiperalgzijska efikasnost metformina u ovom modelu dijabetesa koji se odlikuje insulinskom deficijencijom (npr. Shih i sar., 2014), ali takođe ima radova u kojima nije zabeležen uticaj metformina na glikemiju (npr. Oliveira i sar., 2016). Direktno poređenje rezultata ove disertacije i citiranih radova je otežano zbog postojanja metodoloških razlika između njih (razlike u protokolu indukcije dijabetesa, različit put i/ili dužina primene metformina), pa bi od interesa u budućnosti bilo ispitati efekat sedmodnevne primene metformina na glikemiju korišćenjem eksperimentalne metodologije indukcije dijabetesa koju smo primenili u ovoj disertaciji.

## 5.5. Interakcije između metformina i analgetika u eksperimentalnim modelima bola

### 5.5.1. Interakcije između metformina i analgetika u modelu somatskog inflamatornog bola

Pokazali smo da metformin stupa u sinergističku interakciju sa nekoliko standardnih i alternativnih analgetika (ibuprofenom, aspirinom, tramadolom i pregabalinom) prilikom ublažavanja inflamatorne mehaničke hiperalgzije. U svim ispitanim kombinacijama, postojao je sličan stepen sinergizma, sa otprilike petostrukim smanjenjem doza lekova u kombinaciji u poređenju sa dozama koje su potrebne da proizvedu isti nivo antihiperalgzijskog efekta nakon pojedinačne primene lekova. Koliko nam je poznato, interakcija između metformina i tramadola/pregabalina u eksperimentalnim modelima bola nije ranije ispitana. Međutim, postoje radovi u kojima je ispitana interakcija između metformina i predstavnika NSAID u modelima bola. Ortiz (2011) je u svom radu pokazao da metformin nakon sistemske primene (u sličnom doznom opsegu koji smo mi koristili: 30-180 mg/kg; i.p.) može da

antagonizuje antinociceptivni efekat diklofenaka u drugoj fazi formalinskog testa. Slično, u radu Guzmán-Priego i sar. (2017), sistemska primena metformina je antagonizovala antihiperlgezijski efekat metamizola u modelu termičke hiperlgezije indukovane karageninom. Ove razlike u odnosu na naše rezultate mogu biti posledica upotrebe različitih modela bola, nociceptivnih testova i/ili predstavnika iz grupe NSAIL. U skladu sa tim, u istim radu je utvrđeno da metformin nema značajan uticaj na antinociceptivnu/antihiperlgezijsku efikasnost drugih predstavnika NSAIL (indometacina i ketorolaka). Naši nalazi mogu ukazati da su ibuprofen i aspirin optimalni predstavnici iz grupe NSAIL za lečenje inflamatornih bolova kod pacijenata koji već primenjuju metformin.

Kao što je ranije diskutovano, interakcija između dva leka može biti posledica različitih mehanizama i/ili mesta dejstva (farmakodinamska interakcija) ili posledica izmene farmakokinetičkih svojstava pojedinih lekova (farmakokinetička interakcija). Nalaz sinergističke interakcije između metformina i ispitanih standardnih/alternativnih analgetika se najvećim može objasniti farmakodinamskom interakcijom, imajući u vidu da metformin poseduje mehanizam antihiperlgezijskog dejstva (aktivacija AMPK) koji je različit u odnosu na druge ispitane analgetike.

Ibuprofen i aspirin su neselektivni inhibitori COX-1 i COX-2, koji ublažavaju inflamatornu hiperlgeziju putem inhibicije sinteze prostaglandina. Hiperlgezija indukovana karageninom je u vezi sa povećanom sintezom prostaglandina na mestu zapaljenja/povrede i spinalnom nivou koji zajednički doprinose nastanku hiperlgezije (Dirig i sar., 1998; Guay i sar., 2004; Morris, 2003). Dakle, inhibicija COX izoenzima na perifernim i centralnim mestima može biti od značaja za ublažavanje hiperlgezije od strane ibuprofena i aspirina.

Mehanizam dejstva tramadola uključuje opioidnu (aktivacija  $\mu$ -opioidnih receptora) i ne-opioidnu komponentu (inhibicija preuzimanja serotonina i noradrenalina) (Grond i Sablotzki, 2004). Aktivacija  $\mu$ -opioidnih receptora na centralnim i perifernim mestima bolnog puta može da ublaži karageninom-indukovanu hiperlgeziju (Hylden i sar., 1991; Rezende i sar., 2009; Whiteside i sar., 2005). Dodatno, sposobnost tramadola da inhibira preuzimanje serotonina i noradrenalina može doprineti njegovim analgetičkim svojstvima i pojačati efekat aktivacije  $\mu$ -opioidnih receptora, imajući u vidu da lekovi/supstance koje se ponašaju kao prototipni inhibitori preuzimanja serotonina i noradrenalina ublažavaju karageninsku hiperlgeziju (Jones i sar., 2006).

Pregabalin je selektivni ligand  $\alpha_2\delta$  pomoćne subjedinice voltažno-zavisnih  $\text{Ca}^{2+}$  kanala i proizvodi antinociceptivne/antihiperlgezijske efekte inhibicijom oslobađanja različitih nociceptivnih medijatora (Stahl i sar., 2013). U modelima bola sa perifernom inflamacijom pregabalin smanjuje spinalno oslobađanje glutamata i senzornih neuropeptida (supstance P i CGRP) (Fehrenbacher i sar., 2003; Kumar i sar., 2010). Ovi spinalni medijatori doprinose nastanku karageninske hiperlgezije (Okano i sar., 1998; Yu i sar., 1996), pa bi inhibicija njihovog oslobađanja mogla da bude u osnovi antihiperlgezijskog efekta pregabalina.

Kao što je ranije rečeno, sinergizam između metformina i ispitanih analgetika može biti i posledica farmakokinetičkih interakcija. U okviru ovog rada mi nismo ispitali farmakokinetičke interakcije između metformina i analgetika, pa se one ne mogu pouzdano isključiti. Međutim, metformin ima mali potencijal da stupa u farmakokinetičke interakcije sa drugim lekovima, imajući u vidu da se ne metaboliše u značajnom stepenu, kao i da nije u velikoj meri vezan za proteine plazme (Graham i sar., 2011). U našim eksperimentima, dužina dejstva metformina nije se značajno promenila kada je ovaj antidijabetik primenjen u kombinaciji sa ispitanim analgeticima. Dodatno, dužina dejstva ibuprofena, aspirina i tramadola je takođe bila nepromenjena kada su ovi analgetici kombinovani sa metforminom. U slučaju da farmakokinetička interakcija stoji u osnovi sinergizma, verovatno bi došlo do produženja dejstva lekova kada se primene u kombinaciji. Sa druge strane, našli smo da je antihiperlgezijski

efekat pregabalina bio duži kada je ovaj lek kombinovan sa metforminom u poređenju sa dužinom dejstva nakon individualne primene pregabalina, kao i da je maksimalni efekat kombinacije metformin-pregabalin postignut kasnije u odnosu na vreme kada su pojedinačni lekovi dostigli svoju maksimalnu antihiperalgezijsku efikasnost. Dakle, farmakokinetička interakcija bi mogla da bude dodatni mehanizam koji doprinosi potencijaciji antihiperalgezijskog efekta u kombinaciji metformin-pregabalin.

U pogledu bezbednosti, pokazali smo da najveće testirane doze kombinacije metformin-tramadol i metformin-pregabalin nemaju značajan uticaj na motornu koordinaciju životinja u *rotarod* testu, što ukazuje da prilikom kombinovane primene ne dolazi do potencijacije efekata tramadola i pregabalina na sedaciju i motornu sposobnost. Povećanje učestalosti neželjenih efekata prilikom kombinovane primene metformina i ispitanih analgetika nije verovatno imajući u vidu da su doze pojedinačnih lekova u kombinacijama značajno manje, kao i da komponente kombinacija imaju uglavnom različite profile neželjenih efekata (**ADA, 2020a; Grond i Sablotzki, 2004; Patrignani i Patrono, 2015; Stahl i sar., 2013**). Određeni neželjeni efekti bi možda mogli biti i ublaženi (npr. sposobnost metformina da smanjuje apetit/telesnu masu može ublažiti porast telesne mase koji se vidi prilikom primene pregabalina). Iz svih ovih razloga, ispitane kombinacije bi mogle imati bolji bezbednosni profil nego monoterapija sa navedenim lekovima.

Doze metformina koje su korišćene u modelu somatskog inflamatornog bola (kako individualno [50-200 mg/kg], tako i u kombinacijama [8-63 mg/kg]) odgovaraju humanim dozama od otprilike 80-2000 mg (**Reagan-Shaw sar., 2008**) i obuhvataju doze metformina koje se terapijski koriste u terapiji dijabetesa tipa 2. Ovo može ukazati da kombinacije metformina i analgetika se mogu koristiti za simultano lečenje dijabetesa i inflamatornog bola, kao i da niže doze ispitanih analgetika mogu biti dovoljne za postizanje zadovoljavajuće analgezije. Smanjenje doze aspirina koju smo zabeležili u slučaju kombinacije metformin-aspirin bi moglo da ima i dodatne koristi. Male doze aspirina se široko koriste radi postizanja kardioprotekcije kod pacijenata sa povećanim kardiovaskularnim rizikom (npr. pacijenti oboleli od dijabetesa). Doze aspirina koje smo koristili u kombinaciji sa metforminom (15-122 mg/kg) odgovaraju humanim dozama od otprilike 150-1200 mg (**Reagan-Shaw i sar., 2008**), što delimično odgovara dozama aspirina koje su pokazale kardioprotektivnu efikasnost kod ljudi (**Patrono i sar., 2004**). U skladu sa navedenim, kombinacija metformina i aspirina bi mogla da bude posebno povoljna za pacijente obolele od dijabetesa tipa 2, jer može omogućiti postizanje više terapijskih ciljeva (kontrola glikemije, ublažavanje bola i kardioprotekcija) u ovoj populaciji sa manje lekova.

### **5.5.2. Interakcije između metformina i analgetika u modelu bolne dijabetesne neuropatije**

Naši eksperimentalni rezultati su pokazali da metformin stupa u sinergističku interakciju sa ESL, duloksetinom, oksikodonom i vitaminom B<sub>12</sub> prilikom ublažavanja mehaničke preosetljivosti u modelu bolne dijabetesne neuropatije. U kombinaciji metformina i ESL bilo je oko sedmostruko, dok je u kombinacijama metformina i duloksetina/oksikodona/vitamina B<sub>12</sub> bilo oko šestostruko smanjenje doza pojedinačnih lekova u odnosu na doze koje su potrebne da proizvedu isti nivo efekta nakon individualne primene. Koliko nam je poznato, do sada nisu ispitane interakcije između metformina i analgetika u eksperimentalnim modelima neuropatskog bola. Međutim, postoje radovi u kojima je pokazan povoljan uticaj kombinacija hipolipemika i antidijabetika sa metforminom na druge bihevioralne manifestacije dijabetesne neuropatije (smanjena snaga stiska i osetljivost prema termičkim stimulusima u *hot-plate* testu). U ovim studijama je pokazano da hronična kombinovana primena metformina sa rosuvastatinom, sitagliptinom ili pioglitazonom/glimepiridom dovodi do normalizacije u snazi stiska i/ili termičkom pragu kod dijabetičnih životinja (**Rondi i sar., 2014; Sharma i sar., 2012**).

### 5.5.2.1. Interakcija između metformina i ESL/duloksetina/oksikodona

Kao i u slučaju ispitivanja interakcija metformina i analgetika u modelu somatskog inflamatornog bola, nalaz sinergističkih interakcija između ovog antidiijabetika i ESL, duloksetina ili oksikodona u modelu bolne dijabetesne neuropatije se najvećim delom može objasniti postojanjem povoljne farmakodinamske interakcije između ovih lekova tj. metformin ublažava hiperalgeziju mehanizmom (aktivacija AMPK; videti deo 5.4. *Antihiperalgezijska efikasnost metformina u eksperimentalnim modelima bola*) koji je različit u odnosu na ESL, duloksetin i oksikodon. U prilog farmakodinamskim, a ne farmakokinetičkim interakcijama govori i nalaz da je dužina dejstva akutnih tretmana bila nepromenjena (oksikodon) ili skraćena (ESL i duloksetin), kada su ovi lekovi bili primenjeni u kombinaciji sa metformin (u slučaju farmakokinetičke interakcije očekivalo bi se produženje dejstva akutno primenjenih lekova).

Efikasnost ESL u ublažavanju mehaničke i termičke hiperalgezije u modelu bolne dijabetesne neuropatije može da se dovede u vezu sa osnovnim mehanizmom dejstva ovog antiepileptika, tj. sa njegovom sposobnošću da blokira voltažno-zavisne Na<sup>+</sup> kanale. U modelu streptozotocinom indukovano dijabetesa je pokazano da dolazi do povećanja ekspresije različitih podtipova voltažno-zavisnih Na<sup>+</sup> kanala u neuronima ganglija dorzalnog roga kičmene moždine, kao i da smanjenje aktivnosti ovih kanala (bilo farmakološkim putem ili smanjenjem ekspresije ovih kanala) dovodi do ublaženja bolne preosetljivosti kod dijabetičnih životinja (**Chattopadhyay i sar., 2012; Craner i sar., 2002; Kharatmal i sar., 2015**). Dodatno, mehanizmi za koje smo utvrdili da doprinose analgetičkim svojstvima ESL u modelu trigeminalnog bola bi takođe mogli da budu od značaja za njegovu efikasnost u modelu bolne dijabetesne neuropatije, imajući u vidu da postoje dokazi da povećanje monoaminske (**Kinoshita i sar., 2013; Mixcoatl-Zecuatl i Jolival, 2011; Chen i sar., 2001; Chen i Pan, 2003; Koga i sar., 2004**), kanabinoidne (**Caprioli i sar., 2012; Toth i sar., 2010; Vera i sar., 2012**) i opioidne neurotransmisije (**Nozaki i sar., 2005; 2006; Nozaki i Kamei, 2007**) i/ili aktivacija odgovarajućih receptora za ove neurotransmitere može ublažiti bolnu preosetljivost u modelima dijabetesne neuropatije.

Duloksetin, antidepresiv iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina i noradrenalina, predstavlja jedan od analgetika sa najvišim nivoom dokaza o efikasnosti u ublažavanju dijabetesne neuropatije i prema aktuelnim preporukama se preporučuje za inicijalnu terapiju bolne dijabetesne neuropatije (**ADA, 2020b**). U saglasnosti sa osnovnim mehanizmom dejstva, efikasnost duloksetina u ublažavanju mehaničke preosetljivosti kod životinja sa bolnom dijabetesnom neuropatijom je dovedena u vezu sa povećanjem serotonergičke i noradrenergičke neurotransmisije na spinalnom nivou (**Kinoshita i sar., 2013; Mixcoatl-Zecuatl i Jolival, 2011**).

Oksikodon je predstavnik opioidnih analgetika koji je pokazao kliničku efikasnost u ublažavanju bolne dijabetesne neuropatije (**Gimbel i sar., 2003; Watson i sar., 2003**), a pokazao se i korisnim lekom u kombinovanoj terapiji bolne dijabetesne neuropatije (**Hanna i sar., 2008**). Međutim zbog bezbednosnih rizika prilikom upotrebe opioidnih analgetika, primena oksikodona i drugih opioida se preporučuje samo u slučaju neuspeha bezbednijih lekova poput gabapentinoida i duloksetina (**Pop-Busui i sar., 2017**). U modelu streptozotocinom indukovane dijabetesne neuropatije je pokazano da oksikodon ublažava bolnu preosetljivost aktivacijom  $\mu$  i  $\kappa$  opioidnih receptora na različitim nivoima u okviru sistema za transmisiju nociceptivnih informacija (**Nozaki i sar., 2005; 2006; Nozaki i Kamei, 2007**). Dodatno, pokazano je da oksikodon, za razliku od drugih predstavnika opioida (poput morfina i fentanila koji imaju nižu efikasnost u ovom modelu bola), zadržava značajnu antihiperalgezijsku/antinociceptivnu efikasnost u modelima neuropatskog bola, uključujući i u modelima bolne dijabetesne neuropatije (**Kanbara i sar., 2014; Minami i sar., 2009; Nakamura i**

sar., 2014; Narita i sar., 2008; Nielsen i sar., 2007; Thibault i sar., 2014). Efikasnost oksikodona je u ovim slučajevima dovedena u vezu sa njegovom sposobnošću da aktivira  $\kappa$  opioidne receptore, kao i  $K^+$  kanale (što dovodi do hiperpolarizacije ćelijske mebrane i smanjenja neuronske aktivnosti) i  $GABA_B$  receptore (na spinalnom ili supraspinalnom nivou).

Pored ispitivanja efikasnosti kombinacija metformina i analgetika u ublažavanju hiperalgezije u modelu bolne dijabetesne neuropatije, pokazali smo i da kombinovana primena metformina i ESL/duloksetina/oksikodona ne dovodi do značajnog narušavanja motorne spretnosti dijabetičnih životinja u *rotarod* testu, što ukazuje da metformin ne dovodi do pojačanja sedativnog potencijala ovih standardnih/alternativnih analgetika. Nalaz sinergističkih interakcija između metformina i ispitanih analgetika bi takođe mogao da ukaže da je prilikom kombinovane primene sa metforminom moguće primenjivati manje doze analgetika za postizanje adekvatne analgezije kod dijabetičara, što bi potencijalno dovelo i do smanjenja učestalosti njihovih dozno-zavisnih neželjenih efekata. Ovo bi bilo od posebne važnosti za oksikodon, imajući u vidu da je primena većih doza opioida u vezi sa nastankom ozbiljnih neželjenih efekata (poput adicije, koja se smatra najznačajnijim neželjenim efektom opioida prilikom lečenja bola nemaligne etiologije, fizičke zavisnosti i predoziranja) (Dowell i sar., 2016), kao i da se oksikodon smatra jednim od opioida sa najvećim potencijalom zloupotrebe (naročito prilikom primene većih doza; Remillard i sar., 2019).

### 5.5.2.2. Interakcija između metformina i vitamina $B_{12}$

U okviru ove disertacije smo takođe pokazali da metformin stupa u povoljnu, sinergističku interakciju sa vitaminom  $B_{12}$  u ublažavanju mehaničke hiperalgezije kod dijabetičnih životinja. Kao i u prethodnim slučajevima, pretpostavljamo da su u osnovi ove interakcije različiti, ali komplementarni, mehanizmi antihiperalgzijskog dejstva metformina i ovog vitamina. Vitamin  $B_{12}$  je u studijama u kojima je korišćen model streptozotocinom indukovane dijabetesne neuropatije pokazao efikasnost u ublažavanju različitih strukturnih, elektrofizioloških i molekularnih promena koje su u vezi sa bolnom dijabetesnom neuropatijom (Jian-bo i sar., 2010; Mizukami i sar., 2011; Yagihashi i sar., 1982; Yao i sar., 2016). Ovi eksperimentalni nalazi su uglavnom u skladu sa rezultatima kliničkih studija koje su pokazale da vitamin  $B_{12}$  može ublažiti određene manifestacije dijabetesne neuropatije kod ljudi (Buesing i sar., 2019). Efikasnost vitamina  $B_{12}$  u ublažavanju bolne preosetljivosti u modelima neuropatskog bola (uključujući bolne dijabetesne neuropatije) je dovedena u vezu sa različitim mehanizmima, poput povećanja ekspresije insulinu sličnog faktora rasta 1 u perifernim nervima (engl. *Insulin-like Growth Factor 1* – IGF-1; neurotrofični faktor koji je značajan za održavanje strukture/funkcije aksona i čiji nivoi su sniženi u modelu dijabetesne neuropatije indukovane streptozotocinom) (Jian-bo i sar., 2010), smanjenja aktivnosti NADPH oksidaze i poboljšanja odnosa anti-inflamatornih/proinflamatornih citokina (IL-10 i TNF- $\alpha$ ) u dorzalnim rogovima kičmene moždine (Xu i sar., 2016).

Dodatno, nalaz povoljne interakcije između metformina i vitamina  $B_{12}$  je posebno značajan kada se uzme u obzir da hronična primena metformina može dovesti do deficijencije ovog vitamina (verovatno ometanjem procesa resorpcije) (Aroda i sar., 2016; Out i sar., 2018; Yang i sar., 2019), što je u određenim studijama dovedeno u vezu sa pogoršanjem simptoma neuropatije kod dijabetičnih pacijenata (na ovaj rizik ukazuju i aktuelne američke preporuke za lečenje dijabetesa, ADA 2020a). Prema rezultatima Aroda i sar. (2019), niski ili granično niski nivoi vitamina  $B_{12}$  se viđaju kod oko 20% pacijenata nakon 5 i 9 godina primene metformina (u placebo grupi učestalost je bila oko 9% i 15% u istim vremenskim tačkama). Rizik od ovog neželjenog efekta metformina je dozno i vremenski-zavisan, i ima tendenciju da se češće viđa kod osoba sa vegetarijanskim načinom ishrane (Ting i sar., 2006). Kombinovanom primenom metformina i vitamina  $B_{12}$  bi mogao da se smanji rizik od nastanka deficita ovog vitamina i pogoršanja neuropatije, kao potencijalnog neželjenog efekta metformina.

## 6. Zaključak

---

### 1. Antinociceptivni/antihiperalgezijski efekti ESL u eksperimentalnim modelima bola

ESL je pokazao značajan i dozno-zavisan antinociceptivan/antihiperalgezijski efekat u modelima inflamatornog trigeminalnog i visceralnog bola, kao i modelu bolne dijabetesne neuropatije nakon sistemske primene. Dodatno, ESL je bio efikasan u ublažavanju trigeminalne nocicepcije nakon lokalne periferne primene. Navedeni rezultati ukazuju da bi ESL mogao da bude od značaja u terapiji inflamatornih i neuropatskih bolnih stanja kod ljudi, a nalaz efikasnosti u modelu trigeminalnog bola je posebno vredan, imajući u vidu značaj starijih predstavnika dibenzazepinskih antiepileptika u terapiji bola u trigeminalnoj regiji.

Doze ESL koje su proizvele značajne antinociceptivne/antihiperalgezijske efekte su bile višestruko manje od doza koje dovode do narušavanja motorne spretnosti kod eksperimentalnih životinja, što ukazuje na potencijalno dobar bezbednosni profil ESL kada se koristi kao analgetik.

### 2. Mehanizam dejstva ESL u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

U okviru modela inflamatornog trigeminalnog bola, pokazali smo da je antinociceptivni efekat ESL posredovan perifernim (i verovatno centralnim) 5-HT<sub>1B/1D</sub> serotoninskim,  $\alpha_2$ -adrenergičkim, muskarinskim holinergičkim, CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> kanabinoidnim i opioidnim receptorima, kao i centralnim  $\beta_1$ -adrenergičkim receptorima. Dobijeni rezultati su od značaja za razumevanje mehanizma analgetičkog dejstva ESL (a potencijalno i drugih dibenzazepinskih antiepileptika) u terapiji trigeminalnih bolova.

### 3. Interakcije ESL i standardnih/alternativnih analgetika u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

ESL stupa u povoljne interakcije sa standardnim i alternativnim analgeticima u modelu inflamatornog trigeminalnog bola (aditivnu sa paracetamolom/propifenazonom/zolmitriptanom i sinergističku sa naproksenom/metoklopramidom). Naši rezultati ukazuju da bi kombinovana primena ESL i navedenih analgetika mogla da omogući primenu manjih i potencijalno bezbednijih doza pojedinačnih lekova za postizanje adekvatne analgezije prilikom terapije trigeminalnih bolova. Nalaz sinergističke interakcije između ESL i naproksena/metoklopramida je od posebnog značaja, jer ukazuje da bi kombinacije ovih lekova mogle da budu efikasnije (u poređenju sa monoterapijom) u terapiji kompleksnih bolnih stanja u trigeminalnoj regiji, delovanjem na različite mehanizme koji doprinose nastanku bolne senzacije.

### 4. Antihiperalgezijski efekti metformina u eksperimentalnim modelima bola

U modelu somatskog inflamatornog bola, pokazali smo da sistemska akutna primena metformina dovodi do značajnog i dozno-zavisnog ublaženja mehaničke hiperalgezije, u dozama koje su ekvivalentne humanim dozama metformina koje se koriste u terapiji dijabetesa tipa 2. Dodatno, pokazali smo da produžena sistemska primena metformina ublažava mehaničku hiperalgeziiju u modelu bolne dijabetesne neuropatije, na dozno-zavisan način. Navedeni rezultati su u skladu sa postojećim pretkliničkim i kliničkim podacima o analgetičkim svojstvima metformina, i mogu ukazati na potencijalnu primenu ovog antidijabetika u kliničkom zbrinjavanju pacijenata sa inflamatornim i neuropatskim bolnim stanjima.

## **5. Interakcije metformina i standardnih/alternativnih analgetika u eksperimentalnim modelima bola**

U modelu somatskog inflamatornog bola, pokazali smo da metformin stupa u sinergističke interakcije sa ibuprofenom, aspirinom, tramadolom i pregabalinom. Naši rezultati ukazuju da bi manje (i verovatno bezbednije) doze ibuprofena/aspirina/tramadola/pregabalina mogle da budu dovoljne za postizanje adekvatne analgezije kod pacijenata koji već primenjuju metformin. Kombinacija metformina i aspirina bi mogla da bude posebno korisna, jer bi potencijalno omogućila postizanje više terapijskih ciljeva (kontrola glikemije, kardioprotekcija, analgezija) sa manjim brojem lekova.

Dodatno, metformin intereaguje na sinergistički način sa ESL, duloksetinom, oksikodonom i vitaminom B<sub>12</sub> prilikom ublažavanja mehaničke hiperalgezije u modelu bolne dijabetesne neuropatije. Kao i u slučaju nalaza iz modela inflamatornog somatskog bola, ovi rezultati ukazuju da bi kombinovana primena metformina i navedenih lekova mogla da omogućiti postizanje efikasne analgezije sa manjim dozama pojedinačnih komponenti. Posebno značajno bi bilo potencijalno smanjenje doze oksikodona, imajući u vidu značajne rizike prilikom monoterapije ovim opioidnim analgetikom u većim dozama. Nalaz povoljne interakcije između metformina i vitamina B<sub>12</sub> u ublažavanju bolne dijabetesne neuropatije je takođe značajan, ako se uzme u obzir da hronična (višegodišnja) primena metformina (u većim dozama) može dovesti do deficijencije ovog vitamina, i potencijalno do pogoršanja simptoma neuropatije.



## 7. Literatura

---

1. Afshari K, Dehdashtian A, Haddadi NS, Haj-Mirzaian A, Iranmehr A, Ebrahimi MA, Tavangar SM, Faghir-Ghanesefat H, Mohammadi F, Rahimi N, Javidan AN, Dehpour AR. Anti-inflammatory effects of Metformin improve the neuropathic pain and locomotor activity in spinal cord injured rats: introduction of an alternative therapy. *Spinal Cord*. 2018;56(11):1032-41.
2. Ahn AH, Basbaum AI. Where do triptans act in the treatment of migraine? *Pain*. 2005;115(1-2):1-4.
3. Akerman S, Holland PR, Lasalandra MP, Goadsby PJ. Endocannabinoids in the brainstem modulate dural trigeminovascular nociceptive traffic via CB1 and "triptan" receptors: implications in migraine. *J Neurosci*. 2013;33(37):14869-77.
4. Alcántara Montero A, Sánchez Carnerero CI. Eslicarbazepine acetate for neuropathic pain, headache, and cranial neuralgia: Evidence and experience. *Neurologia*. 2019;34(6):386-95.
5. American Diabetes Association. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* 2020a; 43 (Supplement 1) S98-S110.
6. American Diabetes Association. 11. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* 2020b; 43(Supplement 1): S135-S151.
7. Ansari B, Ghasemi M, Ahmadian M, Khorvash F. The Effect of Pregabalin and Metformin on Subacute and Chronic Radiculopathy. *Adv Biomed Res*. 2018;7:26.
8. Aroda VR, Edelstein SL, Goldberg RB, Knowler WC, Marcovina SM, Orchard TJ, Bray GA, Schade DS, Tempresa MG, White NH, Crandall JP; Diabetes Prevention Program Research Group. Long-term Metformin Use and Vitamin B12 Deficiency in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(4):1754-61.
9. Augusto PSA, Braga AV, Rodrigues FF, Morais MI, Dutra MMGB, Batista CRA, Melo ISF, Costa SOAM, Goulart FA, Coelho MM, Machado RR. Metformin antinociceptive effect in models of nociceptive and neuropathic pain is partially mediated by activation of opioidergic mechanisms. *Eur J Pharmacol*. 2019;858:172497.
10. Baf MH, Subhash MN, Lakshmana KM, Rao BS. Alterations in monoamine levels in discrete regions of rat brain after chronic administration of carbamazepine. *Neurochem Res*. 1994;19(9):1139-43.
11. Bardin L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav Pharmacol*. 2011;22(5-6):390-404.
12. Bas DB, Abdelmoaty S, Sandor K, Codeluppi S, Fitzsimmons B, Steinauer J, Hua XY, Yaksh TL, Svensson CI. Spinal release of tumour necrosis factor activates c-Jun N-terminal kinase and mediates inflammation-induced hypersensitivity. *Eur J Pain*. 2015;19(2):260-70.
13. Bannister K, Dickenson AH. What do monoamines do in pain modulation? *Curr Opin Support Palliat Care*. 2016;10(2):143-8.
14. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-84.
15. Bendtsen L, Evers S, Linde M, Mitsikostas DD, Sandrini G, Schoenen J; EFNS. EFNS guideline on the treatment of tension-type headache - report of an EFNS task force. *Eur J Neurol*. 2010;17(11):1318-25.
16. Bendtsen L, Zakrzewska JM, Abbott J, Braschinsky M, Di Stefano G, Donnet A, Eide PK, Leal P, Maarbjerg S, May A, Nurmikko T, Obermann M, Jensen TS, Cruccu G. European Academy of Neurology guideline on trigeminal neuralgia. *Eur J Neurol*. 2019;26(6):831-49.
17. Binder W, Mousa SA, Sitte N, Kaiser M, Stein C, Schäfer M. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. *Eur J Neurosci*. 2004;20(1):92-100.

18. Bishnoi M, Bosgraaf CA, Abooj M, Zhong L, Premkumar LS. Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. *Mol Pain*. 2011;7:52
19. Brogden RN. Pyrazolone derivatives. *Drugs*. 1986;32 Suppl 4:60-70.
20. Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pain Res*. 2015;8:105-18.
21. Buesing S, Costa M, Schilling JM, Moeller-Bertram T. Vitamin B12 as a Treatment for Pain. *Pain Physician*. 2019;22(1):E45-E52.
22. Bullón P, Alcocer-Gómez E, Carrión AM, Marín-Aguilar F, Garrido-Maraver J, Román-Malo L, Ruiz-Cabello J, Culic O, Ryffel B, Apetoh L, Ghiringhelli F, Battino M, Sánchez-Alcazar JA, Cordero MD. AMPK Phosphorylation Modulates Pain by Activation of NLRP3 Inflammasome. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24(3):157-70.
23. Burattini C, Battistini G, Tamagnini F, Aicardi G. Low-frequency stimulation evokes serotonin release in the nucleus accumbens and induces long-term depression via production of endocannabinoid. *J Neurophysiol*. 2014;111(5):1046-55.
24. Burton MD, Tillu DV, Mazhar K, Mejia GL, Asiedu MN, Inyang K, Hughes T, Lian B, Dussor G, Price TJ. Pharmacological activation of AMPK inhibits incision-evoked mechanical hypersensitivity and the development of hyperalgesic priming in mice. *Neuroscience*. 2017;359:119-29.
25. Busch-Dienstfertig M, Stein C. Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain--basic and therapeutic aspects. *Brain Behav Immun*. 2010;24(5):683-94.
26. Byrne FM, Cheetham S, Vickers S, Chapman V. Characterisation of pain responses in the high fat diet/streptozotocin model of diabetes and the analgesic effects of antidiabetic treatments. *J Diabetes Res*. 2015;2015:752481.
27. Caprioli A, Coccorello R, Rapino C, Di Serio S, Di Tommaso M, Vertechy M, Vacca V, Battista N, Pavone F, Maccarrone M, Borsini F. The novel reversible fatty acid amide hydrolase inhibitor ST4070 increases endocannabinoid brain levels and counteracts neuropathic pain in different animal models. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;342(1):188-95.
28. Centers for Disease Control and Prevention. Arthritis as a Potential Barrier to Physical Activity Among Adults with Diabetes - United States, 2005 and 2007. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5718a3.htm/> (poslednji pristup 12. decembar 2020).
29. Cervantes-Durán C, Rocha-González HI, Granados-Soto V. Peripheral and spinal 5-HT receptors participate in the pronociceptive and antinociceptive effects of fluoxetine in rats. *Neuroscience*. 2013;252:396-409.
30. Chattopadhyay M, Zhou Z, Hao S, Mata M, Fink DJ. Reduction of voltage gated sodium channel protein in DRG by vector mediated miRNA reduces pain in rats with painful diabetic neuropathy. *Mol Pain*. 2012;8:17.
31. Chen SR, Khan GM, Pan HL. Antiallodynic effect of intrathecal neostigmine is mediated by spinal nitric oxide in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Anesthesiology*. 2001;95(4):1007-12.
32. Chen SR, Pan HL. Up-regulation of spinal muscarinic receptors and increased antinociceptive effect of intrathecal muscarine in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307(2):676-81.
33. Chichorro JG, Lorenzetti BB, Zampronio AR. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol*. 2004;141(7):1175-84.
34. Chichorro JG, Porreca F, Sessle B. Mechanisms of craniofacial pain. *Cephalalgia*. 2017;37(7):613-26.

35. Choi HS, Lee HJ, Jung CY, Ju JS, Park JS, Ahn DK. Central cyclooxygenase-2 participates in interleukin-1 beta-induced hyperalgesia in the orofacial formalin test of freely moving rats. *Neurosci Lett.* 2003;352(3):187-90.
36. Chukyo A, Chiba T, Kambe T, Yamamoto K, Kawakami K, Taguchi K, Abe K. Oxaliplatin-induced changes in expression of transient receptor potential channels in the dorsal root ganglion as a neuropathic mechanism for cold hypersensitivity. *Neuropeptides.* 2018;67:95-101.
37. Clinckers R, Smolders I, Meurs A, Ebinger G, Michotte Y. Hippocampal dopamine and serotonin elevations as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant efficacy of oxcarbazepine and 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine. *Neurosci Lett.* 2005;390(1):48-53.
38. Ciruela A, Dixon AK, Bramwell S, Gonzalez MI, Pinnock RD, Lee K. Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain. *Br J Pharmacol.* 2003;138(5):751-6.
39. Craner MJ, Klein JP, Renganathan M, Black JA, Waxman SG. Changes of sodium channel expression in experimental painful diabetic neuropathy. *Ann Neurol.* 2002;52(6):786-92.
40. Das V, Kroin JS, Moric M, McCarthy RJ, Buvanendran A. Antihyperalgesia effect of AMP-activated protein kinase (AMPK) activators in a mouse model of postoperative pain. *Reg Anesth Pain Med.* 2019:rapm-2019-100651.
41. Daulhac L, Mallet C, Courteix C, Etienne M, Duroux E, Privat AM, Eschalier A, Fialip J. Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms. *Mol Pharmacol.* 2006;70(4):1246-54.
42. Delaney JA, Biggs ML, Kronmal RA, Psaty BM. Demographic, medical, and behavioral characteristics associated with over the counter non-steroidal anti-inflammatory drug use in a population-based cohort: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2011;20(1):83-9.
43. Demant DT, Lund K, Vollert J, Maier C, Segerdahl M, Finnerup NB, Jensen TS, Sindrup SH. The effect of oxcarbazepine in peripheral neuropathic pain depends on pain phenotype: a randomised, double-blind, placebo-controlled phenotype-stratified study. *Pain.* 2014;155(11):2263-73.
44. Deraedt R, Jouquey S, Delevallée F, Flahaut M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *Eur J Pharmacol.* 1980;61(1):17-24.
45. Devor M. Neuropathic Pain: Pathophysiological Response of Nerves to Injury In: McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain.* 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013:861-88.
46. Dhillon S. Tramadol/paracetamol fixed-dose combination: a review of its use in the management of moderate to severe pain. *Clin Drug Investig.* 2010;30(10):711-38.
47. Dickenson AH, Kieffer BL. Opioids: Basic Mechanisms. In: McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain.* 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013:413-28.
48. Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL. Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285(3):1031-8.
49. Dodick DW, Martin V. Triptans and CNS side-effects: pharmacokinetic and metabolic mechanisms. *Cephalalgia.* 2004;24(6):417-24.
50. Doğanay Aydin H, Vuralli D, Akçali DT, Bolay H. Metoclopramide inhibits trigeminovascular activation:evidence for effective acute attack treatment in migraine. *Turk J Med Sci.* 2017;47(1):343-7.
51. Dowell D, Haegerich TM, Chou R. CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain--United States, 2016. *JAMA.* 2016;315(15):1624-45.

52. Dussor GO, Helesic G, Hargreaves KM, Flores CM. Cholinergic modulation of nociceptive responses in vivo and neuropeptide release in vitro at the level of the primary sensory neuron. *Pain*. 2004;107(1-2):22-32.
53. El-Fataty BM, Ibrahim OM, Hussien FZ, Mostafa TM. Role of metformin in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in patients with stage III colorectal cancer: randomized, controlled study. *Int J Colorectal Dis*. 2018;33(12):1675-83.
54. Electronic Medicines Compendium (eMC), internet prezentacija. Dostupno na: <https://www.medicines.org.uk/emc/> (poslednji pristup: 9. decembar 2020).
55. Escobar W, Ramirez K, Avila C, Limongi R, Vanegas H, Vazquez E. Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. *Eur J Pain*. 2012;16(5):676-89.
56. Evers S, Afra J, Frese A, Goadsby PJ, Linde M, May A, Sándor PS; European Federation of Neurological Societies. EFNS guideline on the drug treatment of migraine--revised report of an EFNS task force. *Eur J Neurol*. 2009;16(9):968-81.
57. Fávoro-Moreira NC, Parada CA, Tambeli CH. Blockade of  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- and  $\beta$ 3-adrenoceptors in the temporomandibular joint induces antinociception especially in female rats. *Eur J Pain*. 2012;16(9):1302-10.
58. Fehrenbacher JC, Taylor CP, Vasko MR. Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues only after inflammation or activation of protein kinase C. *Pain*. 2003;105(1-2):133-41.
59. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, Bril V, Russell JW, Viswanathan V. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):42.
60. Fernández-Dueñas V, Sánchez S, Planas E, Poveda R. Adjuvant effect of caffeine on acetylsalicylic acid anti-nociception: prostaglandin E2 synthesis determination in carrageenan-induced peripheral inflammation in rat. *Eur J Pain*. 2008;12(2):157-63.
61. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice AS, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2015;14(2):162-73.
62. Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*. 2010;150(3):573-81.
63. Fiorino DF, Garcia-Guzman M. Muscarinic pain pharmacology: realizing the promise of novel analgesics by overcoming old challenges. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(208):191-221.
64. Food and Drug Administration (FDA), internet prezentacija. Dostupno na: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/> (poslednji pristup: 9. decembar 2020).
65. Foong FW, Satoh M, Takagi H. A newly devised reliable method for evaluating analgesic potencies of drugs on trigeminal pain. *J Pharmacol Methods*. 1982;7(4):271-8.
66. Foong FW, Satoh M. Neurotransmitter-blocking agents influence antinociceptive effects of carbamazepine, baclofen, pentazocine and morphine on bradykinin-induced trigeminal pain. *Neuropharmacology*. 1984a;23(6):633-6.
67. Foong FW, Satoh M. The periaqueductal gray is the site of the antinociceptive action of carbamazepine as related to bradykinin-induced trigeminal pain. *Br J Pharmacol*. 1984b;83(2):493-7.
68. Foong FW, Satoh M. Antinociceptive effect of intracisternal carbamazepine evidenced by the bradykinin-induced biting-like response in rats. *Exp Neurol*. 1985;90(1):264-7.
69. Fuchs D, Birklein F, Reeh PW, Sauer SK. Sensitized peripheral nociception in experimental diabetes of the rat. *Pain*. 2010;151(2):496-505.

70. Galan A, Lopez-Garcia JA, Cervero F, Laird JM. Activation of spinal extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 by intraplantar carrageenan in rodents. *Neurosci Lett*. 2002;322(1):37-40.
71. Gao Y, Duan YZ. Increased COX2 in the trigeminal nucleus caudalis is involved in orofacial pain induced by experimental tooth movement. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010;293(3):485-91.
72. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 2020; 396(10258):1204-22.
73. Ge A, Wang S, Miao B, Yan M. Effects of metformin on the expression of AMPK and STAT3 in the spinal dorsal horn of rats with neuropathic pain. *Mol Med Rep*. 2018;17(4):5229-37.
74. Gencer A, Gunduz O, Ulugol A. Involvement of Descending Serotonergic and Noradrenergic Systems and their Spinal Receptor Subtypes in the Antinociceptive Effect of Dipyrone. *Drug Res (Stuttg)*. 2015;65(12):645-9.
75. Giamberardino MA. Recent and forgotten aspects of visceral pain. *Eur J Pain*. 1999;3(2):77-92.
76. Gibbs JL, Hargreaves KM. Acute and Chronic Orofacial and Dental Pain. In: McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013:803-14.
77. Giladi H, Choinière M, Fitzcharles MA, Ware MA, Tan X, Shir Y. Pregabalin for chronic pain: does one medication fit all? *Curr Med Res Opin*. 2015;31(7):1403-11.
78. Gilron I, Jensen TS, Dickenson AH. Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside. *Lancet Neurol*. 2013;12(11):1084-95.
79. Gimbel JS, Richards P, Portenoy RK. Controlled-release oxycodone for pain in diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. *Neurology* 2003;60(6):927-34.
80. Gold MS. Molecular Biology of Sensory Transduction. In: McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013:31-47.
81. Govil N, Parag K, Arora P, Khandelwal H, Singh A; Ruchi. Perioperative duloxetine as part of a multimodal analgesia regime reduces postoperative pain in lumbar canal stenosis surgery: a randomized, triple blind, and placebo-controlled trial. *Korean J Pain*. 2020;33(1):40-7.
82. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*. 2013;21(3):201-32.
83. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50(2):81-98.
84. Grond S, Sablotzki A. Clinical pharmacology of tramadol. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(13):879-923.
85. Guan Z, Hellman J, Schumacher M. Contemporary views on inflammatory pain mechanisms: TRPping over innate and microglial pathways. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-2425.
86. Guay J, Bateman K, Gordon R, Mancini J, Riendeau D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. *J Biol Chem*. 2004;279(23):24866-72.
87. Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009;8(6):403-21.
88. Guzmán-Priego CG, Méndez-Mena R, Baños-González MA, Araiza-Saldaña CI, Castañeda-Corral G, Torres-López JE. Antihyperalgesic Effects of Indomethacin, Ketorolac, and Metamizole in Rats: Effects of Metformin. *Drug Dev Res*. 2017;78(2):98-104.

89. Gyombolai P, Pap D, Turu G, Catt KJ, Bagdy G, Hunyady L. Regulation of endocannabinoid release by G proteins: a paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;353(1-2):29-36.
90. Han SK, Park JR, Park SA, Chun SW, Lee JC, Lee SY, Ryu PD, Park SJ. Noradrenaline inhibits substantia gelatinosa neurons in mice trigeminal subnucleus caudalis via alpha(2) and beta adrenoceptors. *Neurosci Lett.* 2007;411(2):92-7.
91. Hanna M, O'Brien C, Wilson MC. Prolonged-release oxycodone enhances the effects of existing gabapentin therapy in painful diabetic neuropathy patients. *Eur J Pain* 2008;12(6):804-13.
92. Hasanvand A, Amini-Khoei H, Hadian MR, Abdollahi A, Tavangar SM, Dehpour AR, Semiei E, Mehr SE. Anti-inflammatory effect of AMPK signaling pathway in rat model of diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology.* 2016;24(5):207-19.
93. He WY, Zhang B, Xiong QM, Yang CX, Zhao WC, He J, Zhou J, Wang HB. Intrathecal administration of rapamycin inhibits the phosphorylation of DRG Nav1.8 and attenuates STZ-induced painful diabetic neuropathy in rats. *Neurosci Lett.* 2016;619:21-8.
94. He WY, Zhang B, Zhao WC, He J, Zhang L, Xiong QM, Wang J, Wang HB. Contributions of mTOR Activation-Mediated Upregulation of Synapsin II and Neurite Outgrowth to Hyperalgesia in STZ-Induced Diabetic Rats. *ACS Chem Neurosci.* 2019;10(5):2385-96.
95. Heinricher MM, Fields HL. Central Nervous System Mechanisms of Pain Modulation. In: McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain.* 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013:129-42.
96. Heo YA. Eslicarbazepine Acetate: A Review in Focal-Onset Seizures. *CNS Drugs.* 2020;34(9):989-1000.
97. Hershey LA, Bednarczyk EM. Treatment of headache in the elderly. *Curr Treat Options Neurol.* 2013;15(1):56-62.
98. Hohmann AG, Rice ASC. Cannabinoids. In: McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain.* 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013:538-51.
99. Hossain MZ, Ando H, Unno S, Kitagawa J. Targeting Peripherally Restricted Cannabinoid Receptor 1, Cannabinoid Receptor 2, and Endocannabinoid-Degrading Enzymes for the Treatment of Neuropathic Pain Including Neuropathic Orofacial Pain. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1423.
100. Huang Q, Chen Y, Gong N, Wang YX. Methylglyoxal mediates streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain via activation of the peripheral TRPA1 and Nav1.8 channels. *Metabolism.* 2016;65(4):463-74.
101. Hurley RW, Chatterjea D, Rose Feng M, Taylor CP, Hammond DL. Gabapentin and pregabalin can interact synergistically with naproxen to produce antihyperalgesia. *Anesthesiology.* 2002;97(5):1263-73.
102. Hylden JL, Thomas DA, Iadarola MJ, Nahin RL, Dubner R. Spinal opioid analgesic effects are enhanced in a model of unilateral inflammation/hyperalgesia: possible involvement of noradrenergic mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 1991;194(2-3):135-43.
103. Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan TP Jr. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(8):3093-8.
104. International Association for the Study of Pain (IASP), internet prezentacija. Dostupno na: <https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/NewsDetail.aspx?ItemNumber=10475> (poslednji pristup: 9. decembar 2020).
105. Inyang KE, Szabo-Pardi T, Wentworth E, McDougal TA, Dussor G, Burton MD, Price TJ. The antidiabetic drug metformin prevents and reverses neuropathic pain and spinal cord microglial activation in male but not female mice. *Pharmacol Res.* 2019;139:1-16.

106. Jeon HJ, Han SR, Park MK, Yang KY, Bae YC, Ahn DK. A novel trigeminal neuropathic pain model: compression of the trigeminal nerve root produces prolonged nociception in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;38(2):149-58.
107. Jeong HJ, Chenu D, Johnson EE, Connor M, Vaughan CW. Sumatriptan inhibits synaptic transmission in the rat midbrain periaqueductal grey. *Mol Pain*. 2008;4:54.
108. Jeong SG, Choi IS, Cho JH, Jang IS. Cholinergic modulation of primary afferent glutamatergic transmission in rat medullary dorsal horn neurons. *Neuropharmacology*. 2013;75:295-303.
109. Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol*. 2007;152(5):624-32.
110. Ji RR, Gereau RW 4th, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):135-48.
111. Jian-bo L, Cheng-ya W, Jia-wei C, Xiao-lu L, Zhen-qing F, Hong-tai M. The preventive efficacy of methylcobalamin on rat peripheral neuropathy influenced by diabetes via neural IGF-1 levels. *Nutr Neurosci*. 2010;13(2):79-86.
112. Jones PG, Dunlop J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. *Neuropharmacology*. 2007;53(2):197-206.
113. Jones CK, Eastwood BJ, Need AB, Shannon HE. Analgesic effects of serotonergic, noradrenergic or dual reuptake inhibitors in the carrageenan test in rats: evidence for synergism between serotonergic and noradrenergic reuptake inhibition. *Neuropharmacology*. 2006;51(7-8):1172-80.
114. Kanbara T, Nakamura A, Shibasaki M, Mori T, Suzuki T, Sakaguchi G, Kanemasa T. Morphine and oxycodone, but not fentanyl, exhibit antinociceptive effects mediated by G-protein inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in an oxaliplatin-induced neuropathy rat model. *Neurosci Lett*. 2014;580:119-24.
115. Kayser V, Bourgoin S, Viguier F, Michot B, Hamon MD. Toward deciphering the respective roles of multiple 5-HT receptors in the complex serotonin-mediated control of pain. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, eds. *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press, 2010: 185-206.
116. Kayser V, Elfassi IE, Aubel B, Melfort M, Julius D, Gingrich JA, Hamon M, Bourgoin S. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT1A<sup>-/-</sup>, 5-HT1B<sup>-/-</sup>, 5-HT2A<sup>-/-</sup>, 5-HT3A<sup>-/-</sup> and 5-HTT<sup>-/-</sup> knock-out male mice. *Pain*. 2007;130(3):235-48.
117. Kharatmal SB, Singh JN, Sharma SS. Rufinamide Improves Functional and Behavioral Deficits via Blockade of Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channels in Diabetic Neuropathy. *Curr Neurovasc Res*. 2015;12(3):262-8.
118. Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*. 2001;87(1):3-11.
119. Kiguchi S, Imamura T, Ichikawa K, Kojima M. Oxcarbazepine antinociception in animals with inflammatory pain or painful diabetic neuropathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(1-2):57-64.
120. Kinoshita J, Takahashi Y, Watabe AM, Utsunomiya K, Kato F. Impaired noradrenaline homeostasis in rats with painful diabetic neuropathy as a target of duloxetine analgesia. *Mol Pain*. 2013;9:59.
121. Kirkpatrick DR, McEntire DM, Hamsch ZJ, Kerfeld MJ, Smith TA, Reisbig MD, Youngblood CF, Agrawal DK. Therapeutic Basis of Clinical Pain Modulation. *Clin Transl Sci*. 2015;8(6):848-56.
122. Klinger-Gratz PP, Ralvenius WT, Neumann E, Kato A, Nyilas R, Lele Z, Katona I, Zeilhofer HU. Acetaminophen Relieves Inflammatory Pain through CB1 Cannabinoid Receptors in the Rostral Ventromedial Medulla. *J Neurosci*. 2018;38(2):322-34.



123. Koga K, Honda K, Ando S, Harasawa I, Kamiya HO, Takano Y. Intrathecal clonidine inhibits mechanical allodynia via activation of the spinal muscarinic M1 receptor in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2004;505(1-3):75-82.
124. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, Callahan L, Copenhaver C, Dodge C, Felson D, Gellar K, Harvey WF, Hawker G, Herzig E, Kwoh CK, Nelson AE, Samuels J, Scanzello C, White D, Wise B, Altman RD, DiRenzo D, Fontanarosa J, Giradi G, Ishimori M, Misra D, Shah AA, Shmagel AK, Thoma LM, Turgunbaev M, Turner AS, Reston J. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2020;72(2):149-62.
125. Konijnenbelt-Peters J, van der Heijden C, Ekhart C, Bos J, Bruhn J, Kramers C. Metamizole (Dipyrone) as an Alternative Agent in Postoperative Analgesia in Patients with Contraindications for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Pain Pract.* 2017;17(3):402-8.
126. Kooshki R, Abbasnejad M, Esmaeili Mahani S, Raof M, Moeini Aghtaei MM, Dabiri S. Orexin-A inhibits capsaicin-induced changes in cyclooxygenase-2 and brain-derived neurotrophic factor expression in trigeminal nucleus caudalis of rats. *Korean J Pain.* 2018;31(3):174-82.
127. Kremer M, Salvat E, Muller A, Yalcin I, Barrot M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. *Neuroscience.* 2016;338:183-206.
128. Kumar N, Laferriere A, Yu JS, Leavitt A, Coderre TJ. Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. *J Neurochem.* 2010;113(2):552-61.
129. Kwon SG, Roh DH, Yoon SY, Moon JY, Choi SR, Choi HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. Blockade of peripheral P2Y1 receptors prevents the induction of thermal hyperalgesia via modulation of TRPV1 expression in carrageenan-induced inflammatory pain rats: involvement of p38 MAPK phosphorylation in DRGs. *Neuropharmacology.* 2014;79:368-79.
130. Łabuzek K, Suchy D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopień B. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol Rep.* 2010;62(5):956-65.
131. Lau BK, Vaughan CW. Muscarinic modulation of synaptic transmission via endocannabinoid signalling in the rat midbrain periaqueductal gray. *Mol Pharmacol.* 2008;74(5):1392-8.
132. Lawthom C, Peltola J, McMurray R, Dodd E, Villanueva V. Dibenzazepine Agents in Epilepsy: How Does Eslicarbazepine Acetate Differ? *Neurol Ther.* 2018;7(2):195-206.
133. Levy D, Jakubowski M, Burstein R. Disruption of communication between peripheral and central trigeminovascular neurons mediates the antimigraine action of 5HT 1B/1D receptor agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(12):4274-9.
134. Ling YZ, Li ZY, Ou-Yang HD, Ma C, Wu SL, Wei JY, Ding HH, Zhang XL, Liu M, Liu CC, Huang ZZ, Xin WJ. The inhibition of spinal synaptic plasticity mediated by activation of AMP-activated protein kinase signaling alleviates the acute pain induced by oxaliplatin. *Exp Neurol.* 2017;288:85-93.
135. Lisi L, Aceto P, Navarra P, Dello Russo C. mTOR kinase: a possible pharmacological target in the management of chronic pain. *Biomed Res Int.* 2015;2015:394257.
136. Liu Y, Li J, Li H, Shang Y, Guo Y, Li Z, Liu Z. AMP-Activated Protein Kinase Activation in Dorsal Root Ganglion Suppresses mTOR/p70S6K Signaling and Alleviates Painful Radiculopathies in Lumbar Disc Herniation Rat Model. *Spine (Phila Pa 1976).* 2019;44(15):E865-E872.
137. Loprinzi CL, Lacchetti C, Bleeker J, Cavaletti G, Chauhan C, Hertz DL, Kelley MR, Lavino A, Lustberg MB, Paice JA, Schneider BP, Lavoie Smith EM, Smith ML, Smith TJ, Wagner-Johnston N, Hershman DL. Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2020;38(28):3325-48.
138. Loyd DR, Henry MA, Hargreaves KM. Serotonergic neuromodulation of peripheral nociceptors. *Semin Cell Dev Biol.* 2013;24(1):51-7.



139. Loyd DR, Weiss G, Henry MA, Hargreaves KM. Serotonin increases the functional activity of capsaicin-sensitive rat trigeminal nociceptors via peripheral serotonin receptors. *Pain*. 2011;152(10):2267-76.
140. Luccarini P, Childeric A, Gaydier AM, Voisin D, Dallel R. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *J Pain*. 2006;7(12):908-14.
141. Ludman T, Melemedjian OK. Bortezomib and metformin opposingly regulate the expression of hypoxia-inducible factor alpha and the consequent development of chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. *Mol Pain*. 2019;15:1744806919850043.
142. Lueptow LM, Fakira AK, Bobeck EN. The Contribution of the Descending Pain Modulatory Pathway in Opioid Tolerance. *Front Neurosci*. 2018;12:886.
143. Ma J, Yu H, Liu J, Chen Y, Wang Q, Xiang L. Metformin attenuates hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin. *Eur J Pharmacol*. 2015;764:599-606.
144. Macfarlane GJ, Kronisch C, Dean LE, Atzeni F, Häuser W, Fluß E, Choy E, Kosek E, Amris K, Branco J, Dincer F, Leino-Arjas P, Longley K, McCarthy GM, Makri S, Perrot S, Sarzi-Puttini P, Taylor A, Jones GT. EULAR revised recommendations for the management of fibromyalgia. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(2):318-28.
145. Mallet C, Daulhac L, Bonnefont J, Ledent C, Etienne M, Chapuy E, Libert F, Eschalier A. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain*. 2008;139(1):190-200.
146. Mallet C, Eschalier A, Daulhac L. Paracetamol: Update on its Analgesic Mechanism of Action. In: Maldonado C, ed. *Pain Relief: From Analgesics to Alternative Therapies*. Rijeka: InTech, 2017:207-24.
147. Manconi M, Nacher A, Merino V, Merino-Sanjuan M, Manca ML, Mura C, Mura S, Fadda AM, Diez-Sales O. Improving oral bioavailability and pharmacokinetics of liposomal metformin by glycerolphosphate-chitosan microcomplexation. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(2):485-96.
148. Manion J, Waller MA, Clark T, Massingham JN, Neely GG. Developing Modern Pain Therapies. *Front Neurosci*. 2019;13:1370.
149. Mao J, Gold MS, Backonja MM. Combination drug therapy for chronic pain: a call for more clinical studies. *J Pain*. 2011;12(2):157-66.
150. Mao-Ying QL, Kavelaars A, Krukowski K, Huo XJ, Zhou W, Price TJ, Cleeland C, Heijnen CJ. The anti-diabetic drug metformin protects against chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a mouse model. *PLoS One*. 2014;9(6):e100701.
151. Marangos PJ, Post RM, Patel J, Zander K, Parma A, Weiss S. Specific and potent interactions of carbamazepine with brain adenosine receptors. *Eur J Pharmacol*. 1983;93(3-4):175-82.
152. Martikainen IK, Peciña M, Love TM, Nuechterlein EB, Cummiford CM, Green CR, Harris RE, Stohler CS, Zubieta JK. Alterations in endogenous opioid functional measures in chronic back pain. *J Neurosci*. 2013;33(37):14729-37.
153. Mashimoto S, Ushijima I, Suetsugi M, Akimoto T, Watanabe K, Yamada M. Stress-dependent antinociceptive effects of carbamazepine: a study in stressed and nonstressed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1998;22(1):159-68.
154. May A, Leone M, Afra J, Linde M, Sándor PS, Evers S, Goadsby PJ; EFNS Task Force. EFNS guidelines on the treatment of cluster headache and other trigeminal-autonomic cephalalgias. *Eur J Neurol*. 2006;13(10):1066-77.
155. Melemedjian OK, Asiedu MN, Tillu DV, Sanoja R, Yan J, Lark A, Khoutorsky A, Johnson J, Peebles KA, Lepow T, Sonenberg N, Dussor G, Price TJ. Targeting adenosine monophosphate-

- activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. *Mol Pain*. 2011;7:70.
156. Micov A, Tomić M, Pecikoza U, Ugrešić N, Stepanović-Petrović R. Levetiracetam synergises with common analgesics in producing antinociception in a mouse model of painful diabetic neuropathy. *Pharmacol Res*. 2015;97:131-42.
  157. Micov A, Tomić M, Popović B, Stepanović-Petrović R. The antihyperalgesic effect of levetiracetam in an inflammatory model of pain in rats: mechanism of action. *Br J Pharmacol*. 2010;161(2):384-92.
  158. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002;66(6):355-474.
  159. Minami K, Hasegawa M, Ito H, Nakamura A, Tomii T, Matsumoto M, Orita S, Matsushima S, Miyoshi T, Masuno K, Torii M, Koike K, Shimada S, Kanemasa T, Kihara T, Narita M, Suzuki T, Kato A. Morphine, oxycodone, and fentanyl exhibit different analgesic profiles in mouse pain models. *J Pharmacol Sci*. 2009;111(1):60-72.
  160. Miranda HF, Sierralta F, Pinaridi G. Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol*. 2002;135(7):1591-7.
  161. Mixcoatl-Zecuatl T, Jolivalt CG A spinal mechanism of action for duloxetine in a rat model of painful diabetic neuropathy. *Br J Pharmacol*. 2011;164(1):159-69.
  162. Mizukami H, Ogasawara S, Yamagishi S, Takahashi K, Yagihashi S. Methylcobalamin effects on diabetic neuropathy and nerve protein kinase C in rats. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(4):442-50.
  163. Mizuno K, Okada M, Murakami T, Kamata A, Zhu G, Kawata Y, Wada K, Kaneko S. Effects of carbamazepine on acetylcholine release and metabolism. *Epilepsy Res*. 2000;40(2-3):187-95.
  164. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol*. 2003;225:115-21.
  165. Nakajima K, Obata H, Ito N, Goto F, Saito S. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. *Eur J Pain*. 2009;13(5):441-7.
  166. Nakamura A, Fujita M, Ono H, Hongo Y, Kanbara T, Ogawa K, Morioka Y, Nishiyori A, Shibasaki M, Mori T, Suzuki T, Sakaguchi G, Kato A, Hasegawa M. G protein-gated inwardly rectifying potassium (KIR3) channels play a primary role in the antinociceptive effect of oxycodone, but not morphine, at supraspinal sites. *Br J Pharmacol*. 2014;171(1):253-64.
  167. Nakamura M, Ferreira SH. Peripheral analgesic action of clonidine: mediation by release of endogenous enkephalin-like substances. *Eur J Pharmacol*. 1988;146(2-3):223-8.
  168. Narita M, Nakamura A, Ozaki M, Imai S, Miyoshi K, Suzuki M, Suzuki T. Comparative pharmacological profiles of morphine and oxycodone under a neuropathic pain-like state in mice: evidence for less sensitivity to morphine. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(5):1097-112.
  169. Nascimento TD, Yang N, Salman D, Jassar H, Kaciroti N, Bellile E, Danciu T, Koeppe R, Stohler C, Zubieta JK, Ellingrod V, DaSilva AF.  $\mu$ -Opioid Activity in Chronic TMD Pain Is Associated with COMT Polymorphism. *J Dent Res*. 2019;98(12):1324-31.
  170. Naser PV, Kuner R. Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain. *Neuroscience*. 2018;387:135-48.
  171. Nassini R, Fusi C, Materazzi S, Coppi E, Tuccinardi T, Marone IM, De Logu F, Preti D, Tonello R, Chiarugi A, Patacchini R, Geppetti P, Benemei S. The TRPA1 channel mediates the analgesic action of dipyrone and pyrazolone derivatives. *Br J Pharmacol*. 2015;172(13):3397-411.
  172. Nielsen CK, Ross FB, Lotfipour S, Saini KS, Edwards SR, Smith MT. Oxycodone and morphine have distinctly different pharmacological profiles: radioligand binding and behavioural studies in two rat models of neuropathic pain. *Pain*. 2007;132(3):289-300.
  173. Norsted Gregory E, Codeluppi S, Gregory JA, Steinauer J, Svensson CI. Mammalian target of rapamycin in spinal cord neurons mediates hypersensitivity induced by peripheral inflammation. *Neuroscience*. 2010;169(3):1392-402.

174. Nozaki C, Kamei J. Involvement of mu1-opioid receptor on oxycodone-induced antinociception in diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2007;560(2-3):160-2.
175. Nozaki C, Saitoh A, Kamei J. Characterization of the antinociceptive effects of oxycodone in diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2006;535(1-3):145-51.
176. Nozaki C, Saitoh A, Tamura N, Kamei J. Antinociceptive effect of oxycodone in diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2005;524(1-3):75-9.
177. Nozu T, Miyagishi S, Kumei S, Nozu R, Takakusaki K, Okumura T. Metformin inhibits visceral allodynia and increased gut permeability induced by stress in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2019;34(1):186-93.
178. Obara I, Tochiki KK, Géranton SM, Carr FB, Lumb BM, Liu Q, Hunt SP. Systemic inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway reduces neuropathic pain in mice. *Pain.* 2011;152(11):2582-95.
179. Ohtori S, Inoue G, Orita S, Takaso M, Eguchi Y, Ochiai N, Kishida S, Kuniyoshi K, Aoki Y, Ishikawa T, Miyagi M, Kamoda H, Suzukui M, Nakamura J, Kubota G, Sakuma Y, Oikawa Y, Toyone T, Inage K, Sainoh T, Yamauchi K, Takahashi K. Efficacy of combination of meloxicam and pregabalin for pain in knee osteoarthritis. *Yonsei Med J.* 2013;54(5):1253-8.
180. Okamoto K, Imbe H, Tashiro A, Kumabe S, Senba E. Blockade of peripheral 5HT3 receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. *Neurosci Lett.* 2004;367(2):259-63.
181. Okamoto K, Kimura A, Donishi T, Imbe H, Nishie Y, Matsushita H, Tamai Y, Senba E. Contribution of peripheral 5-HT2A or 5-HT3 receptors to Fos expression in the trigeminal spinal nucleus produced by acute injury to the masseter muscle during persistent temporomandibular joint inflammation in rats. *Neuroscience.* 2006;143(2):597-606.
182. Okamoto K, Kimura A, Donishi T, Imbe H, Senba E, Tamai Y. Central serotonin 3 receptors play an important role in the modulation of nociceptive neural activity of trigeminal subnucleus caudalis and nocifensive orofacial behavior in rats with persistent temporomandibular joint inflammation. *Neuroscience.* 2005;135(2):569-81.
183. Okano K, Kuraishi Y, Satoh M. Involvement of spinal substance P and excitatory amino acids in inflammatory hyperalgesia in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1998;76(1):15-22.
184. Oliveira WH, Nunes AK, França ME, Santos LA, Lós DB, Rocha SW, Barbosa KP, Rodrigues GB, Peixoto CA. Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Res.* 2016;1644:149-60.
185. Olpe HR, Jones RS. The action of anticonvulsant drugs on the firing of locus coeruleus neurons: selective, activating effect of carbamazepine. *Eur J Pharmacol.* 1983;91(1):107-10.
186. Ong JJY, De Felice M. Migraine Treatment: Current Acute Medications and Their Potential Mechanisms of Action. *Neurotherapeutics.* 2018;15(2):274-290.
187. Orr SL, Friedman BW, Christie S, Minen MT, Bamford C, Kelley NE, Tepper D. Management of Adults With Acute Migraine in the Emergency Department: The American Headache Society Evidence Assessment of Parenteral Pharmacotherapies. *Headache.* 2016;56(6):911-40.
188. Ortiz MI. Blockade of the antinociception induced by diclofenac, but not of indomethacin, by sulfonyleureas and biguanides. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;99(1):1-6.
189. Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2014;8(2):143-51.
190. Out M, Kooy A, Lehert P, Schalkwijk CA, Stehouwer CDA. Long-term treatment with metformin in type 2 diabetes and methylmalonic acid: Post hoc analysis of a randomized controlled 4.3year trial. *J Diabetes Complications.* 2018;32(2):171-8.
191. Patel R, Dickenson AH. Mechanisms of the gabapentinoids and  $\alpha 2 \delta$ -1 calcium channel subunit in neuropathic pain. *Pharmacol Res Perspect.* 2016;4(2):e00205.

192. Patrignani P, Patrono C. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):422-32.
193. Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3 Suppl):234S-264S.
194. Pertovaara A. Adrenergic Receptors. In: Cairns BE, ed. *Peripheral Receptor Targets for Analgesia: Novel Approaches to Pain Management*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2009: 275-96.
195. Pertovaara A. The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. *Eur J Pharmacol*. 2013;716(1-3):2-7.
196. Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, Sosenko JM, Ziegler D. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2017; 40(1): 136-54.
197. Pop-Busui R, Lu J, Lopes N, Jones TL; BARI 2D Investigators. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and relation to glycemic control therapies at baseline in the BARI 2D cohort. *J Peripher Nerv Syst*. 2009;14(1):1-13.
198. Price TJ, Dussor G. AMPK: An emerging target for modification of injury-induced pain plasticity. *Neurosci Lett*. 2013;557 Pt A:9-18.
199. Purves T, Middlemas A, Agthong S, Jude EB, Boulton AJ, Fernyhough P, Tomlinson DR. A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J*. 2001;15(13):2508-14.
200. Radbruch L, Glaeske G, Grond S, Münchberg F, Scherbaum N, Storz E, Tholen K, Zagermann-Muncke P, Zieglgänsberger W, Hoffmann-Menzel H, Greve H, Cremer-Schaeffer P. Topical review on the abuse and misuse potential of tramadol and tilidine in Germany. *Subst Abus*. 2013;34(3):313-20.
201. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22(3):659-61.
202. Remillard D, Kaye AD, McAnally H. Oxycodone's Unparalleled Addictive Potential: Is it Time for a Moratorium? *Curr Pain Headache Rep*. 2019;23(2):15.
203. Rezende RM, Dos Reis WG, Duarte ID, Lima PP, Bakhle YS, de Francischi JN. The analgesic actions of centrally administered celecoxib are mediated by endogenous opioids. *Pain*. 2009;142(1-2):94-100.
204. Robbins MS, Starling AJ, Pringsheim TM, Becker WJ, Schwedt TJ. Treatment of Cluster Headache: The American Headache Society Evidence-Based Guidelines. *Headache*. 2016;56(7):1093-106.
205. Rondi S, Peddolla R, Venisetty RK. Neuro, cardio, and reno protective activities of rosuvastatin in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats undergoing treatment with metformin and glimepiride. *J Adv Pharm Technol Res*. 2014;5(2):78-83.
206. Russe OQ, Möser CV, Kynast KL, King TS, Stephan H, Geisslinger G, Niederberger E. Activation of the AMP-activated protein kinase reduces inflammatory nociception. *J Pain*. 2013;14(11):1330-40.
207. Rutten K, De Vry J, Robens A, Tzschentke TM, van der Kam EL. Dissociation of rewarding, anti-aversive and anti-nociceptive effects of different classes of anti-nociceptives in the rat. *Eur J Pain*. 2011;15(3):299-305.
208. Sammons MJ, Raval P, Davey PT, Rogers D, Parsons AA, Bingham S. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res*. 2000;876(1-2):48-54.

209. Samuels ER, Szabadi E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Curr Neuropharmacol*. 2008;6(3):235-53.
210. Sanchez-Larsen A, Sopelana D, Diaz-Maroto I, Perona-Moratalla AB, Gracia-Gil J, García-Muñozguren S, Palazón-García E, Segura T. Assessment of efficacy and safety of eslicarbazepine acetate for the treatment of trigeminal neuralgia. *Eur J Pain*. 2018;22(6):1080-7.
211. Sánchez Robles EM, Bagües Arias A, Martín Fontelles MI. Cannabinoids and muscular pain. Effectiveness of the local administration in rat. *Eur J Pain*. 2012;16(8):1116-27.
212. Sanger GJ, Andrews PLR. A History of Drug Discovery for Treatment of Nausea and Vomiting and the Implications for Future Research. *Front Pharmacol*. 2018;9:913.
213. Sawynok J, Esser MJ, Reid AR. Peripheral antinociceptive actions of desipramine and fluoxetine in an inflammatory and neuropathic pain test in the rat. *Pain*. 1999;82(2):149-58.
214. Sawynok J, Liu XJ. The Formalin Test: Characteristics and Usefulness of the Model. *Reviews in Analgesia*. 2003;7(2):145-63.
215. Sessle BJ, Hu JW, Dubner R, Lucier GE. Functional properties of neurons in cat trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). II. Modulation of responses to noxious and nonnoxious stimuli by periaqueductal gray, nucleus raphe magnus, cerebral cortex, and afferent influences, and effect of naloxone. *J Neurophysiol*. 1981;45(2):193-207.
216. Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol*. 2011;97:179-206.
217. Sharma AK, Sharma A, Kumari R, Kishore K, Sharma D, Srinivasan BP, Sharma A, Singh SK, Gaur S, Jatav VS, Sharma P, Srivastava V, Joshi S, Joshi M, Dhakad PK, Kanawat DS, Mishra A, Sharma A, Singh D, Singh RP, Chawda HS, Singh R, Raikwar SK, Kurmi MK, Khatri P, Agarwal A, Munajjam A. Sitagliptin, sitagliptin and metformin, or sitagliptin and amitriptyline attenuate streptozotocin-nicotinamide induced diabetic neuropathy in rats. *J Biomed Res*. 2012;26(3):200-10.
218. Shih CC, Chen MH, Lin CH. Validation of the Antidiabetic and Hypolipidemic Effects of *Clitocybe nuda* by Assessment of Glucose Transporter 4 and Gluconeogenesis and AMPK Phosphorylation in Streptozotocin-Induced Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:705636.
219. Shirley M, Dhillon S. Eslicarbazepine Acetate Monotherapy: A Review in Partial-Onset Seizures. *Drugs*. 2016;76(6):707-17.
220. Silberstein SD, Holland S, Freitag F, Dodick DW, Argoff C, Ashman E; Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Headache Society. Evidence-based guideline update: pharmacologic treatment for episodic migraine prevention in adults: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Headache Society. *Neurology*. 2012;78(17):1337-45.
221. Sisignano M, Parnham MJ, Geisslinger G. Drug Repurposing for the Development of Novel Analgesics. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(3):172-83.
222. Soares-da-Silva P, Pires N, Bonifácio MJ, Loureiro AI, Palma N, Wright LC. Eslicarbazepine acetate for the treatment of focal epilepsy: an update on its proposed mechanisms of action. *Pharmacol Res Perspect*. 2015;3(2):e00124.
223. Sokolov AY, Lyubashina OA, Pantelev SS. Spinal trigeminal neurons demonstrate an increase in responses to dural electrical stimulation in the orofacial formalin test. *J Headache Pain*. 2012;13:75–82.
224. Stahl SM, Porreca F, Taylor CP, Cheung R, Thorpe AJ, Clair A. The diverse therapeutic actions of pregabalin: is a single mechanism responsible for several pharmacological activities? *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(6):332-9.

225. Steinberg GR, Carling D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(7):527-51.
226. Stepanović-Petrović RM, Micov AM, Tomić MA, Kovačević JM, Bošković BD. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. *Anesthesiology.* 2014;120(3):737-50.
227. Stepanovic-Petrovic RM, Tomic MA, Vuckovic SM, Paranos S, Ugresic ND, Prostran MS, Milovanovic S, Boskovic B. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. *Anesth Analg.* 2008;106(6):1897-903.
228. Stepanović-Petrović RM, Tomić MA, Vučković SM, Poznanović G, Ugrišić ND, Prostran MŠ, Bošković B. Pharmacological interaction between oxcarbazepine and two COX inhibitors in a rat model of inflammatory hyperalgesia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;97(3):611-8.
229. Stepanović-Petrović RM, Tomić MA, Vučković SM, Ugrišić ND, Prostran MŠ, Bošković B. Opioidergic mechanisms are not involved in the antihyperalgesic effects of carbamazepine and oxcarbazepine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2007;29(3):191-4.
230. Straube A, Aicher B, Fiebich BL, Haag G. Combined analgesics in (headache) pain therapy: shotgun approach or precise multi-target therapeutics? *BMC Neurol.* 2011;11:43.
231. Syoji Y, Kobayashi R, Miyamura N, Hirohara T, Kubota Y, Uotsu N, Yui K, Shimazu Y, Takeda M. Suppression of hyperexcitability of trigeminal nociceptive neurons associated with inflammatory hyperalgesia following systemic administration of lutein via inhibition of cyclooxygenase-2 cascade signaling. *J Inflamm (Lond).* 2018;15:24.
232. Tallarida RJ, Murray RB. *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs.* New York: Springer Verlag, 1986.
233. Tallarida RJ, Stone DJ Jr, Raffa RB. Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sci.* 1997;61(26):PL 417-25.
234. Tallarida RJ. *Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis.* 1st ed. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC, 2000
235. Tallarida RJ. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain.* 2002;98(1-2):163-8.
236. Tanahashi S, Yamamura S, Nakagawa M, Motomura E, Okada M. Effect of lamotrigine and carbamazepine on corticotropin-releasing factor-associated serotonergic transmission in rat dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl).* 2012;220(3):599-610.
237. Taylor A, Westveld AH, Szkudlinska M, Guruguri P, Annabi E, Patwardhan A, Price TJ, Yassine HN. The use of metformin is associated with decreased lumbar radiculopathy pain. *J Pain Res.* 2013;6:755-63.
238. Thibault K, Calvino B, Rivals I, Marchand F, Dubacq S, McMahon SB, Pezet S. Molecular mechanisms underlying the enhanced analgesic effect of oxycodone compared to morphine in chemotherapy-induced neuropathic pain. *PLoS One.* 2014;9(3):e91297.
239. Tiippana EM, Hamunen K, Kontinen VK, Kalso E. Do surgical patients benefit from perioperative gabapentin/pregabalin? A systematic review of efficacy and safety. *Anesth Analg.* 2007;104(6):1545-56
240. Tillu DV, Melemedjian OK, Asiedu MN, Qu N, De Felice M, Dussor G, Price TJ. Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and mTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain. *Mol Pain.* 2012;8:5.
241. Ting RZ, Szeto CC, Chan MH, Ma KK, Chow KM. Risk factors of vitamin B(12) deficiency in patients receiving metformin. *Arch Intern Med.* 2006;166(18):1975-9.
242. Tjølsen A, Lund A, Hole K. Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *Eur J Pharmacol.* 1991;193(2):193-201.

243. Tomić MA, Micov AM, Stepanović-Petrović RM. Levetiracetam interacts synergistically with nonsteroidal analgesics and caffeine to produce antihyperalgesia in rats. *J Pain*. 2013;14(11):1371-82.
244. Tomić MA, Pecikoza UB, Micov AM, Popović BV, Stepanović-Petrović RM. The Effects of Levetiracetam, Sumatriptan, and Caffeine in a Rat Model of Trigeminal Pain: Interactions in 2-component Combinations. *Anesth Analg*. 2015;120(6):1385-93.
245. Tomić M, Pecikoza U, Micov A, Vučković S, Stepanović-Petrović R. Antiepileptic drugs as analgesics/adjuvants in inflammatory pain: current preclinical evidence. *Pharmacol Ther*. 2018;192:42-64.
246. Tomić MA, Vučković SM, Stepanović-Petrović RM, Micov AM, Ugrešić ND, Prostran MŠ, Bošković B. Analysis of the antinociceptive interactions in two-drug combinations of gabapentin, oxcarbazepine and amitriptyline in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol*. 2010a;628(1-3):75-82.
247. Tomić MA, Vucković SM, Stepanović-Petrović RM, Ugrešić ND, Paranos SLj, Prostran MS, Bosković B. The involvement of peripheral alpha 2-adrenoceptors in the antihyperalgesic effect of oxcarbazepine in a rat model of inflammatory pain. *Anesth Analg*. 2007;105(5):1474-81.
248. Tomić MA, Vučković SM, Stepanović-Petrović RM, Ugrešić N, Prostran MŠ, Bošković B. The anti-hyperalgesic effects of carbamazepine and oxcarbazepine are attenuated by treatment with adenosine receptor antagonists. *Pain*. 2004;111(3):253-60.
249. Tomić MA, Vucković SM, Stepanović-Petrović RM, Ugrešić ND, Prostran MS, Bosković B. Synergistic interactions between paracetamol and oxcarbazepine in somatic and visceral pain models in rodents. *Anesth Analg*. 2010b;110(4):1198-205.
250. Toth CC, Jedrzejewski NM, Ellis CL, Frey WH 2nd. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. *Mol Pain*. 2010;6:16.
251. Tsuruoka M, Matsutani K, Maeda M, Inoue T. Coeruleotrigeminal inhibition of nociceptive processing in the rat trigeminal subnucleus caudalis. *Brain Res*. 2003;993(1-2):146-53.
252. Urits I, Peck J, Orhurhu MS, Wolf J, Patel R, Orhurhu V, Kaye AD, Viswanath O. Off-label Antidepressant Use for Treatment and Management of Chronic Pain: Evolving Understanding and Comprehensive Review. *Curr Pain Headache Rep*. 2019;23(9):66.
253. Vazquez E, Hernandez N, Escobar W, Vanegas H. Antinociception induced by intravenous dipyrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. *Brain Res*. 2005;1048(1-2):211-7.
254. Vera G, López-Miranda V, Herradón E, Martín MI, Abalo R. Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;102(2):335-43.
255. Villanueva L, Nosedá R. Trigeminal Mechanisms of Nociception. In: McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013:793-802.
256. Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(3):391-9.
257. Vučković SM, Tomić MA, Stepanović-Petrović RM, Ugrešić N, Prostran MŠ, Bošković B. The effects of alpha2-adrenoceptor agents on anti-hyperalgesic effects of carbamazepine and oxcarbazepine in a rat model of inflammatory pain. *Pain*. 2006;125(1-2):10-9.
258. Vučković S, Tomić M, Stepanović-Petrović R, Ugrešić N, Prostran M, Bošković B. Role of alpha2-adrenoceptors in the local peripheral antinociception by carbamazepine in a rat model of inflammatory mechanical hyperalgesia. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007;29(10):689-96.

259. Wang YW, He SJ, Feng X, Cheng J, Luo YT, Tian L, Huang Q. Metformin: a review of its potential indications. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:2421-9.
260. Wang S, Kobayashi K, Kogure Y, Yamanaka H, Yamamoto S, Yagi H, Noguchi K, Dai Y. Negative Regulation of TRPA1 by AMPK in Primary Sensory Neurons as a Potential Mechanism of Painful Diabetic Neuropathy. *Diabetes.* 2018;67(1):98-109.
261. Wang H, Xie YF, Chiang CY, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Central  $\alpha$ -adrenoceptors contribute to mustard oil-induced central sensitization in the rat medullary dorsal horn. *Neuroscience.* 2013;236:244-52.
262. Wang XM, Zhang ZJ, Bains R, Mokha SS. Effect of antisense knock-down of alpha(2a)- and alpha(2c)-adrenoceptors on the antinociceptive action of clonidine on trigeminal nociception in the rat. *Pain.* 2002;98(1-2):27-35.
263. Watson CP, Moulin D, Watt-Watson J, Gordon A, Eisenhoffer J. Controlled-release oxycodone relieves neuropathic pain: a randomized controlled trial in painful diabetic neuropathy. *Pain* 2003;105(1-2):71-8.
264. Wehling M. Non-steroidal anti-inflammatory drug use in chronic pain conditions with special emphasis on the elderly and patients with relevant comorbidities: management and mitigation of risks and adverse effects. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70(10):1159-72.
265. Weng W, Yao C, Poonit K, Zhou X, Sun C, Zhang F, Yan H. Metformin relieves neuropathic pain after spinal nerve ligation via autophagy flux stimulation. *J Cell Mol Med.* 2019;23(2):1313-24.
266. Whiteside GT, Boulet JM, Walker K. The role of central and peripheral mu opioid receptors in inflammatory pain and edema: a study using morphine and DiPOA ([8-(3,3-diphenyl-propyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]dec-3-yl]-acetic acid). *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314(3):1234-40.
267. WHO Guidelines for the pharmacological and radiotherapeutic management of cancer pain in adults and adolescents. Dostupno na: <https://www.who.int/ncds/management/palliative-care/cancer-pain-guidelines/en/> (poslednji pristup: 5. decembar 2020).
268. Wiffen PJ, Derry S, Moore RA, Kalso EA. Carbamazepine for chronic neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;(4):CD005451.
269. Wild KD, Bian D, Zhu D, Davis J, Bannon AW, Zhang TJ, Louis JC. Antibodies to nerve growth factor reverse established tactile allodynia in rodent models of neuropathic pain without tolerance. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;322(1):282-7.
270. Wong H, Hossain S, Cairns BE. Delta-9-tetrahydrocannabinol decreases masticatory muscle sensitization in female rats through peripheral cannabinoid receptor activation. *Eur J Pain.* 2017;21(10):1732-42.
271. Woolf CJ; American College of Physicians; American Physiological Society. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med.* 2004;140(6):441-51.
272. Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest.* 2010;120(11):3742-4.
273. Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain.* 2011;152(3 Suppl):S2-15
274. Xu J, Wang W, Zhong XX, Feng Y, Wei X, Liu XG. Methylcobalamin ameliorates neuropathic pain induced by vincristine in rats: Effect on loss of peripheral nerve fibers and imbalance of cytokines in the spinal dorsal horn. *Mol Pain.* 2016;12. pii: 1744806916657089.
275. Yagihashi S, Tokui A, Kashiwamura H, Takagi S, Imamura K. In vivo effect of methylcobalamin on the peripheral nerve structure in streptozotocin diabetic rats. *Horm Metab Res.* 1982 Jan;14(1):10-3.



276. Yaksh TL, Noueihed RY, Durant PA. Studies of the pharmacology and pathology of intrathecally administered 4-anilinopiperidine analogues and morphine in the rat and cat. *Anesthesiology*. 1986;64(1):54-66.
277. Yang W, Cai X, Wu H, Ji L. Associations between metformin use and vitamin B12 levels, anemia, and neuropathy in patients with diabetes: a meta-analysis. *J Diabetes*. 2019;11(9):729-43.
278. Yao H, Feng J, Zheng Q, Wei Y, Wang S, Feng W. The effects of gliclazide, methylcobalamin, and gliclazide+methylcobalamin combination therapy on diabetic peripheral neuropathy in rats. *Life Sci*. 2016;161:60-8.
279. Yao Z, Shen C, Zhong Y. Perioperative Pregabalin for Acute Pain After Gynecological Surgery: A Meta-analysis. *Clin Ther*. 2015;37(5):1128-35.
280. Yu LC, Hansson P, Brodda-Jansen G, Theodorsson E, Lundeberg T. Intrathecal CGRP8-37-induced bilateral increase in hindpaw withdrawal latency in rats with unilateral inflammation. *Br J Pharmacol*. 1996;117(1):43-50.
281. Zeilhofer HU, Brune K. Cyclooxygenase Inhibitors: Basic Aspects. In: McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013:444-54.
282. Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI. The 5-HT<sub>3</sub> subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci*. 2002;22(3):1010-9.
283. Zhang HM, Chen SR, Pan HL. Regulation of glutamate release from primary afferents and interneurons in the spinal cord by muscarinic receptor subtypes. *J Neurophysiol*. 2007;97(1):102-9.
284. Zhang J, Ho KY, Wang Y. Efficacy of pregabalin in acute postoperative pain: a meta-analysis. *Br J Anaesth*. 2011;106(4):454-62.
285. Zhao Y, Tao T, Wu J, Pi J, He N, Chai X, Chen Q. Pharmacokinetics of tramadol in rat plasma and cerebrospinal fluid after intranasal administration. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(9):1149-54.
286. Zhu G, Okada M, Murakami T, Kawata Y, Kamata A, Kaneko S. Interaction between carbamazepine, zonisamide and voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel on acetylcholine release in rat frontal cortex. *Epilepsy Res*. 2002;49(1):49-60.

## Spisak radova i saopštenja proisteklih iz doktorske disertacije

### Naučni radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)

1. Tomić MA, **Pecikoza UB**, Micov AM, Stepanović-Petrović RM. The Efficacy of Eslicarbazepine Acetate in Models of Trigeminal, Neuropathic, and Visceral Pain: The Involvement of 5-HT1B/1D Serotonergic and CB1/CB2 Cannabinoid Receptors. *Anesth Analg.* 2015;121(6):1632-39.
2. **Pecikoza UB**, Tomić MA, Micov AM, Stepanović-Petrović RM. Metformin Synergizes With Conventional and Adjuvant Analgesic Drugs to Reduce Inflammatory Hyperalgesia in Rats. *Anesth Analg.* 2017;124(4):1317-29.
3. **Pecikoza U**, Micov A, Tomić M, Stepanović-Petrović R. Eslicarbazepine acetate reduces trigeminal nociception: Possible role of adrenergic, cholinergic and opioid receptors. *Life Sci.* 2018;214:167-75.
4. **Pecikoza U**, Tomić M, Micov A, Vuković M, Stepanović-Petrović R. Eslicarbazepine acetate interacts in a beneficial manner with standard and alternative analgesics to reduce trigeminal nociception. *Psychopharmacology (Berl).* 2020;237(5):1435-46.

### Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):

1. **Pecikoza UB**, Tomić MA, Micov AM, Stepanović-Petrović RM. Efficacy of eslicarbazepine acetate in somatic, visceral and neuropathic pain models in rodents. 15<sup>th</sup> World Congress on Pain (International Association for the Study of Pain), 6–11. October 2014., Buenos Aires, Argentina. PF304.
2. **Pecikoza UB**, Tomić MA, Micov AM, Stepanović-Petrović RM. Eslicarbazepine acetate reduces trigeminal nociception: involvement of  $\beta$ -adrenergic receptors. 17<sup>th</sup> World Congress on Pain (International Association for the Study of Pain), 12-16. September 2018., Boston, USA. PST417.
3. Tomić MA, **Pecikoza UB**, Micov AM, Stepanović-Petrović RM. Metformin interacts synergistically with duloxetine and oxycodone in reducing hyperalgesia in diabetic mice. 17<sup>th</sup> World Congress on Pain (International Association for the Study of Pain), 12-16. September 2018., Boston, USA. PST404.

### Saopštenja sa domaćih skupova štampana u izvodu (M64):

1. **Pecikoza U**, Tomić M, Micov A, Stepanović-Petrović R. Uloga adenzinskih receptora u analgetičkom dejstvu eslikarbazepin acetata. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, 15-19. oktobar 2014. Beograd, Srbija. Zbornik sažetaka, str. 250-251.
2. **Pecikoza U**, Tomić M, Micov A, Stepanović-Petrović R. Lokalni periferni analgetički efekat eslikarbazepin acetata u modelu trigeminalnog bola: uloga serotonininskih 5-HT1B/1D i kanabinoidnih CB1/CB2 receptora. *Arh farm.* 2018;68:678-679.

## **Biografija**

Uroš Pecikoza je rođen 14.12.1987. u Beogradu. Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer magistar farmacije, upisao je školske 2006/07. godine i diplomirao 2011. sa prosečnom ocenom 9,61. Tokom studiranja je bio stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i Fondacije „Dragoljub Marinković“. Doktorske akademske studije iz farmakologije upisao je školske 2012/13. godine na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu.

Nakon završetka osnovnih studija, u periodu od jula 2012. do jula 2013. godine, bio je zaposlen u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije (ALIMS) u Farmaceutskom sektoru. U septembru 2013. godine, se zaposlio kao saradnik u nastavi na Katedri za farmakologiju na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu. U zvanje asistenta (za užu naučnu oblast Farmakologija) je izabran u junu 2016. godine (i reizabran u junu 2019. godine).

Uroš Pecikoza učestvuje u pripremi i izvođenju praktične nastave iz obaveznih predmeta Farmakologija (program akreditovan 2008. godine), Farmakologija 1, Farmakologija 2, Farmakologija 3 i Farmakoterapija, i iz izbornog predmeta Farmakoterapija u pedijatriji. Dodatno, učestvuje u pripremi i izvođenju radionica u okviru akademske specijalizacije Farmakoterapija u farmaceutskoj praksi. Uroš Pecikoza je ko-autor dva poglavlja u udžbeniku „Farmakoterapija za farmaceute“ (drugo izmenjeno i dopunjeno izdanje; urednici: Nenad Ugrešić, Radica Stepanović-Petrović i Miroslav Savić)..

Uroš Pecikoza je uključen u naučno-istraživački rad na Katedri za farmakologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Od 2013. do 2019. bio je angažovan na Projektu osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: „Ispitivanje mehanizma dejstva, interakcija i toksičnih efekata adjuvantnih analgetika“ (projekat br. 175045, rukovodilac: prof. dr Radica Stepanović-Petrović). Od 2019. godine angažovan je u sklopu institucionalnog finansiranja naučno-istraživačkog rada na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (rukovodilac istraživačke grupe: prof. dr Radica Stepanović-Petrović). Član je Međunarodnog udruženja za proučavanje bola (IASP) i Društva za Neuronauke Srbije (DNS). Oblast istraživanja Uroša Pecikoze je farmakologija bola. Iz te oblasti je do sada kao ko-autor publikovao 1 poglavlje u monografiji međunarodnog značaja, 13 radova u međunarodnim časopisima i 1 rad u nacionalnom časopisu.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Урош Пециковић  
Број индекса 36/12

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Истиживање ефеката, механизми дејства и интеракција  
естрогенова и андрогена у схизофренији  
и депресији

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 19.12.2020.

У. Пециковић

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Урош Пецикоза

Број индекса 36/12

Студијски програм ЛАС - Фармакологија

Наслов рада Иницијалне ефектите, меканизам дејства и интеракција  
симпатомиметика са адреналином и норадреналином у експерименталним моделима болести

Ментор проф. др. Маја Томич

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 19.12.2020.

У. Пецикоза

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање ефеката, механизми дејства и интеракција епикорозитичних ацидних и метаболита у експерименталним моделним системима  
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 19. 12. 2020

U. Perica



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.