

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Branka D. Divović-Matović

**FARMAKOLOŠKA KARAKTERIZACIJA
UTICAJA DEUTERACIJE
IZABRANIH PIRAZOLOHINOLINONA
KAO MODULATORA
GABA_A RECEPTORA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Branka D. Divović-Matović

**FARMAKOLOŠKA KARAKTERIZACIJA
UTICAJA DEUTERACIJE
IZABRANIH PIRAZOLOHINOLINONA
KAO MODULATORA
GABA_A RECEPTORA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY



Branka D. Divović-Matović

**PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION
OF THE INFLUENCE OF DEUTERATION
OF SELECTED PYRAZOLOQUINOLINONES
AS GABA_A RECEPTOR MODULATORS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmakologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

MENTOR

Dr Miroslav Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

1. _____
Dr Vladimir Dobričić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr Bojan Batinić, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. _____
Dr Aleksandar Trbović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Mom mentoru profesoru Miroslavu Saviću dugujem izuzetnu zahvalnost za godine zajedničkog rada i besprekorno urađene eksperimente, za sve čemu me je naučio, za diskusije i tumačenja rezultata, zajedničku organizaciju nastave, iskrenu podršku, dobrotu i plemenitost koje su bile prisutne u svakom našem razgovoru i dogovoru. Zahvaljujem se profesorovoj porodici, profesorki Snežani, Simonidi i Magdaleni na razgovorima i lepom druženju.

Bojanu Batiniću, mom prijatelju i kolegi, veliko hvala što me učio veštinama u radu sa oglednim životinjama, pravljenju postera i planova eksperimenata. Hvala za izlete i razgovore podrške tokom rada na fakultetu i izrade disertacije.

Vladimiru Dobričiću hvala na bezbroj uzoraka koje smo zajedno pustili i što je uvek bio na raspolaganju da organizujemo moje farmakokinetičke eksperimente. Hvala na druženju u zlatarskom kraju.

Profesoru Aleksandru Trboviću hvala što je prihvatio da bude deo ove disertacije kroz članstvo u Komisiji i da svojim finalnim savetima unapredi dugogodišnje istraživačnje.

Zahvaljujem se studentima prema kojima sam razvila posebnu blagonaklonost, hvala im što smo učili zajedno i što sam posle svake održane vežbe osećala izuzetnu sreću i ljubav prema ovom poslu.

Mojim kolegama Tamari Timić Stamenić, Srđanu Joksimoviću, Anji Santrač, Jovani Arandelović, Mariji Banićević, Aleksandri Kovačević, Saneli Savić hvala na satima provedenim u zajedničkom radu, na svemu što sam od njih naučila, na druženju, entuzijazmu i odličnoj radnoj atmosferi.

Kolegama sa Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, profesoru Božidaru Brkoviću, Milanu Vučetiću i Dini Vasović se zahvaljujem na zajedničkim eksperimentima i timskom duhu.

Dejanu Mitroviću hvala na velikoj pomoći u radu u vivarijumu, brizi o mojim eksperimentima, životinjama i pre svega meni.

Vladimiru Stevanoviću hvala za pomoć u eksperimentima koji su deo ove disertacije, na velikom strpljenju, na rotarod eksperimentu, na razgovorima, šalama i druženju.

Draganu Šaponjiću hvala za prijateljstvo, druženja i pomoć pri izradi disertacije.

Mojoj prijateljici Mariji Berti hvala što smo bile izuzetan tim za eksperimente, šetnje, razgovore. Hvala za Nemačku, nikad je neću zaboraviti!

Jeleni Mitrović hvala za svestranu pomoć u eksperimentalnom radu, za divne razgovore, veliku i iskrenu podršku koju mi je pružila onda kada mi je zaista bila potrebna.

Mariji Milić hvala što mi je najpre bila izuzetan asistent tokom studiranja, zatim divna koleginica u eksperimentalnom radu i nastavi sa studentima, a onda moj iskren, nežan i izuzetan prijatelj.

Veliko hvala mojoj prijateljima iz srednje škole! Kumu Slobodanu što je bio najbolji drug iz školske klupe sve vreme školovanja, na velikoj podršci i brizi o meni; kumi Tamari za najlepše zajedničke izlaske, fotografije, šetnje, podršku, Holandiju; Jelisavi hvala za druženje, smeh i razgovore.

Hvala na razumevanje što nisam uvek bila na raspolaganju, za radovanje mojim uspesima i to što su ponosni na mene kao i ja na njih!

Jovani Milovanović, hvala za iskreno prijateljstvo, duge šetnje, poruke razumevanja i podrške, za dane u studentskom domu.

Bratu od tetke Vidanu hvala za zajedničko učenje, za sređivanje beleški iz biologije kojih se i danas sećam, za hiljade urađenih i zaokruženih zadataka iz matematike, za pomoć i podršku u izradi disertacije.

Mojoj tetka Milani dugujem izuzetnu zahvalnost što mi je uvek bila na raspolaganju, za zajedno provedene pauze u učenju, najlepše zajedničke kupovine, savete, za to što me saslušala uvek i hrabrila za dalje.

Deveru Radoju hvala na podršci u dugim putovanjima tokom rada na disertaciji, na pažnji, strpljenju i brizi o meni.

Sestri Danki dugujem veliku zahvalnost na njenoj ljubavi, na svestranoj podršci, na našem najlepšem i najiskrenijem odnosu, na tome što je beskrajno volela i čuvala Momčila dok sam ja radila.

Mojim roditeljima Dragani i Dobrici posvećujem ovu disertaciju! Hvala im što su svakog trenutka iza mene stajali čvrsto i sigurno! Što su me toliko čuvali i radovali se beskrajno mojim uspesima! Hvala što su uvek razumeli moje obaveze i pomagali mi! Mojoi mami hvala što mi je ulepšala svaki dan u životu i pružila najmudrije i najčistije savete. Hvala za dobrotu, plemenitost i moralnost kakvu nikada nigde nisam videla.

Mom suprugu Dragoju hvala na strpljenju i što je na najbolji način čuvao našeg sina dok sam ja radila.

Hvala Bojani što je svojim rođenjem ulepšala moj život!

Mom sinu Momčilu dugujem posebnu zahvalnost. Dao je smisao svemu u mom životu. Razumeo je moj posao i putovanje, čekao me je uvek strpljivo i davao mi motivaciju da nastavim dalje.

Farmakološka karakterizacija uticaja deuteracije izabranih pirazolohinolinona kao modulatora GABA_A receptora

SAŽETAK

Važno mesto u istraživanjima poslednjih godina zauzimaju GABA_A receptori (GABA_AR) sa $\alpha 6$ podjedinicom u pentamernom receptorskom kompleksu. Ovi receptori imaju potencijalno važnu ulogu u razvoju trigeminalnog orofacijalnog bola, migreni, neuropsihijatrijskim poremećajima sa senzorno-motornim deficitima kao što su tikovi, Tourette-ov sindrom, određeni simptomi shizofrenije, opsesivno-kompulzivni poremećaj i poremećaji pažnje. Otkriveno je mesto vezivanja na $\alpha + \beta$ - međupovršini GABA_AR označeno kao pirazolohinolinonsko (PQ) mesto, zajedno sa prvim $\alpha 6$ -selektivnim ligandom, PZ-II-029. Zatim je pronađeno još nekoliko PQ liganada koji deluju kao funkcionalno selektivni pozitivni modulatori na PQ mestu $\alpha 6$ GABA_A receptora, dok neutralnu modulaciju ostvaruju posredstvom benzodiazepinskog mesta.

Najpre smo sproveli eksperimente farmakokinetičke karakterizacije PQ jedinjenja iz tri strukturne grupe (PZ-II-029 i srodni deuterisani i/ili nitrogenovani analozi DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3 i DK-I-86-1; LAU463 i srodni deuterisani i/ili nitrogenovani analozi DK-I-58-1 i DK-II-58-1; i DK-I-87-1) i još pet dodatnih liganada (jedan koji je meta izomer DK-I-87-1 (DK-I-59-1) i četiri fluorirana analoga (DK-IV-19-1, DK-IV-20-1, DK-IV-22-1 i MM-I-10)) nakon intraperitonealne, oralne ili intravenske primene. Osim puta primene, faktor varijacije predstavljala je i formulacija (suspenzija, rastvor ili nanoemulzija) kao i soj životinja (C57BL miševi, Wistar i Sprague-Dawley pacovi). Određena je apsolutna oralna biološka raspoloživost, kao i slobodne frakcije u plazmi i mozgu dva liganda (PZ-II-029 i DK-I-56-1). Daljim istraživanjem procenjivali smo uticaj navedenih PQ liganada, samih ili u kombinaciji sa diazepamom, na ponašanje adultnih mužjaka pacova Wistar i Sprague-Dawley soja, odnosno miševa C57BL soja. Supstanca DK-I-56-1, koja je na osnovu prethodnih eksperimenata identifikovana kao vodeća molekula, ispitana je nakon hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca kao modela trigeminalne neuropatije na mužjacima pacova Wistar soja. Primena DK-I-56-1 u animalnom modelu trajala je 14 dana počev od prvog dana nakon operacije, a razvoj bolne preosetljivosti ispitivan je von Frey filamentima u definisanim vremenskim periodima. Farmakokinetički profili i parametri nedvosmisleno ukazuju na optimizaciju i unapređenje farmakokinetike deuterisanih analoga u plazmi i mozgu, pri različitim putevima primene, kao i pri različitim formulacijama ispitivanog liganda. Obe strategije, deuteracija i fluorovanje, povećale su metaboličku stabilnost, dok su razlike u farmakokinetici između deuterisanih i fluorovanih analoga bile izražene. Naime, fluorovani analozi pokazuju značajno zadržavanje u organima za izlučivanje (jetra i bubreg), a uz podatke da pokazuju izvesnu citotoksičnost *in vitro* na ćelijskim linijama jetre i bubrega, kao i da su efikasnost i funkcionalna selektivnost za $\alpha 6 + \beta 3$ - PQ mesto $\alpha 6$ -GABA_AR smanjeni u poređenju sa deuterisanim ligandima, čini ih manje pogodnim za dalje faze istraživanja. Dakle, strategija deuteracije pokazala se superiornom u odnosu na fluorovanje pirazolohinolinona u smislu održavanja $\alpha 6$ -GABA_A receptorske selektivnosti uz povećanje metaboličke stabilnosti i biološke raspoloživosti. Odličan bezbednosni profil testiranih PQ liganada (sa izuzetkom fluorovanih analoga koji su ispitani samo u testu lokomotorne aktivnosti) pokazan je u testu spontane lokomotorne aktivnosti, rotarodu, testu gubitka refleksa uspravljanja, pentilentetrazolskom testu, uzdignutom plus lavirintu, testu jačine

stiska i Morisovom vodenom lavirintu. U studijama interakcije na Sprague Dawley pacovima, samo PZ-II-029 i njegovi analozi sprečili su ataksične efekte benzodiazepina, što je procenjeno u rotarod testu i tokom praćenja lokomotorne aktivnosti pacova neposredno nakon oporavka od gubitka refleksa uspravljanja. Elektrofiziološki profili PQ liganada impliciraju da pozitivna modulacija posredovana $\alpha 6$ -GABA_AR koji sadrže $\gamma 2$ i δ podjedinicu, pre nego njihovo neutralno (antagonističko) modulatorno dejstvo na benzodiazepinskom mestu, sprečava ataksično dejstvo diazepama. Dakle, PZ-II-029 i njegovi deuterisani analozi ne stupaju u neželjene interakcije sa benzodiazepinima, a sa druge strane mogu potpuno prevenirati njihovo ataksično dejstvo, koje je prisutno u terapijskim, a posebno u toksičnim dozama. U finalnom eksperimentu procenili smo da DK-I-56-1, identifikovan kao vodeća molekula u odnosu na ostale PQ ligande, ostvaruje profilaktičko antinociceptivno dejstvo nakon podvezivanja infraorbitalnog nerva kod pacova. Antinociceptivno dejstvo je trajalo za vreme trajanja terapije i sedam dana nakon poslednje doze, što ukazuje da efekti liganda nemaju tendenciju dužeg održavanja.

Ključne reči: pirazolohinolinoni; deuteracija; $\alpha 6$ -GABA_A receptori; pirazolohinolinonsko mesto vezivanja; selektivna pozitivna modulacija; farmakokinetička karakterizacija; ataksija; bihejvioralni testovi; animalni model; trigeminalna neuropatija.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

Pharmacological characterization of the influence of deuteration of selected pyrazoloquinolinones as GABA_A receptor modulators

ABSTRACT

GABA_A receptors (GABA_ARs) containing the $\alpha 6$ subunit ($\alpha 6$ -GABA_ARs) have recently obtained an important place in research. They play a distinct role in trigeminal orofacial pain, migraine, and neuropsychiatric disorders with sensori-motor gating deficits (such as tic disorders, Tourette's syndrome, certain symptoms of schizophrenia, obsessive compulsive disorder and attention deficit disorders). The binding site at the $\alpha + \beta$ - interface of GABA_ARs, designated as the pyrazoloquinolinone (PQ) site, was discovered, along with the first $\alpha 6$ -selective ligand, PZ-II-029. Subsequent research led to the development of a series of PQs, as functionally selective positive modulators at the PQ site of $\alpha 6$ -containing GABA_ARs. PQs are also neutral modulators at the benzodiazepine site.

Firstly, we conducted pharmacokinetic characterization of PQs from three structural groups (PZ-II-029 and related deuterated and/or nitrogenated analogs DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3 and DK-I-86-1; LAU 463 and related deuterated and/or nitrogenated analogs DK-I-58-1 and DK-II-58-1; and DK-I-87-1) and five additional ligands (one meta isomer of DK-I-87-1 (DK-I-59-1) and four fluorinated analogues (DK-IV-19-1, DK-IV-20-1, DK-IV-22-1 and MM-I-10)), after intraperitoneal, oral or intravenous administration. Beside the route of administration, formulation (suspension, solution or nanoemulsion) and the animal strain (C57BL mice, Wistar and Sprague-Dawley rats) were additional factors of variation. Absolute oral bioavailability, as well as estimated free fractions in plasma and brain of two ligands (PZ-II-029 and DK-I-56-1), were determined. Through further research, we evaluated the influence of PQ ligands, alone or in combination with diazepam, on the behavior of adult male Wistar and Sprague-Dawley rats, or C57BL mice. On the basis of previous experiments, DK-I-56-1 was identified as a "lead" compound and tested after chronic constriction injury of the infraorbital nerve as a model of trigeminal neuropathy in male Wistar rats. The application of DK-I-56-1 in the animal model lasted for 14 days starting from the first day after surgery, and the development of pain hypersensitivity was examined with von Frey filaments in defined time periods. Pharmacokinetic profiles and parameters clearly indicate optimization and improvement of pharmacokinetics of deuterated analogues in plasma and brain, with different routes of administration, as well as with different formulations of the investigated ligand. While the strategy of deuteration and fluorination increased metabolic stability, the pharmacokinetic influence on plasma, brain, liver and kidney exposure was dramatically different. Namely, the fluorinated analogues showed significant retention in the excretory organs (liver and kidney). Also, they exhibited a slightly increased cytotoxic effect on liver and kidney cell lines in vitro. Efficacy and functional selectivity for the $\alpha 6 + \beta 3$ - interface (PQ site) of $\alpha 6$ -GABA_ARs was reduced for the fluorinated analogs in comparison to the deuterated ligands. All these facts make them less suitable for further research. Thus, the deuteration strategy proved superior to fluorination of these PQs in terms of maintaining $\alpha 6$ -GABA_AR selectivity while enhancing the metabolic stability and bioavailability. These $\alpha 6$ -GABA_AR ligands were devoid of observable detrimental effects. An excellent behavioral safety profile of the tested PQs (with the exception of the fluorinated analogues which were tested only

in the locomotor activity test) was demonstrated in the spontaneous locomotor activity, rotarod, loss of righting reflex, pentylenetetrazol, elevated plus maze, grip strength and Morris water maze tests. In interaction studies, only PZ-II-029 and its analogs prevented the ataxic effects of the benzodiazepine, as assessed in the rotarod test and during monitoring of rat locomotor activity immediately after awakening from the loss of righting reflex. Published electrophysiological profiles of PQ ligands imply that positive modulation elicited at $\alpha 6$ -GABA_A receptors that contain the $\gamma 2$ and δ subunit, rather than their neutral (antagonistic) modulatory action at the benzodiazepine site, may prevent the ataxic action of diazepam. Therefore, PZ-II-029 and its deuterated analogs are not prone to untoward interactions with benzodiazepines, and may indeed completely abolish their ataxic action, seen at therapeutic, and especially toxic concentrations. In the final experiment, we revealed that the „*lead*” compound DK-I-56-1 exerts a prophylactic antinociceptive effect after ligation of the infraorbital nerve in rats. The antinociceptive effect lasted during the treatment application and seven days after the last dose, which indicates that the effects of the ligand do not tend to be sustained for a long time.

Key words: pyrazoloquinolinones; deuteration; $\alpha 6$ -GABA_A receptors; pyrazoloquinolinone binding site; selective positive modulation; pharmacokinetic characterization; ataxia; behavioral tests; animal model; trigeminal neuropathy.

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmacology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GABAA receptori	1
1.1.1. Struktura GABAA receptora i lokalizacija vezivnih mesta na receptoru.....	1
1.1.2. Benzodiazepini kao pozitivni modulatori GABAA receptora i njihova farmakološka dejstva.....	3
1.1.3. Pirazolohinolinonsko modulatorno mesto na GABAA receptorima.....	4
1.2. GABAA receptori koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu.....	6
1.2.1. Studije selektivnosti i efikasnosti liganada koji deluju posredstvom $\alpha 6$ GABAA receptora	7
1.2.2. Funkcionalna organizacija cerebelarnih kola i uloga $\alpha 6$ GABAA receptora.....	14
1.3. Uloga malog mozga u funkciji centralnog nervnog sistema.....	16
1.4. Neuralni mehanizam kraniofacijalnih bolova	17
1.4.1. Trigeminalna neuropatija.....	19
1.4.2. Trenutne smernice i potencijalna nova ciljna mesta u lečenju trigeminalne neuropatije	21
1.5. Deuteracija u medicinskoj hemiji.....	22
1.6. Formulacija pirazolohinolinona kao slabo rastvornih jedinjenja	23
1.7. Složenost i faze u razvojnom putu novog leka.....	25
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	27
3. MATERIJAL I METODE	28
3.1. Ogladne životinje	28
3.2. Ispitivane supstance.....	28
3.3. Protokoli <i>in vitro</i> eksperimenata	31
3.3.1. Određivanje farmakokinetičkih profila i parametara izabranih liganada u ciljnim tkivima oglednih životinja.....	31
3.3.2. Određivanje slobodne frakcije izabranih liganada u plazmi i moždanom tkivu	33
3.3.3. LC-MS/MS analitička metoda.....	34
3.4. Protokoli bihevioralnih eksperimenata	35
3.4.1. Test spontane lokomotorne aktivnosti.....	36
3.4.2. Rotarod test.....	38
3.4.3. Test gubitka refleksa uspravljanja	38
3.4.4. Intravenski pentilentetrazolski test	39

3.4.5. Baterija bihevioralnih testova na Wistar pacovima.....	40
3.4.5.1. Uzdignuti plus lavirint	40
3.4.5.2. Test jačine stiska	41
3.4.5.3. Morisov vodeni lavirint (MVL) - „ <i>cued-learning</i> ” protokol	42
3.5. Protokol ispitivanja profilaktičkog antinociceptivnog efekta DK-I-56-1 na modelu trigeminalne neuropatije kod pacova	43
3.5.1. Model unilateralne hronične konstriktione povrede infraorbitalnog nerva (eng. <i>chronic constriction injury of infraorbital nerve (IoN-CCI)</i>)	43
3.5.2. Praćenje izazvanog bolnog ponašanja (mehaničke alodinije)	44
3.5.3. Ispitivanje profilaktičkog antinociceptivnog efekta DK-I-56-1 u modelu trigeminalnog neuropatskog bola.....	45
3.5.4. Praćenje „umivanja“ lica životinja	46
3.6. Statistička analiza podataka	47
4. REZULTATI	49
4.1. Rezultati <i>in vitro</i> eksperimenata.....	49
4.1.1. Određivanje farmakokinetičkih profila i parametara izabranih liganada u ciljnim tkivima oglednih životinja.....	49
4.2. Rezultati bihevioralnih eksperimenata	65
4.2.1. Test spontane lokomotorne aktivnosti	65
4.2.2. Rotarod test.....	70
4.2.3. Test gubitka refleksa uspravljanja	71
4.2.4. Intravenski pentilentetrazolski test	72
4.2.5. Baterija bihevioralnih eksperimenata na Wistar pacovima	73
4.2.5.1. Uzdignuti plus lavirint	73
4.2.5.2. Test jačine stiska	74
4.2.5.3. Morisov vodeni lavirint - „ <i>cued-learning</i> ” protokol.....	74
4.3. Rezultati ispitivanja profilaktičkog antinociceptivnog efekta DK-I-56-1 na modelu trigeminalne neuropatije kod pacova	75
4.3.1. Praćenje „umivanja“ lica životinja	78
5. DISKUSIJA	79
5.1. Određivanje koncentracije izabranih liganada u ciljnim tkivima oglednih životinja.....	79
5.2. Test spontane lokomotorne aktivnosti.....	83
5.3. Rotarod test	84
5.4. Test gubitka refleksa uspravljanja.....	84

5.5. Pentilentetrazolski test.....	85
5.6. Baterija bihevioralnih eksperimenata na Wistar pacovima.....	85
5.7. Profilaktičko antinociceptivno dejstvo DK-I-56-1 u modelu hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca kod pacova	86
5.8. Opšta diskusija	87
6. ZAKLJUČCI.....	92
7. LITERATURA	94
8. BIOGRAFIJA	107

1. UVOD

Ekscitatorni i inhibitorni neuroni, čija je međusobna ravnoteža osnova normalnog funkcionisanja najkompleksnijih moždanih procesa, obrazuju hijerarhijski sistem centralnog nervnog sistema (CNS). Dominantni i najzastupljeniji medijatori hemijske komunikacije hijerarhijskog sistema, ali i čitavog CNS-a su glutamat i γ -aminobuterna kiselina (GABA), čiji neuroni funkcionišu kroz dve organizacione celine. Ekscitatorni glutamatergički neuroni čine projekcioni sistem u kome jedan neuron projektuje svoj akson u drugu laminu kore velikog ili malog mozga, ili se akson pruža do anatomski udaljenih struktura CNS-a. Inhibitorni, GABA-ergički interneuroni čine sistem lokalnih kola koji posredstvom fine regulacije projekcionih puteva ostvaruje krucijalnu ulogu u kontroli aktivnosti neuronskih mreža.

1.1. GABAA receptori

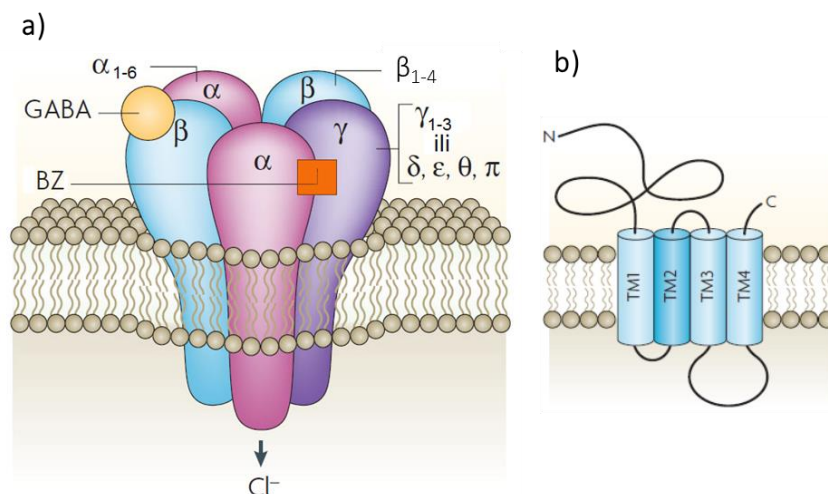
1.1.1. Struktura GABA_A receptora i lokalizacija vezivnih mesta na receptoru

GABA je najzastupljeniji inhibitorni neurotransmiter u mozgu, koristi je svaka treća sinapsa, i skoro svi neuroni reaguju na GABA-u (Burt, 2003). Otkrivena je 1950. godine (Roberts i Frankel, 1950) i glavni put sinteze GABA-e u presinaptičkim terminalima podrazumeva dekarboksilaciju L-glutamata dejstvom enzima dekarboksilaze glutamatne kiseline (eng. *glutamic acid decarboxylase* – GAD) koji se javlja u dve izoforme GAD65 i GAD67 (65 i 67 kDa). Enzim se može naći samo u neuronima koji stvaraju GABA-u, što je iskorišćeno za imunohistohemijsko obeležavanje GABA-ergičkih puteva u mozgu. Nakon otpuštanja u sinaptičku pukotinu iz presinaptičkog terminala, GABA svoje dejstvo ostvaruje posredstvom dva tipa receptora – jonotropnih GABA_A i metabotropnih GABA_B receptora (Olsen i Sieghart, 2008). GABA_AR se nalaze u 20%-50% sinapsi u mozgu (Nutt i Malizia, 2001), reaguju na vezivanje GABA-e u vremenskom roku koji se meri milisekundama, otvranjem transmembranskog kanala koji je propusljiv za hloridne jone, čime se kao krajnji efekat dobija supresija neuronske aktivnosti u mozgu odrasle osobe (Maconochie i sar., 1994). Disfunkcija ovih ligand-zavisnih jonskih kanala dovodi do anksioznosti, epilepsije i neurorazvojnih poremećaja uključujući autizam (Braat i Kooy 2015). GABA i njen najrasprotranjeniji GABA_A receptor (GABA_AR) predstavljaju ciljno mesto delovanja mnogih farmakološki i klinički značajnih lekova kao što su benzodiazepini, barbiturati, anestetici, neuroaktivni steroidi i antikonvulzivi. Navedeni lekovi ostvaruju alosternu modulaciju GABA_AR posredstvom različitih vezivnih mesta utičući na taj način na različite procese: anksioznost, kognitivne procese (učenje i pamćenje), spavanje, koordinaciju pokreta, mišićni tonus, epileptogenu aktivnost (Sieghart i sar., 2022).

GABA_AR pripadaju superfamiliji pentamernih, ligand-zavisnih jonskih kanala koji posreduju brzu neuronsku inhibiciju u CNS-u i kičmenoj moždini nakon vezivanja endogenog liganda GABA-e. Arhitektura receptora podrazumeva pet proteinskih podjedinica organizovanih tako da formiraju centralnu poru permeabilnu za Cl⁻ jone. Svaka podjedinica se sastoji od velikog ekstracelularnog N-terminalnog domena sastavljenog od 2 α heliksa i 10 β lanaca, transmembranskog domena koga čine 4 α heliksa (TM1-TM4), intracelularnog α -heliksnog domena između TM3 i TM4 čija funkcija nije u potpunosti razjašnjena, a smatra se da predstavlja nosač (skelu) za pomoćne

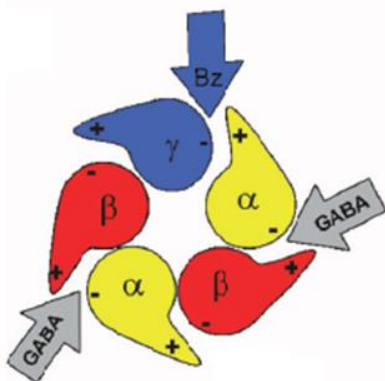
proteine (npr. gefirin) ili može podleći fosforilaciji kao deo kontrole receptorske funkcije, i relativno kratkog ekstraselularnog C-terminalnog domena (Slika 1b) (Chua i Chebib, 2017).

Postoji 20 različitih podjedinica koje mogu da formiraju homopentamerni ili heteropentamerni kanal, $\alpha(1-6)$, $\beta(1-4)$, $\gamma(1-3)$, δ , ϵ , θ , π i $\rho(1-3)$ (Slika 1a). Gen za pretpostavljenu $\beta 4$ podjedinicu inicijalno je detektovan u mozgu pileta, ali je potvrđeno prisustvo i kod ljudi (Sieghart i Savić, 2018). Iako je moguć veliki broj kombinacija, većina $GABA_A$ se sastoji od dve α , dve β i jedne *non- α* i *non- β* podjedinice (uglavnom γ za sinaptički i δ za ekstrasinaptički tip receptora) (Olsen i Sieghart, 2009; Crocetti i Guerrini, 2020).



Slika 1. a) Shematski prikaz pentamerne strukture $GABA_A$ receptora sa mogućim kombinacijama različitih podjedinica i sa prikazom veznih mesta za GABA-u i benzodiazepine (BZ); **b)** shematski prikaz strukture jedne podjedinice $GABA_A$ receptora (preuzeto i modifikovano iz Jacob i sar., 2008).

Organizacija pentamera koji formira funkcionalni $GABA_A$ R objašnjena je na najčešće zastupljenoj receptorskoj populaciji u CNS-u ($2\alpha 1:2\beta 2:1\gamma 2$) (Baumann i sar., 2002). Posmatrajući ekstraselularni domen, podjedinice su organizovane u smeru suprotnom od kazaljke na časovniku γ - β - α - β - α (Sigel i Ernst, 2018), formirajući poru za hloridne jone i ortosterno mesto na N-terminalnom ekstraselularnom domenu. Vezivna mesta za ligande i jone koji deluju kao alosterne modulatori nalaze se ili na ekstraselularnom ili u transmembranskom domenu. Endogeni agonist, GABA, vezuje se za dva vezivna mesta locirana na α/β površini (Slike 2 i 3a,b). Benzodiazepinsko mesto vezivanja je u ekstraselularnom domenu α/γ površine (Slike 2 i 3a). Vezivna mesta na površini između dve susedne podjedinice, označene kao glavna i komplementarna, obrazuju definisane sekvence aminokiselina (poznate i kao petlje). Po dogovoru, peptidne petlje A-C su na glavnoj podjedinici i obrazuju plus stranu (+), dok su tri peptidne petlje D-F na komplementarnoj podjedinici i obrazuju minus stranu (-) (Thompson i sar., 2010).



Slika 2. Vezna mesta GABA-e i benzodiazepina (BZ) na $GABA_A$ receptoru (preuzeto i modifikovano iz Varagić i sar., 2013a).

Za sinaptičku lokalizaciju $GABA_A$ R neophodno je prisustvo $\gamma 2$ podjedinice u receptorskom kompleksu, obično zajedno sa $\alpha 1$, $\alpha 2$ ili $\alpha 3$ podjedinicom. Uprkos tome, značajan broj $GABA_A$ R koji sadrže $\gamma 2$ podjedinicu su ipak ekstrasinaptički receptori, jer sinapsi pripada samo mali deo ćelijske površine, dok je ekstrasinaptička površina znatno veća. Na taj način ekstrasinaptički su prisutni neki od $\alpha 1/\alpha 2/\alpha 3$ $GABA_A$ R i velika većina onih koji sadrže $\alpha 4/\alpha 5/\alpha 6$ podjedinicu. Sa druge strane, receptori u kojima je $\gamma 2$ zamenjena δ ili ϵ podjedinicom su lokalizovani isključivo ekstrasinaptički. Fazičnoj inhibiciji doprinose sinaptički lokalizovani $GABA_A$ R, dok oni čija je lokalizacija ekstrasinaptička doprinose toničnoj inhibiciji (Olsen i Sieghart, 2008; Sieghart i Savić, 2018).

1.1.2. Benzodiazepini kao pozitivni modulatori $GABA_A$ receptora i njihova farmakološka dejstva

Ubrzo nakon otkrića GABA-e, hemičar Leo Sternbah identifikovao je prvi benzodiazepin, hlordiazepoksid, 1955. godine koji se na tržištu našao 1960. godine pod nazivom Librium. Dalja istraživanja bila su usmerena na strukturne modifikacije u cilju unapređenja aktivnosti. 1963. godine na tržište stiže i diazepam pod zaštićenim imenom Valijum (od latinskog *valere* što znači biti jak). Oba leka su bila izuzetno uspešna, tako da su do 1970. godine u velikoj meri zamenili starije sedative i hipnotike (Wick, 2013).

Benzodiazepini su kategorizovani kao pozitivni alosterne modulatori i nakon vezivanja za svoje vezno mesto na $GABA_A$ R pojačavaju hloridnu struju indukovanu GABA-om potencirajući efekat hiperpolarizacije prijemnih neurona (Zhu i sar., 2018). Suprotno, postoje ligandi koji dovode do negativne alosterne modulacije $GABA_A$ R (redukuju GABA indukovanu hloridnu struju) i označavaju se kao negativni alosterne modulatori ili inverzni agonisti. Nultu modulaciju $GABA_A$ R postižu antagonisti koji se još označavaju kao *silent* alosterne modulatori. Flumazenil je kompetitivni antagonist benzodiazepinskog mesta vezivanja koji se klinički koristi za prekid anestezije izazvane benzodiazepinima i glavni je antidot kod predoziranja benzodiazepinima (Votey i sar., 1991). U $GABA_A$ receptorskom kompleksu, izoforma α podjedinice u benzodiazepinskom mestu definiše afinitet i farmakološku aktivnost. Receptori koji sadrže $\alpha(1-3,5)/\gamma(1-3)$ površinu formiraju visokoafinitetno vezivno mesto za benzodiazepine i klasifikuju se kao diazepam senzitivni (eng. *diazepam-sensitive*) receptori. $\alpha 4$ i $\alpha 6$ podjedinica sadrže reziduu aminokiseline arginin na homologoj poziciji histidina u $\alpha(1-3,5)$ podjedinicama, što za posledicu

ima nemogućnost vezivanja tradicionalnih benzodiazepinskih liganada, pa se GABA_AR koji sadrže $\alpha 4$ i $\alpha 6$ podjedinicu klasifikuju kao diazepam neosetljivi (eng. *diazepam-insensitive*) (Sigel i Ernst, 2018).

Benzodiazepini modulacijom GABA_AR ostvaruju čitav niz farmakoloških efekata: anksiolitički, antikonvulzivni, sedativni, hipnotički, anterogradno amnezijski, miorelaksantni. Zbog ogromnog kliničkog značaja koji imaju, već duži niz godina, istraživanja su usmerena ka benzodiazepinskim ligandima koji bi imali selektivnije dejstvo. Naime, klasični benzodiazepini pokazuju sličan afinitet prema svim diazepam senzitivnim GABA_AR koji obuhvataju $\alpha 1\beta\gamma 2$, $\alpha 2\beta\gamma 2$, $\alpha 3\beta\gamma 2$ i $\alpha 5\beta\gamma 2$ subpopulacije receptora i, stoga, ostvaruju slične bihejvioralne efekte (Sieghart i Savić, 2018). Genetskom modifikacijom miševa, koja podrazumeva uvođenje tačkastih mutacija gena koji kodiraju pojedinačne α podjedinice, određena subpopulacija receptora postaje neosetljiva na dejstvo diazepama. Poređenjem diazepamom-izazvanih bihejvioralnih odgovora u grupi miševa sa mutacijom i grupi bez mutacije (eng. *wild-type*) omogućava se identifikacija efekata diazepama koji izostaju ili su redukovani kod mutiranih miševa (Olsen i Sieghart, 2008). Koristeći ovaj pristup, pokazano je da $\alpha 1\beta\gamma 2$ receptori posreduju u sedativnom, anterogradno amnezijском i, delom, antikonvulzivnom dejstvu benzodiazepina. Anksiolitičko dejstvo posredovano je uglavnom $\alpha 2\beta\gamma 2$ GABA_AR, a u uslovima veće okupiranosti receptora, potencijalno i $\alpha 3\beta\gamma 2$ receptorima. Dodatno, $\alpha 2\beta\gamma 2$ zajedno sa $\alpha 3\beta\gamma 2$ su delimično uključeni u antinociceptivno i miorelaksantno dejstvo benzodiazepinskih liganda. Miševi kojima je „isključen” gen za $\alpha 3$ podjedinicu (eng. *$\alpha 3$ knock-out*) pokazuju hiperdopaminergički fenotip koji se manifestuje kao značajan deficit u prepulsnoj inhibiciji koji je posledica neadekvatne obrade senzorno-motornih informacija. Naime, dopaminergički sistem prima inhibitorne signale preko $\alpha 3$ GABA_AR receptora, koji obezbeđuju prepulsnu inhibiciju, a aktivacija ovih receptora pokazuje se kao efikasna u filtriranju senzornih i motornih draži kod mnogih psihijatrijskih poremećaja. Subpopulacija $\alpha 5\beta\gamma 2$ receptora ima ulogu u procesima učenja i pamćenja, što je pokazano na *$\alpha 5$ knockout* miševima kod kojih je poboljšano prostorno učenje i pamćenje (Rudolph i Möhler, 2006; Olsen i Sieghart, 2008; Sieghart i Savić, 2018).

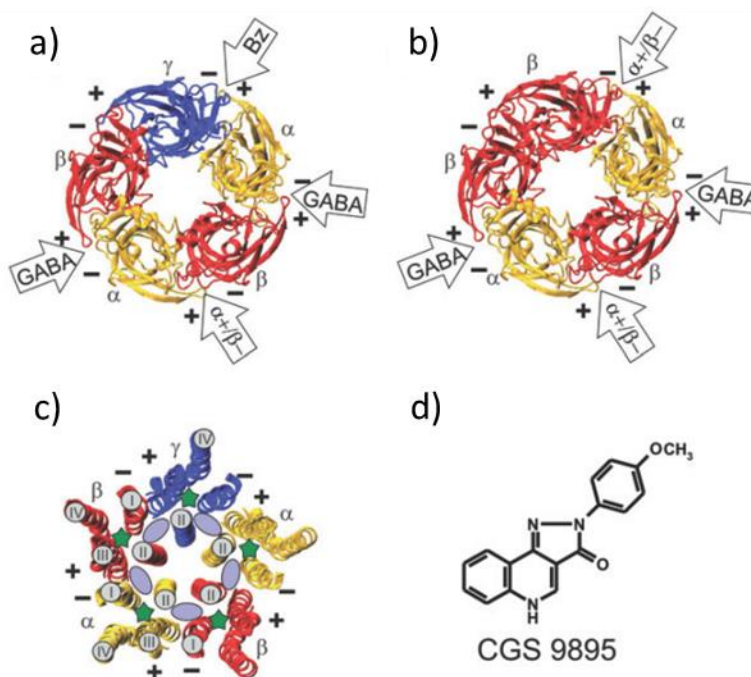
Preko GABA_A receptora delom se ostvaruju i efekti opštih anestetika. Utvrđeno je da su respiratorna depresija, relaksacija skeletne muskulature i delom hipnotički efekat etomidata i propofola posredovani receptorima sa $\beta 3$ subjedinicom, dok oni sa $\beta 2$ dodatno doprinose hipnotičkom efektu etomidata. Studije sa rekombinantnim receptorima su pokazale da su oni koji sadrže ϵ umesto $\gamma 2$ podjedinice neosetljivi na dejstvo opštih anestetika, što ukazuje na njihovu ulogu u formiranju vezivnog mesta (Rudolph i Mohler, 2006).

Iz navedenog se zaključuje da selektivnim dejstvom na određeni podtip GABA_AR ne samo da se postiže bolji bezbednosni profil, na primer, anksiolitički efekat bez sedacije, već se otkrivaju i dodatni efekti, koji mogu biti polazne tačke za razvoj inovativnog tretmana bola, kognitivnih poremećaja, shizofrenije, depresije ili Down-ovog sindroma.

1.1.3. Pirazolohinolinonsko modulatorno mesto na GABA_A receptorima

Identifikovano je više od 14 različitih veznih mesta na GABA_AR. Neka od njih uključuju: mesto za vezivanje GABA-e, drugih agonista (muscimol) i kompetitivnih antagonista (bikukulin), pikrotoksinsko mesto na jonskom kanalu, mesto za vezivanje barbiturata, neuroaktivnih steroida,

benzodiazepina, etanola, stereoselektivno mesto za vezivanje inhalacionih anestetika, furosevida, Zn^{2+} i drugih dvovalentnih jona (Korpi i sar., 2002). Benzodiazepinsko mesto vezivanja je nedvosmisleno definisano i predstavlja najatraktivniju metu na $GABA_A$ R u otkriću novih lekova. Međutim, poslednjih godina, još jedno alosterno mesto u $GABA_A$ receptorskom kompleksu postaje mesto od interesa (Slika 3a, b). Označava se kao „nisko-afinitetno mesto” ili „mesto 2”, neosetljivo je na tradicionalne benzodiazepine i smešteno na α +/ β - površini (Ramerstorfer i sar. 2011). Drugo alosterno mesto je homologo sa benzodiazepinskim (α +/ γ -) u pogledu glavnih podjedinica koje pokazuju sličnu aminokiselinsku sekvencu što ukazuje da je novo alosterno mesto slično tradicionalnom benzodiazepinskom mestu i potencijalno može vezati ligande koji imaju afinitet za benzodiazepinsko mesto (Sieghart i sar., 2012). To potvrđuje nalaz da ligand pirazolohinolinonske (PQ) strukture, CGS 9895 (2-(4-metoksifenil)pirazolo[4,3-c]hinolin-3(5H)-on) (Slika 3d), jedan od prvih u seriji istraživanja PQ liganada (Varagic i sar., 2013a) i prototip liganada koji ispoljavaju benzodiazepinima sličan modulatorni efekat posredovan α +/ β - alosternim mestom na $GABA_A$ R (Ramerstorfer i sar., 2011), deluje kao antagonist na benzodiazepinskom mestu (α +/ γ -) u nanomolarnim koncentracijama, ali pojačava GABA-indukovanu struju jona vezivanjem za α +/ β - alosterno mesto i to sa manjom potentnošću. Ligandi koji se vezuju za α +/ β - mesto mogu da modulišu širu populaciju $GABA_A$ R ($\alpha\beta$, $\alpha\beta\gamma$, $\alpha\beta\delta$, $\alpha\beta\epsilon$, $\alpha\beta\pi$ i $\alpha\beta\theta$), u poređenju sa benzodiazepinima koji deluju samo na $\alpha\beta\gamma$ - $GABA_A$ podtip receptora, i stoga, potencijalno, poseduju širi spektar farmakoloških efekata. Takođe, diazepam neosetljivi receptorski podtip $GABA_A$ R koji sadrže $\alpha 4$ i $\alpha 6$ podjedinicu, a uključeni su u patogenezu različitih psihijatrijskih i neuroloških poremećaja, poput trigeminalnog orofacijalnog bola i migrene (Vasović i sar. 2019; Chiou i sar., 2018), mogu biti aktivirani novim α +/ β - delujućim ligandima (Varagic i sar., 2013b; Treven i sar., 2018; Knutson i sar., 2018).



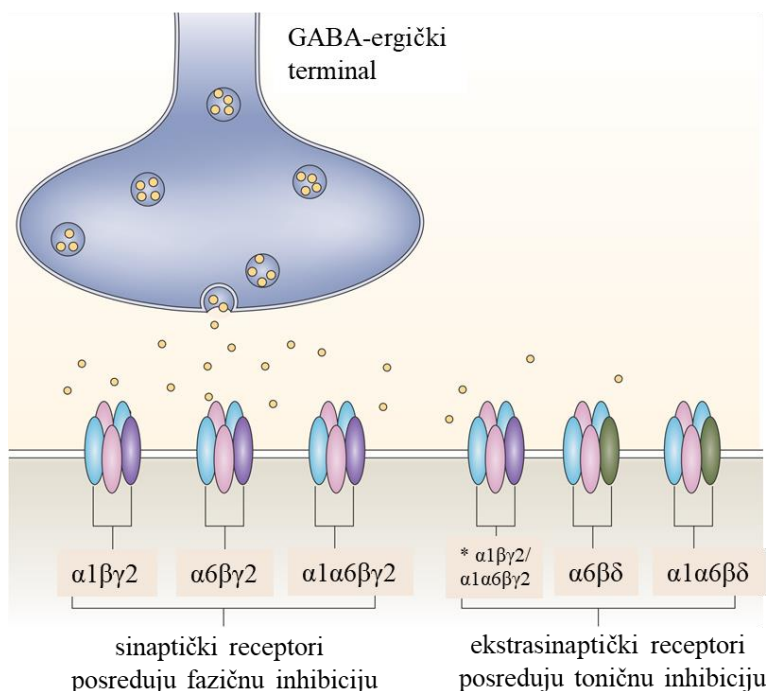
Slika 3. a) Ekstracelularni domen i b) transmembranski domen $GABA_A$ receptora sastavljenog od dve α , dve β i jedne γ podjedinice; c) ekstracelularni domen $GABA_A$ receptora sastavljenog od dve α i tri β

podjedinice. Dva ortosterna mesta za GABA-u locirana su na β^+/α^- površini, dok je benzodiazepinsko mesto locirano na α^+/γ^- površini. Označeno je i drugo alosterno α^+/β^- mesto; **d**) hemijska struktura CGS 9895 (Preuzeto iz Ramerstorfer i sar, 2011).

1.2. GABA_A receptori koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu

GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ subjedinicu zastupljeni su vrlo ograničeno, za razliku od GABA_AR koji sadrže druge α podjedinice. *In situ* hibridizacijom i imunohistochemijskim studijama otkriveno je da su ispoljeni, predominantno, u granularnim cerebelarnim ćelijama (Gutierrez i sar., 1996; Pirker i sar. 2000). Lokacija gena koji kodira sintezu $\alpha 6$ podjedinice i proteinska sekvenca visoko su očuvani kod ljudi, pacova, miševa, zlatnih ribica i piladi, što sugerira da su receptori koji sadrže ovu podjedinicu od fundamentalne važnosti za cerebelarnu funkciju. Novijim istraživanjima identifikovani su $\alpha 6$ GABA_AR u brojnim neuronskim i neneuronskim tkivima kao što su: kohlearni nukleus (Campos i sar., 2001), prefrontalni korteks (Agrawal i Dwivedi, 2020), hipokampus (Yang i sar., 2016), ventralni strijatum (Leggio i sar., 2015), trigeminalni ganglion (Hayasaki i sar., 2006, Puri i sar., 2011; Puri i sar., 2012; Kramer i Bellinger, 2013), T limfociti (Mendu i sar., 2011), α ćelije pankreasa (Jin i sar., 2013), placenta i uterus (Akinci i Schofield, 1999). U većini navedenih tkiva, uloga $\alpha 6$ GABA_AR nije poznata.

Istraživanja pokazuju da 45% GABA_AR u cerebelumu sadrže $\alpha 6$ podjedinicu. Uglavnom su sledećih kombinacija podjedinica: $\alpha 6\beta\gamma 2$, $\alpha 1\alpha 6\beta\gamma 2$, $\alpha 6\beta\delta$ ili $\alpha 1\alpha 6\beta\delta$. Od β podjedinica najčešće je zastupljena $\beta 2$, a zatim $\beta 3$ i $\beta 1$ u homologoj kombinaciji, dok su u određenom procentu prisutni i $\alpha 6$ GABA_AR sa dve različite β podjedinice (Sieghart i sar., 2022). Receptori sastavljeni od $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2/3$ i $\gamma 2$ podjedinice uglavnom su lokalizovani na postsinaptičkoj membrani GABA-ergičkih Goldžijevih sinapsi i posreduju fazičnu inhibiciju, dok su u manjoj meri prisutni i ekstrasinaptički. Prisustvo δ podjedinice u receptorskom kompleksu obezbeđuje isključivo ekstrasinaptičku lokalizaciju na membrani dendrita i some, tako da $\alpha 6\beta 2/3\delta$ i $\alpha 1\alpha 6\beta 2/3\delta$ posreduju toničnu inhibiciju (Slika 4).



Slika 4. Lokalizacija GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu na granularnim ćelijama cerebeluma sa kojima sinapsu formira GABA-ergički Goldžijev neuron. * označava receptore $\alpha 1\beta\gamma 2$ i $\alpha 1\alpha 6\beta\gamma 2$ koji su dominantno sinaptički, ali mogu biti i ekstrasinaptički (preuzeto i modifikovano iz Jacob i sar., 2008).

Kao što je već spomenuto, $\alpha 6\beta\gamma 2$ receptori predstavljaju $\alpha\beta\gamma$ receptorski kompleks koji je neosetljiv na dejstvo diazepama i drugih liganda koji se vezuju za benzodiazepinsko mesto. Pozitivnu modulaciju posredstvom ovih receptora mogu da ostvare imidazobenzodiazepin flumazenil, neki β -karbolini i flavonoid hispidulin. Drugi nebenzodiazepinski pozitivni alosterični modulatori GABA_AR kao što su loreklesol i etomidat imaju sposobnost modulacije $\alpha 6\beta\gamma 2$ receptora, ali i ostalih $\alpha 1-5\beta\gamma 2$ GABA_AR (Sieghart i Savić, 2018).

1.2.1. Studije selektivnosti i efikasnosti liganada koji deluju posredstvom $\alpha 6$ GABA_A receptora

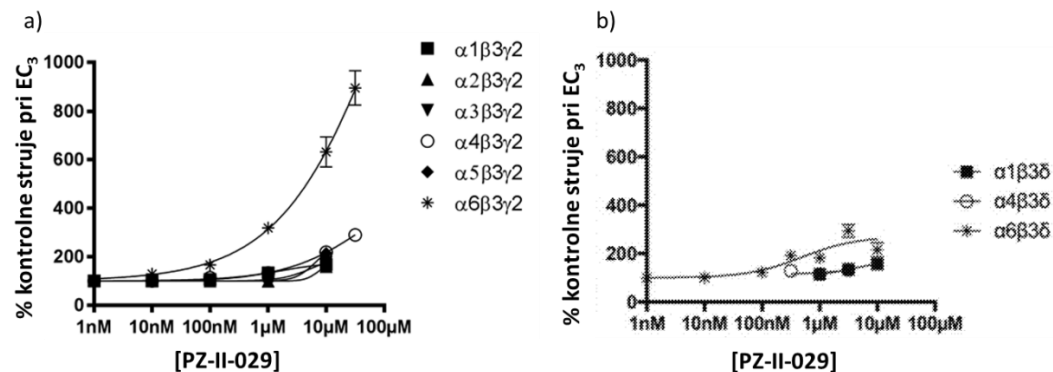
Skolnick i saradnici su 1992. godine uveli hemijsku modifikaciju u strukturu CGS 9895 (Slika 3d) koja je podrazumevala uvođenje 7-metoksi supstituenta u A prsten pirazolohinolinonske strukture (pogledati opštu strukturu u Tabeli 2), čime je dobijen ligand PZ-II-029 (jedinjenje poznato i kao supstanca 6; Tabela 2) sa povećanim afinitetom za diazepam neosetljive GABA_AR (Wong i sar., 1992). Daljim hemijskim modifikacijama (deuteracija i nitrogenovanje) A i D prstenova PQ strukture dobijeni su analozi PZ-II-029: DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3, DK-I-86-1, od kojih svi poseduju deuterijum u strukturi, a DK-I-86-1 dodatno i atom azota u D prstenu. U paralelnim istraživanjima Ernst i sar. su sintetisali LAU463, jedinjenje istog hemotipa kao i PZ-II-029 ali različitog subhemotipa (ili strukturne grupe) (Chiou i sar., 2016). Po analogiji sa PZ-II-029, uvođenjem hemijskih modifikacija (deuteracija i nitrogenovanje) u A i D prstenove PQ strukture dobijeni su analozi LAU463: DK-I-58-1 i DK-II-58, pri čemu oba poseduju deuterijum u strukturi,

a DK-II-58-1 dodatno i atom azota u D prstenu. Uvođenje atoma deuterijuma u strukture polaznih jedinjenja bilo je sa ciljem povećanja biološke raspoloživosti i dužine trajanja dejstva, jer su metoksi grupe A i D prstenova ključne pozicije za metaboličku razgradnju *in vivo* (reakcije O-demetilacije). S tim u veži, na ovaj način se povećava metabolička stabilnost (pogledati deo **Deuteracija u medicinskoj hemiji**). Takođe, povećanoj raspoloživosti doprinosi i nitrogenovanje D prstena jer se time povećava rastvorljivost ovih liganada u vodi, koja je inače veoma ograničena (pogledati deo **Formulacija pirazolohinolinona kao slabo rastvornih jedinjenja**). Ligand DK-I-87-1 pripada istom hemotipu kao PZ-II-029 i analozi i LAU463 i analozi, ali opet zasebnom subhemotipu. Posедуje –OCD₃ grupu u orto položaju D prstena (pogledati Tabelu 2 sa hemijskim strukturama). DK-I-87-1 poseduje potencijal vezivanja za $\alpha 6$ GABAR, ali ne i sposobnost aktivacije ovih receptora, što se može uočiti sa Slike 8b gde je prikazana elektrofiziologija ovog liganda koji u koncentraciji od 1 μ M ostvaruje praktično zanemarljivu modulaciju $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptora, dok modulaciju $\alpha 6\beta 3\delta$ receptora ne ostvaruje čak ni u većoj koncentraciji (10 μ M). Zato je supstanca DK-I-87-1 korišćena kao negativna kontrola u eksperimentima farmakodinamske karakterizacije. DK-I-59-1 je strukturni izomer DK-I-87-1, u čijoj je strukturi –OCD₃ grupa u meta položaju D prstena (pogledati Tabelu 2). Polazno jedinjenje za sintezu DK-I-59-1 i DK-I-87-1 je nedeuterisani *parent* molekul LAU165 koga, takođe, odlikuje selektivnost za $\alpha 6$ GABA_AR (Knutson i sar., 2018) i čija je struktura identična kao struktura DK-I-59-1 sa jedinom razlikom u tri atoma deuterijuma koja u metoksi grupi D prstena poseduje DK-I-59-1. Supstanca LAU165 nije korišćena u ovom istraživanju.

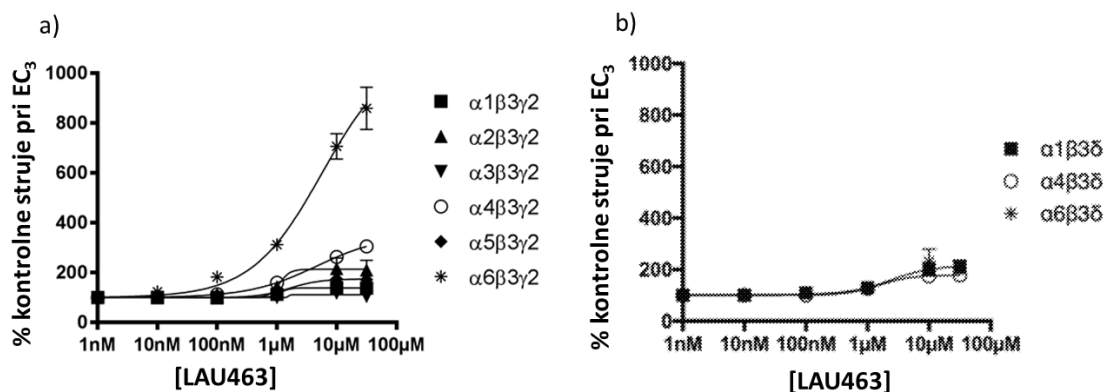
PZ-II-029 i njeni analozi i LAU463 i njeni analozi predstavljaju visoko afinitetne *silent* modulare (antagonisti) na benzodiazepinskom mestu $\alpha 1-6\beta \gamma 2$ receptora i visoko selektivne pozitivne alosterne modulare na ekstracelularnoj $\alpha 6+\beta 2/3$ - površini $\alpha 6\beta \gamma 2$ i $\alpha 6\beta \delta$ receptora (Ramerstorfer et al., 2011, Varagic et al., 2013b, Knutson i sar., 2018) (Slika 11). Na Slikama 5a, 6a i 7a gde je prikazan % modulacije GABA_AR koji sadrže $\gamma 2$ podjedinicu može se uočiti da PZ-II-029, LAU463 i DK-I-86-1 ostvaruju selektivnost u efikasnosti, dok selektivnost u afinitetu izostaje. To je u skladu sa prethodno navedenim činjenicama da se vezuju za benzodiazepinsko mesto $\alpha 1-6\beta \gamma 2$ receptora, ali da pozitivnu modulaciju ostvaruju jedino na receptorima koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u koncentracijama koje su manje od 1 μ M, a koje predstavljaju biološki relevantne koncentracije jer mogu biti dostignute na ciljnom mestu dejstva. Izostanak pozitivne modulacije GABA_AR koji sadrže ostale α podjedinice mimo $\alpha 6$, može ukazati na izuzetno povoljan bezbednosni profil deuterisanih PQ liganda u poređenju sa benzodiazepinima i drugim lekovima koji deluju na CNS. Sa druge strane, kada se posmatraju b paneli Slika 5, 6 i 7 uočava se da samo PZ-II-029 može da ostvari modulaciju $\alpha 6\beta \delta$ u koncentraciji od 1 μ M u poređenju sa LAU463 i DK-I-86-1.

Na Slici 8a prikazani su elektrofiziološki podaci deuterisanog analoga PZ-II-029, supstance DK-I-56-1, koja je u poređenju sa ostalim PQ ligandima najviše ispitivana u ovom istraživanju. Može se uočiti da se najveći stepen modulacije ostvaruje preko GABA_AR kod kojih je $\alpha 6$ podjedinica udružena sa $\gamma 2$ podjedinicom. Takođe, značajna je modulacija koju posreduju GABA_AR gde je $\alpha 6$ u receptorskom kompleksu sa δ podjedinicom u koncentraciji od 1 μ M.

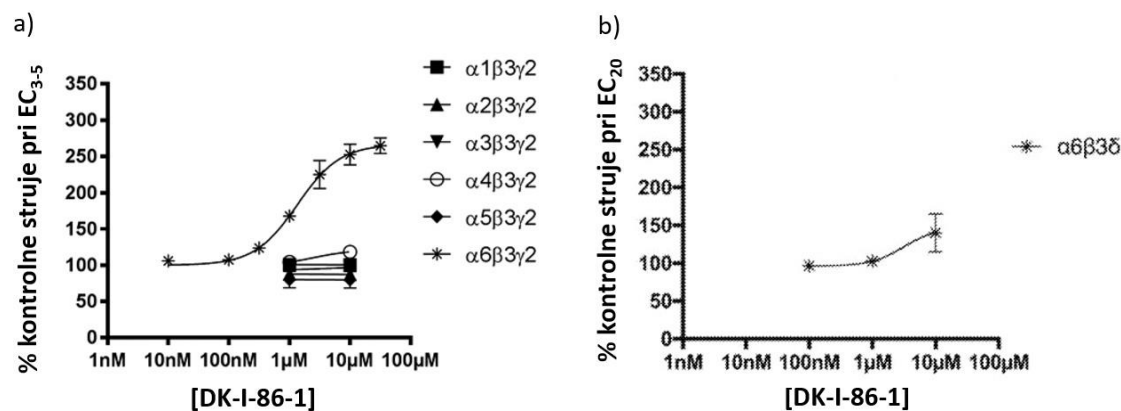
Slika 9 prikazuje elektrofiziologiju DK-I-58-1 i DK-II-58-1 koji, takođe, zauzimaju važan deo ovih istraživanja. Kao što je i prethodno napomenuto, i ovi ligandi ostvaruju pozitivnu modulaciju GABA_AR sa funkcionanom selektivnošću za $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptore.



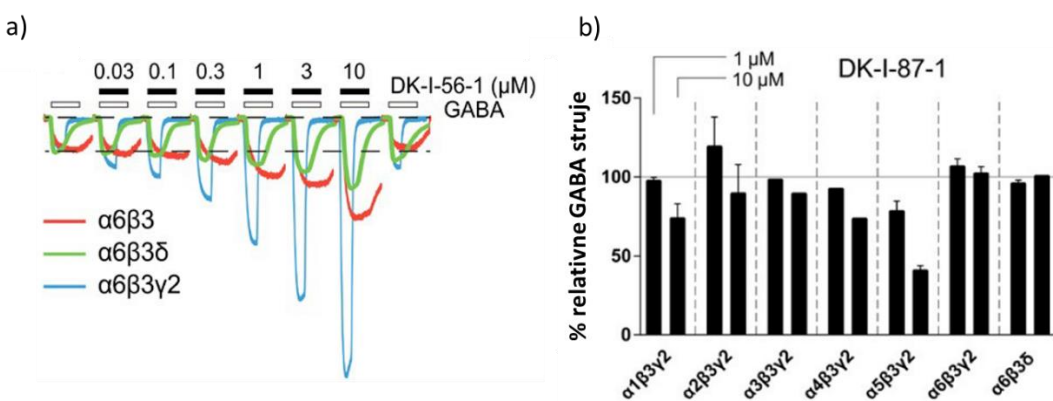
Slika 5. Krive efikasnosti za PZ-II-029 na GABA_A receptorima koji uključuju $\gamma 2$ podjedinicu (a), odnosno δ podjedinicu (b), pri EC₃ GABA. Vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu \pm standardna greška na 4–6 oocita iz najmanje dve serije. Supstanca PZ-II-029 ima komparabilan afinitet za sve tipove GABA_A receptora koji sadrže $\gamma 2$ podjedinicu, ali modulaciju kontrolne struje pri EC₃ GABA-e ostvaruje jedino na receptorima koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u biološki relevantnim koncentracijama (niže od 1 μ M). Relativno značajan % modulacije PZ-II-029 ostvaruje i na $\alpha 6\beta 3\delta$ receptorima pri koncentraciji koja ima biološki značaj (1 μ M) (Preuzeto iz: Knutson i sar., 2018; Chiu i sar., 2016).



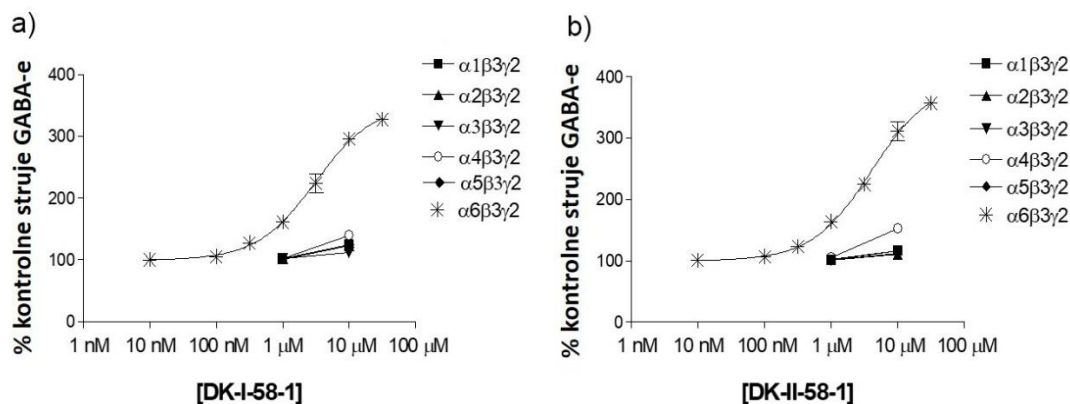
Slika 6. Krive efikasnosti za LAU463 na GABA_A receptorima koji uključuju $\gamma 2$ podjedinicu (a), odnosno δ podjedinicu (b), pri EC₃ GABA. Vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu \pm standardna greška na 4–6 oocita iz najmanje dve serije. Supstanca LAU463 ima komparabilan afinitet za sve tipove GABA_A receptora koji sadrže $\gamma 2$ podjedinicu, ali modulaciju kontrolne struje pri EC₃ GABA-e ostvaruje jedino na receptorima koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u biološki relevantnim koncentracijama (niže od 1 μ M). Pri takvim koncentracijama LAU463 praktično ne ostvaruje modulaciju kontrolne struje pri EC₃ GABA-e na $\alpha 6\beta 3\delta$ receptorima. (Preuzeto iz: Knutson i sar., 2018; Chiu i sar., 2016).



Slika 7. Krive efikasnosti za DK-I-86-1 na GABA_A receptorima koji uključuju $\gamma 2$ podjedinicu pri EC_{3.5} (a), odnosno δ podjedinicu pri EC₂₀ (b) GABA. Vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu \pm standardna greška na 4–6 oocita iz najmanje dve serije. Supstanca DK-I-86 ima komparabilan afinitet za sve tipove GABA_A receptora koji sadrže $\gamma 2$ podjedinicu u rasponu koncentracija od 1 μ M do 10 μ M, ali modulaciju kontrolne struje pri EC₃ GABA-e ostvaruje jedino na receptorima koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u biološki relevantnim koncentracijama (niže od 1 μ M). Pri takvim koncentracijama praktično ne ostvaruje modulaciju kontrolne struje pri EC₃ GABA-e na $\alpha 6\beta 3\delta$ receptorima (Preuzeto iz: Knutson i sar., 2018; Chiou i sar., 2016).



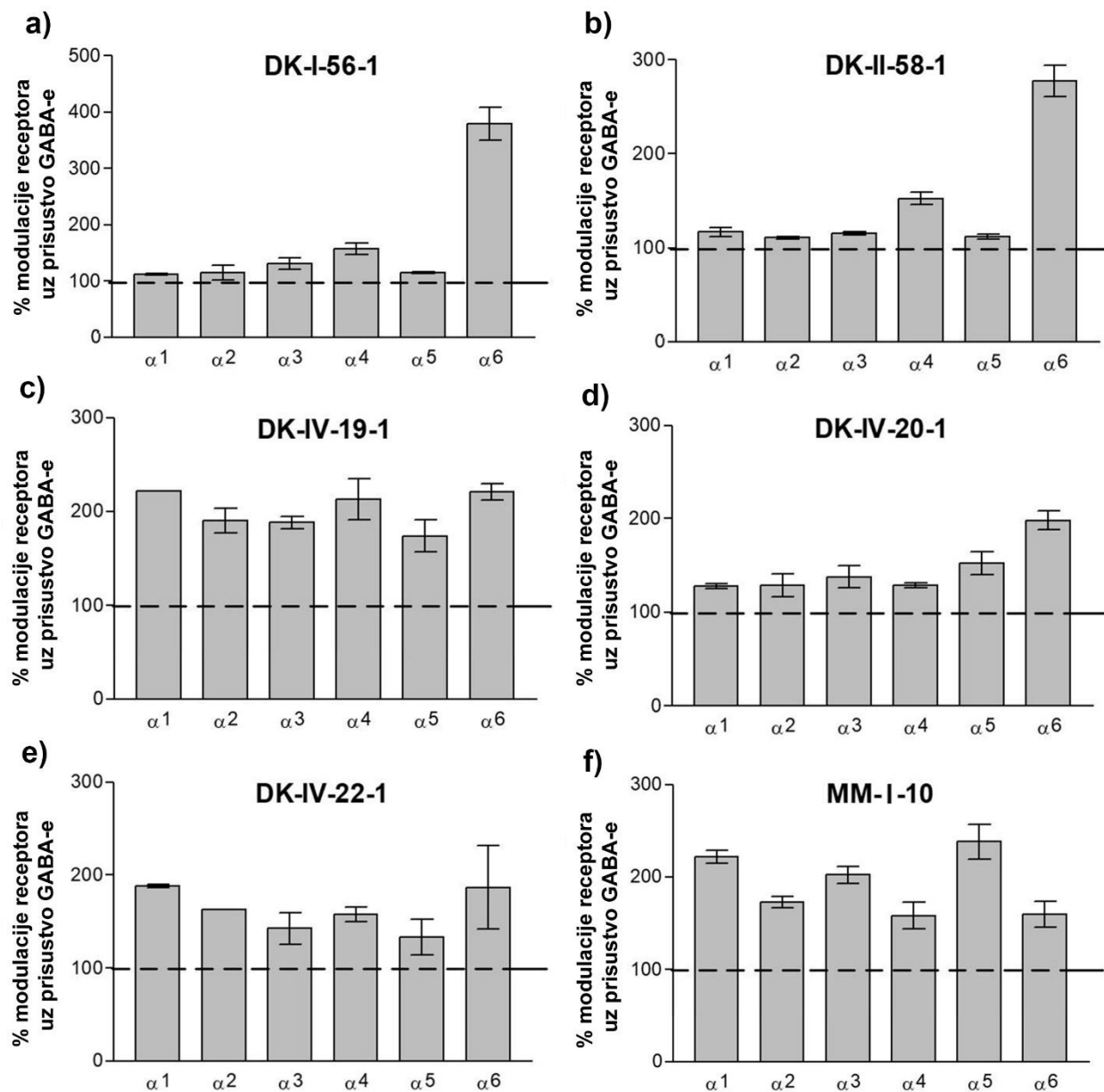
Slika 8. (a) Elektrofiziološki zapisi odgovora ćelija koje eksperimentiraju $\alpha 6\beta 3\gamma 2$, $\alpha 6\beta 3\delta$ i $\alpha 6\beta 3$ GABA_A receptore uz primenu fiksne koncentracije GABA-e i rastućih koncentracija DK-I-56-1 u opsegu od 0,03 do 10 μ M (b) Stubičasti dijagram predstavlja modulatorene efekte DK-I-87-1 primenjenog u dve koncentracije (1 μ M i 10 μ M) na $\alpha 1$ - $\beta 3\gamma 2$ kao i $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_A receptorima. DK-I-56-1, ali ne i DK-I-87-1, pozitivni je modulator $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptora u koncentracijama manjim od 1 μ M, koje predstavljaju relevantne koncentracije u kontekstu biološkog sistema (preuzeto i modifikovano iz Vasović i sar., 2018).



Slika 9. Krive efikasnosti za DK-I-58-1 (a) i DK-II-58-1 (b) na GABA_A receptorima koji uključuju γ 2 podjedinicu. Vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu \pm standardna greška na 4–6 oocita iz najmanje dve serije. Obe supstance imaju komparabilan afinitet za sve tipove GABA_A receptora koji sadrže γ 2 podjedinicu u rasponu koncentracija od 1 μ M do 10 μ M, ali modulaciju kontrolne struje GABA-e ostvaruju jedino na receptorima koji sadrže α 6 podjedinicu u biološki relevantnim koncentracijama (niže od 1 μ M) (podaci preuzeti iz nepublikovanih rezultata saradničkih laboratorija; Katedra za hemiju i biohemiju Instituta za otkriće lekova Milvoki, Univerzitet u Viskonsinu, Milvoki, SAD).

Potruga za daljim poboljšanjem bioraspoloživosti funkcionalno selektivnih α 6 liganada dovela je do istraživanja fluorovanih analoga PQ liganada. Naime, uvođenje trifluorometoksi supstituenata predstavlja alternativnu taktiku za ograničavanje *in vivo* O-demetilacije metoksi grupa prethodno opisanih potencijalnih *lead* jedinjena (Park i sar., 2001). Utvrđeno je da fluorovanje poboljšava metaboličku stabilnost, menja farmakokinetička svojstva molekula, dok, takođe, utiče na njegovu permeabilnost kroz membrane i intrinzičnu jačinu vezivanja za ciljani receptor (Gillis i sar., 2015). Fluor pokazuje najveću elektronegativnost u periodnom sistemu elemenata i kada je vezan za ugljenik formira izuzetno jaku vezu. C-F veza (98-115 kcal/mol) je mnogo jača od C-H veze (89-110 kcal/mol) (Blanksby i Ellison, 2003; O'Hagan, 2008). Dakle, fluorovanje predstavlja atraktivan pristup za poboljšanje metaboličke stabilnosti i bioraspoloživosti lekova kandidata (Meanwell, 2018; Johnson i sar. 2020).

U tom kontekstu, ispitana je selektivnost u efikasnosti četiri liganda sa 4'-OCF₃ i/ili 7-CF₃ grupama (DK-IV-19-1, DK-IV-20-1, DK-IV-22-1 i MM-I-1; pogledati strukture u Tabeli 2) na α 6 β 3 γ 2 GABA_AR (Slika 10). Međutim, ovi ligandi su izgubili selektivnost kako u afinitetu tako i u efikasnosti. Radi poređenja, na slici su predstavljeni i podaci za dva liganda, DK-I-56-1 i DK-II-58-1 čija je elektrofiziologija već objašnjena. Uočava se da je i stepen modulacije α 6 β 3 γ 2 GABA_AR fluoriranim analogima znatno niži u poređenju sa stepenom modulacije koju na pomenutim receptorima ostvaruju DK-I-56-1 i DK-II-58-1. Samo je DK-IV-20-1 (Slika 10d) sa supstituentima 4'-OCF₃ i 7-OCD₃ zadržao α 6 funkcionalnu selektivnost, ali je stepen modulacije receptora znatno manji u odnosu na modulaciju koju ostvaruju DK-I-56-1 i DK-II-58-1.

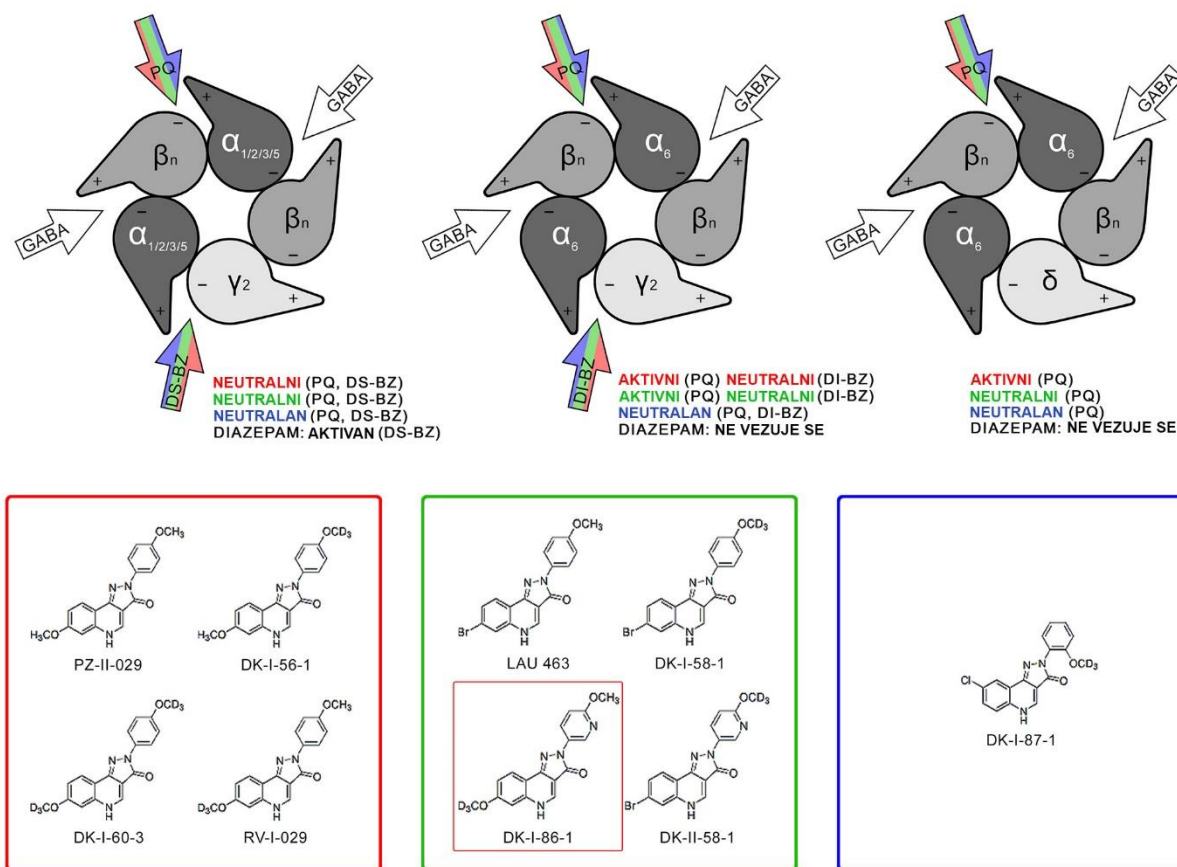


Slika 10. Uticaj $-\text{CF}_3$ supstitucije na A prstenu i/ili supstitucije $-\text{OCF}_3$ na D prstenu pirazolohinolinonske strukture polaznih liganada na aktivnost na $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA_A receptorima. Na panelima **a)** i **b)** prikazani su podaci za DK-I-56-1 i DK-II-58-1 kao referentne ligande funkcionalno selektivne za pomenuti podtip receptora u cilju poređenja sa podacima fluoriranih analoga DK-IV-19-1 (c), DK-I-20-1 (d), DK-IV-22-1 (e) i MM-I-10 (f). Prikazani elektrofiziološki podaci su dobijeni sa primenom koncentracije od 10 μM za sve ligande. Uvođenjem navedenih hemijskih promena u polazne strukture dobijeni su fluorirani ligandi sa samnjenom selektivnošću i aktivnošću na $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA_A receptorima (podaci preuzeti iz nepublikovanih rezultata saradničkih laboratorija; Katedra za hemiju i biohemiju Instituta za otkriće lekova Milvoki, Univerzitet u Viskonsinu, Milvoki, SAD).

Na osnovu elektrofizioloških podataka iz studija selektivnosti i efikasnosti, kao i izvesnih strukturnih razlika, može se napraviti distinkcija među različitim predstavnicima nominalno homogenog hemotipa, na osnovu kojih su formirani izvesni subhemotipovi ili strukturne grupe

liganada koji su predstavljeni na Slici 11. Kroz određene eksperimente u prezentovanom istraživanju procenjivano je da li predstavnici u okviru jednog subhemotipa ostvaruju sličnu bilošku aktivnost, a sa druge strane da li predstavnici različitih subhemotipova ostvaruju različite biloške efekte.

Sumiranjem svega što je prethodno izloženo, testirani ligandi se mogu vezati na GABA_AR za različita vezna mesta: DS i DI benzodiazepinska mesta, gde deluju kao neutralni modulatori (*silent*), kao i za PQ mesto. U zavisnosti od elektrofiziološkog ishoda vezivanja liganada date strukturne grupe za odgovarajuće PQ mesto na različitim subpopulacijama GABA_AR, interakcija se može označiti kao funkcionalno neutralna ili aktivna. Konkretno, kod GABA_AR u čiji sastav receptorskog kompleksa ulazi $\gamma 2$ podjedinica, nijedan od liganada ne aktivira receptore koji sadrže $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ili $\alpha 5$ podjedinicu, dok predstavnici PZ-II-029 i LAU463 serije jedinjenja aktiviraju one receptore koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu. Međutim, na receptorima koji sadrže δ i $\alpha 6$ podjedinicu, za koje se svi testirani ligandi vezuju preko PQ mesta, samo PZ-II-029 i njegovi analozi, sa izuzetkom DK-I-86-1, mogu da deluju kao pozitivni modulatori, kao što je prikazano i na Slikama 6b, 7b i 8b.



Slika 11. Sastav i raspored podjedinica tri klase GABA_A receptora (modifikovane prema Sieghart i sar., 2022). Na ovim receptorima predstavnici tri strukturne grupe (subhemotipa) pirazolohinolinonskih liganada (PZ-II-029 i srodni analozi: DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3 crveno uokvireni; LAU 463 i srodni analozi: DK-I-58-1 i DK-II-58 zeleno uokvireni i DK-I-87-1 plavo uokvireni) mogu delovati preko tri tipa vezivnih mesta predstavljenih strelicama duginih boja: DS-BZ – benzodiazepinsko mesto osetljivo na diazepam; DI-BZ – benzodiazepinsko mesto neosetljivo na diazepam; PQ – pirazolohinolinonsko mesto. Oznake

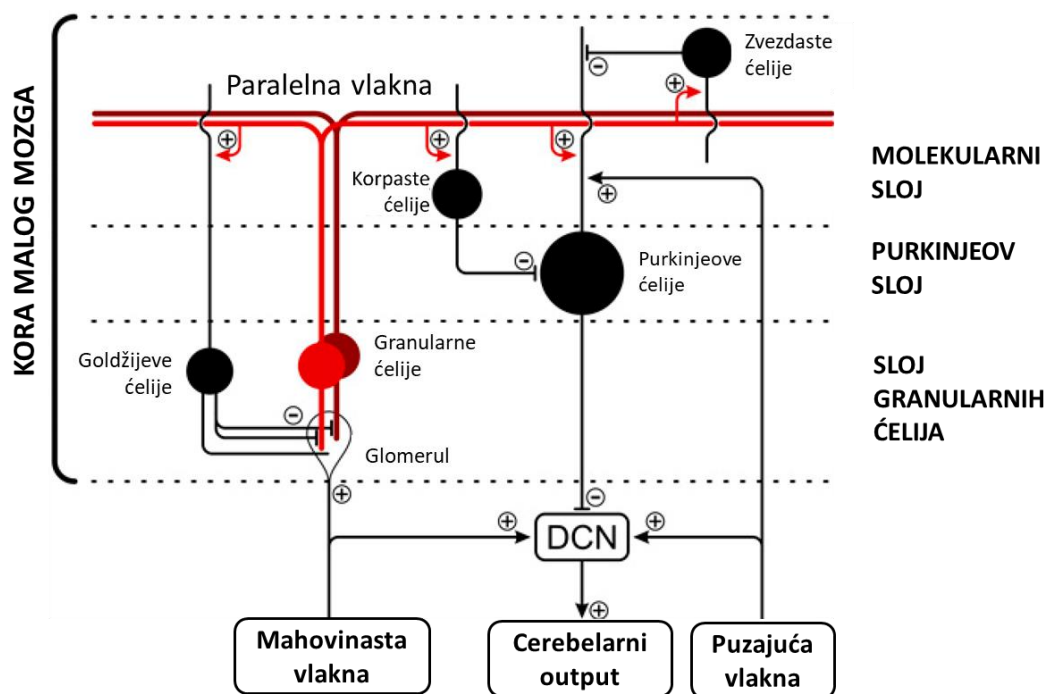
neutralni/aktivni odnose se na elektrofiziološki ishod vezivanja datih strukturnih grupa za odgovarajuće mesto vezivanja (Knutson i sar., 2018, Vasović i sar., 2019; Chiou i sar., 2016 i Varagić i sar., 2013b). Kako je protumačeno u diskusiji, DK-I-86-1 strukturno pripada grupi PZ-II-029 i analoga, ali njegov elektrofiziološki odgovor i bihevioralni rezultati odgovaraju onima koje je postigao LAU463 i analozi (mali crveni okvir unutar zelenog okvira).

Fluorirani ananlozi nisu svrtani u subhemotipove, jer ih odlikuje neselektivnost u afinitetu i efikasnosti u kontekstu GABA_AR koji sadrže $\gamma 2$ podjedinicu, ali je u eksperimentima koji slede urađena njihova bazična farmakokinetička i bihevioralna karakterizacija.

1.2.2. Funkcionalna organizacija cerebelarnih kola i uloga $\alpha 6$ GABA_A receptora

U građi malog mozga razlikuju se kora i duboka jedra malog mozga. Kora se sastoji od tri sloja: molekularni sloj, Purkinjeove ćelije i granularni sloj, a duboka jedra čine interpozicionirana (nucleus fastigi, emboliformis i globosis) i dentatna jedra.

U kori malog mozga neuroni su organizovani u mikrokola koja se u velikoj meri ponavljaju (Slika 12). Nakon što prime specifične senzorne i kontekstualne informacije, na nivou mikrokola meri se ili predviđa vremenski interval za motornu aktivnost koja je potrebna za pokrete odgovarajućih delova tela (Sieghart i sar., 2022).



Slika 12. Pojednostavljeni shematski prikaz cerebelarnog mikrokola. Ekscitatorni terminali su označeni vrhovima strelica i znakom plus, dok su inhibitorni terminali predstavljeni tupim T-krajevima i znakom minus. Završna struktura mahovinastih vlakana koja je poznata kao cerebelarni glomerul prikazana je kao završetak u obliku kapi. Granularne ćelije sa svojim shematskim procesima su naglašene crvenom bojom. DCN – duboki cerebelarni nukelusi (pruzeto i prilagođeno iz Sieghart i sar., 2022).

Mali mozak poseduje dva ekscitatorna ulaza koja obezbeđuju mahovinasta, odnosno puzajuća vlakna i koja koriste glutamat kao neurotransmiter. Mahovinasta vlakna (eng. *mossy fiber*) prenose signale o planiranom programu mišićnih kontrakcija koje dolaze iz moždane kore i drugih delova mozga, dok puzajuća vlakna (eng. *climbing fiber*) prenose korektivne signale koji se generišu u slučaju da se pokret ili radnja ne izvodi tačno onako kako je nameravano. U tom slučaju cerebelarno kolo uči da sledeći put poveća ili smanji obim izvršenja, promenama ekscitabilnosti odgovarajućih cerebelarnih neurona, što omogućava da se naredne kontrakcije bolje usaglasa sa nameravanim pokretima (D'Angelo i sar., 2013). Jedini izlaz malog mozga posredovan je GABA-ergičkim Purkinjeovim ćelijama koje prenose informacije iz cerebelarnih krugova kao inhibitorne signale do dubokih jedara malog mozga preko $\alpha 1\beta\gamma 2$ GABA_AR.

Granularne ćelije predstavljaju ekscitatorne interneurone, koji primaju ekscitatorne inpute preko mahovinastih vlakana, a inhibitorne signale preko Goldžijevih ćelija. Sinaptički kontakt terminala mahovinastih vlakana, dendrita nekoliko granularnih ćelija, aksona i dendrita nekoliko Goldžijevih ćelija obavijen je glija ćelijama gradeći strukturu koja se označava kao cerebelarni glomerul (Mapelli et al., 2014). Ograničavajući prostor sinaptičkog kontakta, glomerul obezbeđuje optimalne uslove za GABA-u oslobođenu iz Goldžijevih ćelija da aktivira i ekstrasinaptičke receptore na dendritima granularne ćelije, kao i $\alpha 6\beta\gamma 2$ receptore prisutne na nekim od ekscitatornih mahovinastih vlakana, potencijalno ograničavajući ekscitaciju posredovanu ovim sinapsama i na taj način izoštravajući njihov glavni ekscitatorni signal. Aksoni granularnih ćelija prolaze kroz molekularni sloj, gde formiraju paralelna vlakna koja dalje formiraju ekscitatorne sinapse sa Purkinjeovim i Goldžijevim ćelijama. Kada ih aktiviraju mahovinasta vlakna unutar glomerula, Goldžijeve ćelije mogu direktno inhibirati granularne ćelije. Dodatno, Goldžijeve ćelije mogu da inhibiraju granularne ćelije u petlji povratne sprege nakon aktivacije Goldžijevih ćelija preko uzlaznih aksona i paralelnih vlakana granularnih ćelija. GABA koja se oslobađa iz presinaptičkog terminala Goldžijevih ćelija aktivira postsinaptičke receptore koji sadrže $\alpha 1$ i delimično $\alpha 6$ podjedinicu. Za razliku od $\alpha 6\beta\gamma 2$ receptora, $\alpha 1\beta\gamma 2$ receptori se brzo otvaraju i zatvaraju (Sieghart i sar., 2022).

Iako, dinamična priroda i izuzetna vremenska osetljivost cerebelarnih kola zahtevaju visoko precizan fazni inhibitorni mehanizam, ipak tonična inhibicija u sinapsama Goldžijevih i granularnih ćelija obezbeđuje najmanje 97% inhibicije granularnih ćelija. Tonična inhibicija smanjuje frakciju granularnih ćelija aktiviranih ulaznim mahovinastim vlaknima i može da kontroliše ekscitabilnost neurona na sinapsi mahovinastih vlakana i granularnih ćelija (Mapelli et al., 2014). Takvi procesi su uključeni u poboljšanje prepoznavanja obrazaca u Purkinjeovim ćelijama, na primer razlikovanjem važnih (jak stimulus) i nevažnih (slab stimulus) informacija. Savršeno izbalansirana funkcija ekstrasinaptičkih $\alpha 6$ GABA_AR je, takođe, od suštinskog značaja, jer njihova prekomerna aktivnost (ili prekomerna stimulacija lekovima kao što je etanol) može da poremeti sinhrono pokretanje granularnih ćelija, izazivajući poremećaje u motoričkim programima, dok nedovoljna aktivnost može da izazove probleme u kognitivnim performansama, socijalnom i ponašanju povezanim sa stresom (Rudolph, 2020).

Granularne ćelije, osim što aktiviraju Purkinjeove i Goldžijeve ćelije, generišu i bočnu inhibiciju Purkinjeovih ćelija aktiviranjem zvezdastih ćelija (eng. *stellate cells*) (koje sinapsu grade sa dendritima Purkinjeovih ćelija) i korpastih ćelija (eng. *basket cells*) (koje sinapsu grade sa somom

Purkinjeovih ćelija). Purkinjeove ćelije predstavljaju glavne izlazne neurone iz kore malog mozga, obezbeđujući inhibitornu kontrolu nad dubokim cerebelarnim jedrima (Sieghart i sar., 2022).

Neuroni dubokih cerebelarnih jedara spontano generišu desetine akcionih potencijala u sekundi kada životinje nisu angažovane u ponašanju koje zavisi od malog mozga (Pugh i Raman, 2009) verovatno da bi se održao stalni mišićni tonus. Mahovinasta vlakna direktno mogu da izazovu depolarizaciju neurona dubokih cerebelarnih jedara. Međutim, njihovo okidanje se nastavlja tek posle aktivne hiperpolarizacije koju izaziva GABA-ergički Purkinjeov neuron. Ovakva regulacija ima za cilj da duboka cerebelarna jedra nastave sa aktiviranjem u sinhronizaciji sa Purkinjeovim ćelijama (Sieghart i sar., 2022).

Prikupljeni dokazi ukazuju na to da podgrupe Purkinjeovih ćelija sinhronizuju svoje paljenje tokom ponašanja koje zahteva mali mozak, na primer u naučenom motoričkom zadatku kod pacova, a povećanje sinhronizacije je vremenski vezano za kretanje. Sinhronizovani inhibitorni ulaz sa Purkinjeovih ćelija određuje vreme i brzinu akcionih potencijala koje proizvode neuroni dubokih cerebelarnih jedara, čime se prenose informacije iz malog mozga (Sieghart i sar., 2022). $\alpha 6$ GABA_AR su opisani u kontekstu brojnih animalnih modela (shizofrenija, poremećaj tikova, Angelmanov sindrom, Daunov sindrom, depresija, deficit pažnje i hiperaktivnost, neželjeni efekti etanola). Od posebnog značaja su animalni modeli bolova vezanih za trigeminalni nerv, kao što su trigeminalna neuropatija i migrena.

1.3. Uloga malog mozga u funkciji centralnog nervnog sistema

Kroz regulaciju senzorno-motornih funkcija i kontrolu pokreta svih mišića u telu, uključujući i one koji kontrolišu emocionalne izraze lica i govor, mali mozak je, praktično, uključen u svu našu komunikaciju i sve reakcije na okolni svet. Informacije iz svih čula analiziraju se i integrišu u određenim regionima mozga, pri čemu se pokreću kontekstualno specifični motorički programi u motornom delu kore velikog mozga, koji se zatim prenose do malog mozga preko mahovinastih vlakana. Ovi motorni programi se dalje prilagođavaju i optimizuju shodno trenutnim potrebama organizma, a u skladu sa senzornim informacijama koje u mali mozak stižu preko ushodnih vlakana. Formirajući recipročna, zatvorena kola sa velikim delom kore velikog mozga i sa subkortikalnim strukturama, mali mozak je uključen u pažnju i kognitivne performanse, u jezičku i emocionalnu obradu informacija, kao i u kontrolu sistema nagrađivanja i socijalnog ponašanja (Sieghart i sar., 2022). Za motornu koordinaciju odgovoran je prednji mali mozak, a za kognitivne funkcije zadnji režanj malog mozga. S tim u vezi Purkinjeove ćelije iz zadnjeg lateralnog malog mozgu ostvaruju vezu sa neuronima dubokih cerebelarnih jedara prenoseći na taj način informacije iz korteksa malog mozga u prefrontalni korteks preko talamusa. Lezije u strukturama malog mozga – vermisu i fastigijalnom jedru izazivaju „cerebelarni kognitivni afektivni sindrom” (Schmahmann i Sherman, 1998) koji uključuje poremećaje kontrole pažnje, socijalnih veština i emocionalne kontrole, što se vidi kod pacijenata sa bolestima iz spektra autizma i psihoza. Mali mozak, takođe, ostvaruje ekstenzivne veze sa ventralnim tegmentalnim područjem, koje je uključeno u puteve nagrađivanja, kao i sa bazalnim ganglijama, pružajući neuronsku osnovu za uključivanje malog mozga u nastanak Parkinsonove bolesti, distonije, Tourette-ovog sindroma i zavisnosti (Sieghart i sar., 2022).

U odnosu na druge regione mozga, humani mali mozak doživljava ogroman rast između 24. i 40. nedelje nakon začeća, povećavajući se otprilike pet puta u zapremini i preko 30 puta u površini. Dok se ovaj brzi rast malog mozga usporava postnatalno, neuronska diferencijacija i rast aksonskih ulaza i izlaza nastavlja se tokom prve postnatalne godine. Značajan prenatalni rast, koji se nastavlja postnatalno, čini mali mozak posebno ranjivim na poremećaje i oštećenja u razvoju (D'Mello i Stoodley, 2015). Abnormalnosti u strukturi, povezanosti i funkciji malog mozga identifikovane su kod pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima, kao što su poremećaji iz spektra autizma, shizofrenija i disleksija, te bi stoga mogli biti uzročno povezani sa promenama u emocionalnom, kognitivnom i socijalnom ponašanju ovih pacijenata (Sieghart i sar., 2022).

Iz navedenog opisa strukture i funkcije malog mozga može se sagledati uloga $\alpha 6$ GABA_AR u neuropsihijatrijskim poremećajima. Sinaptički i ekstrasinaptički $\alpha 6$ GABA_AR su od centralnog značaja za funkcionisanje malog mozga. Značajan poremećaj u njihovoj ekspresiji ili funkciji može da dovede ne samo do motoričke nekoordinacije, ataksije, distonije i epilepsije, već i da doprinese neuropsihijatrijskim poremećajima. Nedavno je otkriveno da se delecijom δ podjedinice GABA_AR, a time i receptora $\alpha 6\beta\delta$ na granularnim ćelijama malog mozga miševa, smanjuje tonična inhibicija, što dovodi do hiperekscitabilnosti granularnih ćelija i do diferencijalne aktivacije mnogih kortikalnih i subkortikalnih područja mozga uključenih u kogniciju, ponašanje slično anksioznosti i odgovor na stres kod ženki (Rudolph et al., 2020).

1.4. Neuralni mehanizam kraniofacijalnih bolova

Bol se danas konceptualizuje kao višedimenzionalno iskustvo koje obuhvata senzornu, kognitivnu, emocionalnu i motivacionu dimenziju.

Razlikuje se fiziološki (nociceptivni) i patološki (neuropatski i inflamatorni) bol. Dok je fiziološki bol prolazan i ima protektivnu ulogu kao upozoravajući signal o potencijalnom oštećenju tkiva dejstvom različitih štetnih stimulusa, patološki bol je perzistentan, nema odbrambenu niti drugu značajnu svrhu (Takeda i sar., 2011). Inflamatorni bol je iniciran oštećenjem/inflamacijom tkiva, a neuropatski bol lezijama nervnog sistema. Oba karakterišu promene somato-senzornih puteva, što za posledicu ima preosetljivost na mestu oštećenja i u susednom zdravom tkivu i abnormalan bolni odgovor uzrokovan štetnim stimulusima (hiperalgezija) kao i onim stimulusima koji su kod zdrave jedinke neškodljivi (alodinija). Preosetljivost kod inflamatornog bola obično prolazi ukoliko se kontroliše proces bolesti. Neuropatski bol traje dugo nakon što je inicijalni događaj koji ga je uzrokovao zalečen i predstavlja izraz patološkog funkcionisanja nervnog sistema pre nego reakcija na oštećenje tkiva. Neuralna plastičnost odgovorna za kliničku preosetljivost na bol ima dva opšta oblika, modulaciju i modifikaciju (Woolf i Salter, 2000). Modulacija predstavlja reverzibilne promene u ekscitabilnosti primarnih senzornih i centralnih neurona posredovane posttranslacionim promenama na receptorima i jonskim kanalima koje se dešavaju aktivacijom intracelularne kaskade procesa prilikom transdukcije signala. Modifikacija predstavlja dugotrajne promene u ekspresiji transmitera, receptora i jonskih kanala ili u strukturi, povezanosti i preživljavanju neurona, tako da sistem biva modifikovan, narušavajući normalnu funkciju relacije stimulans-odgovor. Ističu se dva opšta obrasca centralne modifikacije: 1) povećanje ekspresije receptora u neuronima dorzalnih rogova kičmene moždine nakon oštećenja perifernog tkiva i razvoja inflamatorne reakcije sa ciljem povećanja transmisije u primarnim senzornim neuronima i

2) smanjenje inhibicije prenosa impulsa nakon povrede nerva koje može nastati smanjenjem transmitera, broja receptora ili gubitkom inhibitornih interneurona. Povreda nerva verovatno dovodi do smrti ćelija u površinskim laminama dorzalnog roga kičmene moždine gde su koncentrisani inhibitorni interneuroni, što za posledicu ima stvaranje dezinhibicije i olakšanu transdukciju bolnih stimulusa (Woolf i Salter, 2000).

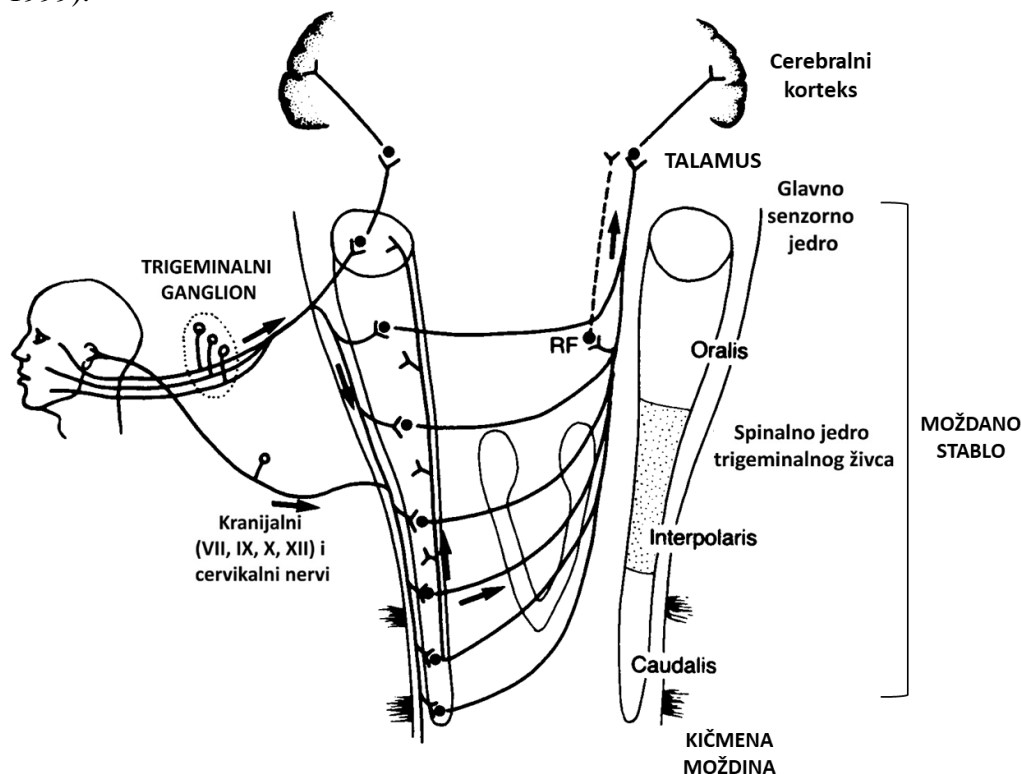
U skladu sa tim, povreda ili inflamacija tkiva orofacijalne regije koje inerviše trigeminalni živac dovodi do promene svojstava somato-senzornih puteva trigemina uzrokujući preosetljivost u reakcijama (Takeda i sar., 2011).

Shematski prikaz glavnog somatosenzornog puta koji prenosi senzorne nadražaje iz regije usta i lica inervisane trigeminalnim nervom predstavljen je na Slici 13. Slobodni nervni završeci u kraniofacijalnoj regiji imaju ulogu nociceptora. Traumatsko oštećenje tkiva izazvano noksičnim stimulusima dovodi do inflamatorne reakcije koju karakteriše aktivacija inflamatornih ćelija i oslobađanje medijatora (bradikinin, histamin, serotonin, prostaglandin E₂) koji deluju preko G-protein-vezanih receptora i indukuju aktivaciju protein kinaza A i C u perifernim terminalima nociceptivnih aferentnih vlakana (Takeda i sar., 2011). Dalje, u kaskadi transdukcije signala dolazi do fosforilacije nekoliko tipova jonskih kanala uključujući vaniloidni receptor tipa 1 (eng. *TRPV1*, *transient receptor potential vaniloid type 1*; ima ulogu u regulaciji telesne temperature, omogućava detekciju visokih temperatura kao noksičnog stimulusa), kao i voltažno zavisne Na⁺ i K⁺ kanale. U ovakvim okolnostima, prag za aktivaciju TRPV1 se smanjuje tako da se kanal otvara u opsegu normalne telesne temperature. Dodatno, povećava se broj ovih kanala što sve zajedno doprinosi olakšanom stvaranju akcionih potencijala (inflamatorna hiperalgezija). Slično tome, promene u funkciji voltažno zavisnih Na⁺ i K⁺ kanala predstavljaju važan faktor u inflamatornom bolu jer nociceptivni neuroni postaju hiperekscitabilni, što je karakterisano smanjenjem praga za aktivaciju i povećanjem brzine generisanja akcionih potencijala (Stewart i sar., 2003; Yoshimura i de Groat, 1999). Nakon aktivacije nociceptivnih nervnih završetaka u orofacijalnim tkivima, akcioni potencijal se dalje prenosi preko nemijelinizovanih A-delta (A δ) i C vlakana čija se tela nalaze u trigeminalnom ganglionu i koji u CNS prenose informaciju o kvalitetu, lokalizaciji, intenzitetu i trajanju bola (Sessle, 2011). A δ i C nervna vlakna predstavljaju primarna aferentna vlakna (neuroni prvog reda) u putu prenosa bolnih nadražaja.

Na navedeni način generiše se odgovor na dejstvo noksičnog stimulusa i oštećenje tkiva što predstavlja akutnu primarnu hiperalgeziju. S druge strane, povredom orofacijalnih struktura i tkiva može se razviti hroničan neuropatski bol koji se naziva trigeminalna neuropatija, jer se date strukture nalaze u inervacionoj zoni trigeminalnog živca.

Iz trigeminalnog gangliona informacija se dalje prenosi preko nervnih produžetaka do trigeminalnog kompleksa jedara u moždanom stablu koji se deli na glavno senzorno jedro i spinalno jedro trigeminalnog živca. U spinalnom jedru trigeminalnog živca koje je podeljeno na tri dela *pars oralis*, *pars interpolaris* i *pars caudalis*, nalazi se telo sekundarnog neurona (neuron drugog reda) u bolnom putu. Na osnovu anatomskih, kliničkih i elektrofizioloških istraživanja, smatra se da je *pars caudalis* najznačajnije relejno mesto u putu prenosa bolnih nadražaja (Sessle, 1999). Pokazano je da *pars caudalis* po svojoj organizaciji podseća na dorzalne robove sive mase kičmene moždine (Bereiter i sar., 2000). S tim u vezi, pretpostavlja se da povredom grane trigeminalnog nerva dolazi do centralne modifikacije koja podrazumeva olakšano provođenje bolnih nadražaja (prethodno detaljno objašnjeno).

Neuroni iz svih delova trigeminalnog kompleksa jedara mozdanog stabla projektuju se u druge delove mozga uključujući retikularnu formaciju i talamus gde se nalazi centralni supstrat koji je odgovoran za autonomne i mišićne reflekse kao dogovor na kraniofacijalne stimulse. Delovi talamusa za koje je utvrđeno da primaju i odašilju somato-senzorne informacije iz kraniofacijalne regije su ventroposteriorno jedro, tzv. posteriorna grupa jedara i medijalni talamus u kojima se nalaze tela tercijarnih neurona (neuron trećeg reda). Aksoni neurona iz pomenutih delova talamusa dalje se projektuju u nekoliko regiona kore velikog mozga uključujući somatosenzorni korteks i prednji cingularni korteks koji su odgovorni za senzornu, afektivnu i motivacionu dimenziju bola (Sessle, 1999).



Slika 13. Shematski prikaz glavnog somatosenzornog puta koji prenosi senzorne nadražaje iz regije usta i lica koje inervišu tri glavne grane trigeminalnog živca (*nervus ophthalmicus*, *nervus maxilaris* i *nervus mandibularis*) i nekoliko manjih grana. Trigeminalni put čine primarni aferentni neuroni koji se pružaju preko trigeminalnog ganglionia do sekundarnih neurona u trigeminalnom senzornom i spinalnom jedru. Oni se dalje projektuju do drugih delova mozga, talamusa i retikularne formacije (RF), a zatim u nekoliko regiona kore velikog mozga. Prikazane su dodatne projekcije cervikalnih i nekih kranijalnih (VII, IX, X i XII) nerava koji se pridružuju trigeminalnom putu (preuzeto i prilagođeno iz Sessle, 1999).

1.4.1. Trigeminalna neuropatija

Orofacijalna regija predstavlja jedno od najčešćih mesta na telu gde se javljaju bolovi (Sessle, 2005). Trigeminalna neuralgija, bolna trigeminalna neuropatija i bolni temporomandibularni poremećaj su hronična orofacijalna bolna stanja koja imaju suštinski različite etiologije. U osnovi trigeminalne neuralgije i neuropatije leži oštećenje trigeminalnog nerva, dok temporomandibularni poremećaj nastaje aktivacijom perifernih nociceptora (Wilcox i sar., 2013). Treba imati na umu da

promene koje se javljaju na trigeminalnom nervu nisu uniformne u svim orofacijalnim bolnim stanjima. Tako se trigeminalna neuralgija i neuropatija međusobno razlikuju u promenama trigeminalnog nerva kao i u kliničkoj prezentaciji bolnog stanja. Trigeminalnu neuralgiju karakterišu paroksizmalni, oštri, probadajući naleti bola koji traju od nekoliko sekundi do minuta, dok trigeminalnu neuropatiju karakteriše kontinuiran, dugotrajan, žareći bol, manjeg intenziteta u odnosu na bol prisutan kod neuralgije. Istraživanja sugerišu da je najčešći uzrok neuralgije trigeminusa mehanička kompresija trigeminalnog nerva u zoni ulaska u trigeminalno jedro moždanog stabla, obično krvnim sudom (Nurmikko i Eldridge, 2001). Nasuprot tome, iako mali procenat pacijenata (oko 20%) sa trigeminalnom neuropatijom takođe pokazuje neurovaskularnu kompresiju, većina slučajeva je rezultat direktne traume ili inflamacije trigeminalnog nerva (Iwata i sar., 2011).

Patofiziologija traumatske trigeminalne neuropatije čiji će animalni model biti predstavljen u ovom istraživanju uključuje kaskadu događaja u funkcionisanju nervnog sistema (Benoleil i sar., 2016). Kao što je prethodno navedeno, prisutna je periferna senzitivizacija koju karakteriše prisustvo hiperalgezije i alodinije. Oštećenje nerva (u našem modelu ligatura infraorbitalnog nerva) može da indukuje apoptozu neurona koji čine dati nerv. Međutim, često se dešava da proksimalni deo neurona preživi i dođe do zalečenja. Pri tome, može doći do neorganizovanog grananja nervnih vlakana pri čemu nastaje neurom, a čije formiranje zavisi od stepena i vrste oštećenja nerava. Kompresija nerva koja predstavlja blažu povredu može da dovede do formiranja neuroma i do fokalne demijelinizacije. Regije neuroma karakteriše ektopično neuronsko pražnjenje. Ektopična aktivnost se takođe vidi u čelijskim telima povređenih nerava u trigeminalnom ganglionu. Ovim fenomenima delimično se može objasniti spontani neuropatski bol.

Nakon povrede nerva, menja se ekspresija neuropeptida u trigeminalnom ganglionu što ukazuje na funkcionalnu modifikaciju. Kao primer, A β vlakna obično prenose bezbolne stimuluse, ali usled povrede nerva ili inflamacije, fenotipske promene dovode ekspresije supstance P (Nitzan-Luques i sar., 2011). U takvim okolnostima, A β vlakna stiču sposobnost da kao odgovor na perifernu stimulaciju prenose nadražaj izazivajući bolne senzacije, što leži u osnovi fenomena alodinije (Benoleil i sar., 2016).

Poznato je da pacijenti mogu prijaviti pojačan bol tokom perioda stresa ili anksioznosti koji karakteriše povećana simpatička aktivnost (Benoleil i sar., 2016). To je verovatno uzrokovano ushodnom regulacijom α adrenergičkih receptora u dorzalnim rogovima sive mase kičmene moždine i na mestu povrede, koji su odgovorni za pojačanu osetljivost na cirkulišuće kateholamine. Izrastanje simpatičkih vlakana javlja se oko tela neurona dorzalnog korena sive mase pri čemu se povećavaju senzorno-simpatičke interakcije. Ovaj fenomen, međutim, nije eksperimentalno otkriven u trigeminalnom ganglionu, što ukazuje da simpatikusni deo autonomnog nervnog sistema ima manji značaj u održavanju kraniofacijalnog bola.

Centralna senzitivizacija predstavlja još jednu od promena funkcije nervnog sistema nakon oštećenja nerva ili inflamacije tkiva. Centralne promene izazvane su aktivnošću primarnih aferentnih vlakana. Naime, ponavljani primarni aferentni nociceptivni inputi sve više senzibiliziraju neurone drugog reda što rezultira pojačanim odgovorima (*wind up* fenomen). Razvoj centralne preosetljivosti podrazumeva aktivaciju i susednih područja u CNS-u, mimo neurona koji su uključeni u prenos bolnih nadražaja. Ovo stanje se naziva centralna senzitivizacija, klinički se manifestuje kao sekundarna hiperalgezija (pojačan i produžen odgovor na bolne nadražaje u regiji

koja nije inervisana obolelim nervom) i mehanička alodinja (Woolf i Salter, 2000). Takođe, na ovaj način se objašnjava pojačan bol i širenje na susedne strukture kod pacijenata sa jakim bolom u licu.

Od značaja je sve veći broj dokaza da nekontrolisani, perzistentni bol dovodi do senzibilizacije i promena u perifernom i centralnom nervnom sistemu koje doprinose uspostavljanju i održavanju hroničnog bola. Stoga, neizbežna progresija događaja koja sledi nakon oštećenja nerva ili značajnog oštećenja tkiva ukazuje da su intervencije u cilju lečenja najefikasnije u ranom vremenskom okviru. Prevencija je očigledno primarni cilj, ali nije uvek dostižna, tako da je rano lečenje neophodno (Benoleil i sar., 2016).

1.4.2. Trenutne smernice i potencijalna nova ciljna mesta u lečenju trigeminalne neuropatije

Trigeminalna neuropatija i trigeminalna neuralgija su različiti nozološki entiteti. Prema podacima iz literature, oko 90% pacijenata sa trigeminalnom neuralgijom odgovori na primenu karbamazepina (ima zvanično prihvaćenu indikaciju: paroksizmalni bol kod neuralgije trigeminusa) u toku 48 h (Nurmikko i Eldridge, 2001). Osim karbamazepina, u terapiji trigeminalne neuralgije mogu se koristiti okskarbazepin (*off label* primena), fenitoin (zvanično prihvaćena indikacija; kao terapija drugog izbora, kada karbamazepin ne daje zadovoljavajući terapijski odgovor), lamotrigin (*off label* primena; efikasan je jedino u kombinaciji sa karbamazepinom) i baklofen (*off label* primena).

Sa druge strane, samo 11% pacijenata sa bolnom traumatskom trigeminalnom neuropatijom pokazuje značajno smanjenje intenziteta bola pri primeni farmakoterapije, što potkrepljuje tvrdnje da je lečenje traumatske trigeminalne neuropatije izrazito teško (Haviv i sar., 2014). Za lečenje trigeminalne neuropatije ne postoji konkretan lek izbora, već se koriste smernice za lečenje svih neuropatskih bolnih stanja. Lekovima prvog izbora smatraju se triciklični antidepresivi (TCA; amitriptilin i nortriptilin), inhibitori preuzimanja serotonina i noradrenalina (SNRI; venlafaksin i duloksetin) ili antikonvulzivi (pregabalin i gabapentin). S obzirom da je SNRI duloksetin efikasan, a da ima povoljniji bezbednosni profil, predstavlja atraktivnu alternativu TCA (Haviv i sar., 2016; Benoleil i sar., 2016). Ukoliko je kontraindikovano primeniti antidepresiv, antikonvulzivi predstavljaju dobru zamenu iako su generalno manje efikasnosti u odnosu na antidepresive. Takođe, u slučaju izostanka terapijskog odgovora na antidepresiv, preporučuje se primena antikonvulziva. U slučaju da nema odgovora ni kada se lek zameni, preporučuje se kombinovana terapija ukoliko je u skladu sa medicinskim statusom pacijenta. Amitriptilin ili duloksetin se mogu kombinovati sa jednim od antikonvulziva, gabapentinom ili pregabalinom. Sledeći korak u algoritmu za lečenje bolne traumatske trigeminalne neuropatije su opioidi ili kombinacija opioida i antikonvulziva (gabapentin i oksikodon (Hanna i sar., 2008) ili gabapentin i morfin (Gilron i sar., 2005)).

Budući da nijedan lek nema trigeminalnu neuropatiju kao zvaničnu indikaciju, a da hirurške intervencije nemaju dovoljnu efikasnost, kao i da patofiziološki mehanizmi nastanka trigeminalnog neuropatskog bola nisu u dovoljnoj meri proučeni, postoji potreba za daljim ispitivanjem ovog procesa i supstanci koje bi se potencijalno mogle koristiti u lečenju. S tim u vezi, u modelu trigeminalne neuropatije koji je opisan u ovom radu, ispitivano je profilaktičko

dejstvo supstance DK-I-56-1, a u skladu sa činjenicom da je u trigeminalnom ganglionu i spinalnom jedru trigeminalnog živca detektovano postojanje i aktivnost GABA_A receptora, koji imaju ulogu u modulaciji bolnih nadražaja iz orofacijalne regije (Hayasaki i sar., 2006; Puri i sar., 2011; 2012). Naime, istraživanja su pokazala da su GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu eksprimirani na neuronima i satelitnim glija ćelijama trigeminalnog gangliona, kao i da se aferentna vlakna tih neurona pružaju do temporomandibularnog zgloba. U inflamatornom modelu bola (ubrizgavanje Frojndovog adjuvansa u temporomandibularni zglob), utvrđeno je da postoji povezanost između $\alpha 6$ GABA_AR i bolnog odgovora. Kod pacova kod kojih je smanjena ekspresija $\alpha 6$ GABA_AR za oko 30% (nakon ubrizgavanja male interferirajuće RNK), dolazi do značajnog produžavanja trajanja obroka, kao zaštitne reakcije, i povećane ekspresije pERK neuralnog markera u trigeminalnom ganglionu životinja sa temporomandibularnim artritismom. Takođe, potvrđeno je da je ekspresija $\alpha 6$ GABA_AR u trigeminalnom ganglionu neophodna za inhibiciju primarnih senzornih aferentnih vlakana u trigeminalnom putu i redukciju prenosa bolnih nadražaja u stanjima inflamacije orofacijalnih tkiva (Puri i sar., 2012; Kramer i Bellinger, 2013). Na osnovu izloženog može se zaključiti da pozitivna modulacija $\alpha 6$ GABA_AR može da redukuje bol izazvan aktivacijom trigeminalnog gangliona, kao što je trigeminalni neuropatski bol.

1.5. Deuteracija u medicinskoj hemiji

Deuterisani analozi već postojećih lekova ("*Deuterium Switch*") predstavljaju polje od interesa za brojne istraživačke grupe. Naime, neočekivani metabolički ishodi deuteracije nose potencijal patentne zaštite deuterisane strukture. Ipak, u odsustvu neočekivanih nalaza o biološkim efektima deuterisanog analoga postojećeg leka, utvrđivanje neočekivane modifikacije metabolizma obično nije dovoljno za patentnu zaštitu, što za posledicu ima malu uspešnost napora dobijanja patentne zaštite kroz ovakav pristup (Timminis, 2014). Deuterisani bupropion je primer leka koji je dobio patentnu zaštitu od nacionalnog patentnog zavoda u SAD. U ovom slučaju deuteracije, smanjenje metabolizma nije postignuto putem smanjenja aktivnosti citohroma, već se uvođenjem deuterijuma na specifično mesto u strukturi bupropiona smanjuje keto-enolnom tautomerizacijom-indukovana racemizacija. U kontekstu povećanja poluvremena eliminacije, povećanje poluvremena racemizacije postignuto deuteracijom dovoljno je neočigledno za dobijanje patentne zaštite (Czarnik, 2013).

Izotopi su atomi jednog elementa koji se razlikuju po broju neutrona u jezgru, i shodno tome, atomskoj masi. Jedan od najšire ispitivanih i primenjivanih izotopa jeste deuterijum, izotop vodonika, sa jednim protonom i jednim neutronom u jezgru. Vodonik i deuterijum ispoljavaju gotovo identične fizičke osobine, tako da je deuteracija najmanja strukturna promena koja može da se izvrši na molekulu, a da originalno jedinjenje (*parent* molekul) i deuterisani analog zadrže približno, ali ne i stopostotno, iste fizičko-hemijske osobine (Buteau, 2009).

Deuterijum je otkriven kao prirodni izotop u vodi (H₂O) koja sadrži 0,015% D₂O (Urey i sar., 1932). Deuterijum (²H) sa dvostruko većom masom u odnosu na vodonik (¹H) jedan je od retkih izotopa koji ima drugačiji naziv u odnosu na glavni oblik elementa (Katz, 1965).

Kinetic deuterium isotope effects je idiom koji označava promenu u brzini reakcije koja se zapaža nakon supstitucije vodonika deuterijumom. Promena je posledica različite jačine C-H i C-D veze, koje su po svim drugim osobinama iste. C-D veza je, zbog veće mase deuterijuma u odnosu na

vodonik, 10 puta jača i teže se raskida i hemijski i enzimski. Svaki atom kovalentne veze poseduje masu koja doprinosi vibracionoj energiji veze. Da bi se raskinula kovalentna veza neophodna je energija koja dovodi do vibracije atoma, a zavisi od mase atoma. Veća energija je potrebna za vibraciju atoma veće molekulske mase, kao što je deuterijum (Foster, 1985). Pošto je raskidanje C-H veze uobičajen i često ograničavajući korak u metaboličkom putu lekova (primer: oksidacija u fazi 1 metabolizma), onda će se deuteracijom stepen metabolizma smanjiti. Brojni su primeri efekata deuteracije na metabolizam biološki aktivnih jedinjenja. Anestetik hloroform (CHCl_3) se *in vivo* metaboliše do fozgena, veoma reaktivnog alkilujućeg agensa; prevođenjem hloroforma u deuterohloroform (CDCl_3) smanjuje se stepen metabolizma i time pulmo- i hepatotoksičnost kod pacova. Deuterisani diazepam ispoljava antikonvulzivni efekat u manjoj meri, jer je sprečena oksidacija do aktivnog oblika, oksazepam (Buteau, 2009; Foster, 1984).

Kao posledica težeg raskidanja C-D veze navode se sledeće moguće prednosti (Timmins, 2017):

- 1) ukoliko raskidanje C-H veze određuje brzinu metabolizma leka, onda će deuterisani analog imati unapređene farmakokinetičke osobine, kao što je produženo poluvreme eliminacije, što bi omogućilo smanjenje učestalosti doziranja;
- 2) ukoliko raskidanje C-H veze dovodi do stvaranja toksičnih metabolita ili reaktivnih intermedijera, onda će se deuteracijom redukovati toksičnost leka;
- 3) ukoliko je raskidanje veze važno u promeni hiralnosti molekula, onda supstitucija vodonika deuterijumom redukuje racemizaciju enantiomerno čistog leka (smanjenje toksičnosti, primer: talidomid);
- 4) smanjenje razgradnje leka, što za posledicu ima duži rok upotrebe osetljivih lekova.

Prvi deuterisani lek koji je 2017. godine dobio odobrenje od Američke agencije za hranu i lekove u terapiji Hantingtonove horeje je deutetrabenazin (Schmidt, 2017). Postoji još čitav niz deuterisanih jedinjenja koja su stigla do različitih faza kliničkog ispitivanja. AVP-786, koji predstavlja kombinaciju deuterisanog deksstrometorfana sa malom dozom hinidina, indikovani je kod agitacije u Alchajmerovoj bolesti i za terapiju depresije/shizofrenije; CTP-656, deuterisani analog ivakaftora, indikovani je za terapiju cistične fibroze; CTP-543, deuterisani analog ruksolitiniba, primenjuje se kod alopecije; DRX-065, deuteracijom stabilizovani R-enantiomer pioglitazona, za terapiju adrenomijeloneuropatije i nealkoholnog steatohepatitisa (Timmins, 2017).

1.6. Formulacija pirazolohinolinona kao slabo rastvornih jedinjenja

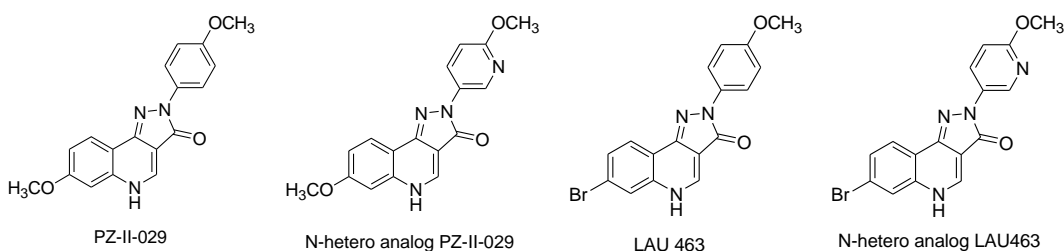
Izražena hidrofobnost i intrizično niska rastvorljivost u vodi su sve češće karakteristike *hit* i *lead* jedinjenja tokom ranog skriniga u otkriću novog leka, lekova kandidata koji su ušli u fazu razvoja (eng. *drug development candidates*) i na kraju, lekova koji prođu sve faze ispitivanja i stignu na tržište (Williams i sar., 2013). S tim u vezi, farmaceutska tehnologija istražuje i otkriva čitav niz strategija i formulacija kojima se rešavaju izazovi vezani za rastvorljivost. Iako je niska rastvorljivost lekova kandidata izazov tokom otkrića i razvoja, glavni klinički problem je smanjena i varijabilna apsorpcija takvih lekova nakon peroralne primene.

PQ ligande karakteriše veoma niska rastvorljivost u vodi. Vrednosti rastvorljivosti (μM) za PZ-II-029 i LAU463 kao i njihove N-hetero analoge navedene su u Tabeli 1. Uvođenjem N-hetero atoma u D prsten PQ strukture supstance PZ-II-029 povećava se rastvorljivost u oba medijuma. Sa druge strane, ista hemijska modifikacija strukture LAU463 ima minimalan uticaj na rastvorljivost kako

u neutralnoj, tako i u kiselj sredini. Rastvorljivost u kiselj sredini nema značajnu prednost ni za jednu supstancu, verovatno zato što atom azota u D prstenu nije dovoljno bazan da se favorizuje stvaranje hloridne soli (Knutson i sar., 2018). Na osnovu ovih podataka, u eksperimentalna istraživanja uključena je supstanca DK-I-86-1, koja je i deuterisani analog i N-hetero analog PZ-II-029.

Prema klasifikaciji rastvorljivosti koja je data u Takagi i sar., (2006), navedeni ligandi (uključujući i N-hetero analoge) spadaju u grupu praktično nerastvorljivih supstanci (rastvorljivost < 0,1 mg/ml).

Tabela 1. Rastvorljivost (R) za dve supstance (PZ-II-029 i LAU 463) i dva njihova N-hetero analoga određena je u dva medijuma: vodi pri pH = 7 i 0,01 M rastvoru HCl pri pH = 2 u cilju oponašanja fizioloških i gastrointestinalnih uslova (pruzeto i prilagođeno iz Knutson i sar., 2018).



	PZ-II-029	N-hetero analog PZ-II-029	LAU 463	N-hetero analog LAU463
R (μM) u vodi, pH=7	24,3 \pm 3,8	67,2 \pm 7,9	8,3 \pm 0,2	7,3 \pm 0,2
R (μM) u 0,01 M HCl, pH=2	27,8 \pm 0,9	115,4 \pm 14,9	3,3 \pm 0,1	7,2 \pm 0,4

U ovakvim okolnostima slabe rastvorljivosti supstanci, uobičajeno je da se prilikom ispitivanja na životinjama koristi suspenzija kao formulacija. Ipak, u cilju povećanja biorasploživosti i koncentracije na mestu dejstva u literaturi se sreću različite formulacije i strategije koje imaju za cilj prevazilaženje problema niske rastvorljivosti (primena korastvarača, surfaktanata, ciklodekstrina, građenje soli, ko-kristala, smanjenje veličine čestica, izrada lipidnih formulacija i slično (Williams i sar., 2013)). Jedan od takvih primera je rastvor supstanci pripremljen sa 20% dimetilsulfoksida (DMSO) i 20% *Cremophor EL* kao korastvarača (Chiou i sar., 2018). Kada je supstanca formulisana kao rastvor koji predstavlja homogen sistem, postiže se brže dejstvo zbog brže apsorpcije, kao i bolja ujednačenost doze.

DMSO je organski rastvarač koji odlično rastvara brojne slabo rastvorljive lekove i omogućava pripremanje koncentrovanih *stock* rastvora koji se dalje razblažuju i koriste tokom eksperimentalnog rada (na primer, pripremanje kalibracionih kriva u farmakokinetičkim ispitivanjima). Međutim, DMSO se ne koristi u komercijalnim parenteralnim formulacijama, niti u onim namenjenim za peroralnu primenu. Prema bazama podataka, na tržištu su dostupne tri formulacije (dve za topikalnu primenu – rastvor i losion, i jedna za supkutanu primenu – implant) koje sadrže DMSO (*U.S. Food and Drug Administration*). Razlog za ograničavanje primene DMSO u komercijalnim formulacijama lekova jeste njegov potencijal da penetrira i oštećuje ćelijsku membranu dovodeći do lize ćelije. Potencijalno, može da dovede do hemodinamskih poremećaja (na primer, formiranje krvnih ugrušaka, promene vrednosti arterijskog krvnog pristiska (Mottu i sar., 2000). Takođe, pri relativno niskim dozama od 200 mg/kg (10%) primenjenim intravenski, DMSO može da dovede do oštećenja epitelijalnih ćelija bubrega što se procenjuje posredstvom ekskrecije enzima urinom (Pestel i sar., 2006). Iako snažna litička svojstva

ograničavaju njegovu primenu, DMSO se široko koristi u pretkliničkim formulacijama (obično do 20% v/v).

Istraživanja su utvrdila da *Cremophor EL*, koji se široko koristi kao korastvarač u formulacijama, predstavlja biološki i farmakološki aktivan ekscipijens u komercijalno dostupnim lekovima (Gelderblom i sar., 2001). Poznato je da *Cremophor EL* može da izazove reakcije preosetljivosti koje karakteriše dispneja, osip, bol u grudima, tahikardija, hipotenzija, angioedem i generalizovana urtikarija; zatim neurotoksičnost i hiperlipidemiju.

Za potrebe eksperimenata na životinjama, jednokratna primena formulacije sa 20% DMSO i 20% *Cremophor EL* može da bude prihvatljiva, ali takva formulacija ne bi mogla da se primenjuje ponavljano ili na ljudima. Jedna od potencijalnih biokompatibilnih formulacija kojoj se u poslednje vreme posvećuje sve veća pažnja je nanoemulzija koja predstavlja koloidni sistem u kome su čestice submikronskih (20 do 200 nm) veličina. Izrađuju se od ulja, vode, emulgatora i, često, koemulgatora. Nanoemulziju, kao jednu od nanotehnoloških strategija u formulaciji lekova, odlukuju brojne prednosti: ujednačena i veoma mala veličina čestica, visok kapacitet solubilizacije lipofilnih lekova, dobra podnošljivost i zaobilazanje retikulo-endotelno sistema. Osim toga, zbog solubilizacije, afiniteta koji ovaj lipidni sistem ima prema membranama i veće slobodne površine kapi unutrašnje faze poboljšana je penetracija kroz biološke membrane, bioraspoloživost, eventualno kontrolisano oslobađanje leka, ciljana isporuka leka uključujući i isporuku u mozak (Đorđević i sar., 2015; Matougui i sar., 2016). Uglavnom, u sastav nanoemulzija ulaze visoko biokompatibilne i biodegradabilne komponente, zahvaljujući kojima su ovi sistemi pogodni za osetljive puteve primene kao što je intravenska i primena u oko. Još jedna od prednosti je i veća fizičko-hemijska stabilnost, koja je posledica male veličine čestica. Braunovo kretanje ovih čestica dovoljno je da premosti gravitacionu silu, usled čega nema vidljive koalescencije i flokulacije (Klang i sar., 2012). S obzirom da je slobodna energija koloidnog sistema (uljane kapi dispregovane u vodi) veća od slobodne energije odvojenih faza (ulje i voda), nanoemulzije predstavljaju termodinamički nestabilne sisteme. Međutim, kinetička stabilnost se uspostavlja obezbeđivanjem energetske barijere između ove dve faze što se postiže dovođenjem spoljašnje energije sistemu (McClements i Julian, 2012). S tim u vezi, metoda izrade nanoemulzije diazepama i PQ liganada koje su korišćene u disertaciji bila je homogenizacija pod visokim pritiskom koja je imala za cilj da obezbedi kinetičku stabilnost sistema (Đorđević i sar., 2013).

1.7. Složenost i faze u razvojnom putu novog leka

Bolesti i stanja koja su smatrana neizlečivim i fatalnim, danas to više nisu zahvaljujući terapijskim agensima koju su dizajnirani da produže i poboljšaju kvalitet života. Na primer, stopa preživljavanja kada su u pitanju različiti tipovi karcinoma je značajno povećana. Nema sumnje da otkriće lekova ima pozitivan uticaj na društvo, ali posmatraču sa strane nije najjasnije kako se postiže taj cilj. Na izgled deluje jednostavno – otkriti šta je uzrok neke bolesti i otkriti lek koji će da eliminiše taj uzrok. Možda ima hiljade jedinjenja koja mogu da eliminišu neki infektivni uzročnik bolesti, ali kako iz te mase jedinjenja pronaći ono koje nema negativan uticaj na humani organizam. Proces otkrića je multidisciplinarni i zahteva koordinirane napore osoba sa širokim opsegom ekspertize: hemija leka, *in vitro* biologija, metabolizam leka, animalna farmakologija, formulaciona istraživanja, klinička istraživanja, intelektualna svojina i mnoga druga polja i oblasti. Pronalazak jednog leka koji će se naći na tržištu znači da se počne sa 100000 jedinjenja – potencijalnih kandidata, da se sprovede stotine prekliničkih animalnih studija, brojne kliničke studije koje uključuju hiljade pacijenata. Jedna od analiza stope uspeha kliničkih ispitivanja je

pokazala da će samo 1 na svakih 10 lekova kandidata koji stignu do kliničkih ispitivanja uspešno proći klinička ispitivanja i doći na tržište. Ovo predstavlja stopu uspeha manju od 0,001% ako se meri brojem jedinjenja ispitanih na početku procesa. Svakako je jasno da su troškovi i složenost otkrića i razvoja lekova zapanjujući. To potkrepljuje jedan interesantno prezentovan podatak iz 2011. godine prema kome je procenjeno da otkriće i razvoj novog lek košta preko 1,75 milijardi dolara. Kao mera poređenja, isti iznos novca mogao bi se iskoristiti za kupovinu 17 mlaznih aviona Boeing 737 (na osnovu cena iz 2012. na Boingovoj zvaničnoj internet stranici), približno 7000 kuća (pretpostavljena cena 250000 dolara po kući), 70000 automobila (prosečna cena 25000 dolara), ili iskoristiti za podizanje 7000 dece rođene 2010. do 18 godine života (Blass, 2015).

Razvojni put novog leka obuhvata tri faze. Otkriće, odnosno invencija leka, prva je faza u kojoj se vrši odabir molekula-kandidata na osnovu njihovih farmakoloških i drugih svojstava (često se sprovodi u akademskim ustanovama). Druga faza je preklinički razvoj tokom koga se sprovodi čitav niz laboratorijskih ispitivanja i ispitivanja na životinjama (*in vitro* i *in vivo*). Na kraju sledi treća faza, klinički razvoj, tokom koje se efikasnost i bezbednost primena leka-kandidata testiraju na zdravim dobrovoljcima i pacijentima. Da bi se započela faza testiranja na ljudima, neophodno je odobrenje regulatorne agencije na osnovu podnete dokumentacije sa detaljnim prekliničkim podacima koji opisuju farmakološke i toksikološke studije na životinjama, informacije o hemijskoj proizvodnji (uključujući formulaciju, studije stabilnosti i mere kontrole kvaliteta) i detaljne kliničke protokole po kojima će se klinička ispitivanja sprovoditi na humanoj populaciji ako studije budu odobrene. Nakon tri faze kliničkih istivanja, odobrenje regulatornih tela ne označava kraj kliničkih ispitivanja. U većini slučajeva, regulatorne agencije zahtevaju dodatne studije praćenja, koje se nazivaju fazom IV kliničkih ispitivanja ili postmarketinškim praćenjem leka. Generalno, ove studije su osmišljene da otkriju retke neželjene efekte na mnogo većem broju pacijenata nego što bi to moglo biti podržano u ispitivanjima III faze ili dugoročne štetne efekte koji mogu biti izvan opsega trajanja III faze. Na osnovu bezbednosnih podataka generisanih u IV fazi mogu se napraviti izmene u obeležavanju pakovanja leka, uvesti kontraindikacije za upotrebu novog leka u kombinaciji sa drugim lekovima, ili čak doneti odluka za povlačenje leka sa tržišta ako su nalazi dovoljno ozbiljni. COX- selektivni nesteroidalni antiinflamatorni lek, rofekoksib, povučen je sa tržišta nakon što su studije IV faze pokazale da povećava rizik od ishemijskih događaja kod pacijenata. Na sličan način, cerivastatin, inhibitor 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaze koji je korišćen u svrhu snižavanja visokog nivoa holesterola i protektivnog dejstva kod kardiovaskularnih bolesti, povučen je iz upotrebe nakon izveštaja o fatalnoj rabdomiolizi.

Faza invencije se označava kao *drug discovery*, a preklinička i klinička ispitivanja se jednim imenom označavaju kao razvoj leka ili eng. *drug development*.

U okviru faze otkrića novog leka sukcesivno se smenjuju četiri koraka. Najpre se identifikuje ciljno mesto dejstva (na primer, enzim, G-protein kuplovani receptor, jonski kanal), zatim, spram njega identifikuju se „*hit*” jedinjenja koja predstavljaju strukture koje imaju određenu biološku aktivnost na izabranom ciljnom mestu, ali nemaju optimalne osobine. Sledeći korak ima za cilj identifikaciju „*lead*” jedinjenja koja predstavljaju vodeće „*hit*”strukture sa poboljšanim osobinama, ali neophodna je dalja optimizacija do izbora leka-kandidata koja ujedno predstavlja četvrti korak invencije.

Istraživanje sprovedeno u okviru ove disertacije predstavlja deo invencije leka PQ strukture.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Kao deo invencije, prve faze u otkriću novog leka, u eksperimentima koji su deo ovog istraživanja variraće se nekoliko faktora u cilju potencijalnog dobijanja neočekivanih rezultata vezanih za *in vivo* ponašanje PQ liganada identifikovanih kao „hit” jedinjenja, a koji bi omogućili patentnu zaštitu, otkrivanje „lead” jedinjenja i dalje istraživanje kroz faze u razvoju novog leka.

S tim u vezi definisani su sledeći ciljevi:

1. Farmakokinetička karakterizacija (određivanje farmakokinetičkih profila u krvi, mozgu, jetri i bubrezima, kao i slobodnih frakcija u krvi i mozgu) izabranih PQ liganada i njihovih deuterisanih analoga uz variranje:
 - puta primene (intraperitonealno (i.p.), peroralno (p.o.) i intraveniski (i.v.))
 - formulacije (rastvor, suspenzija, nanoemulzija)
 - vrste i soja životinja (pacovi Wistar i Sprague Dawley soja, C57BL miševi),u cilju utvrđivanja uticaja deuteracije, fluorovanja i nitrogenovanja, kao i drugih hemijskih modifikacija u polaznoj strukturi (eng. *parent*), na unapređenje farmakokinetičkih parametara, zajedničkih farmakokinetičkih osobina kao i neočekivanih obrazaca kinetičkog ponašanja.
2. Farmakodinamska karakterizacija izabranih PQ liganda i njihovih deuterisanih, fluorovanih i nitrogenovanih analoga kroz bihevioralne testove u cilju procene uticaja supstanci na domene raspoloženja, kognicije, motorne koordinacije. Procena razlika u farmakološkim efektima Polaznih jedinjenja i deuterisanih/fluorovanih/nitrogenovanih PQ predstavnika.
3. Procena agonističko-antagonističkog dejstva izabranih PQ liganada na nivou GABA_A receptora kroz međusobnu interakciju sa benzodiazepinima. Procena uticaja 9 PQ liganada iz tri strukturne grupe (PZ-II-029 i srodni deuterisani analozi DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3 i DK-I-86-1; LAU 463 i srodni deuterisani analozi DK-I-58-1 i DK-II-58-1; i DK-I-87-1) u bihevioralnim testovima u kojima benzodiazepini ispoljavaju izražene psihomotorne ili antikonvulzivne efekte, kao što su spontana lokomotorna aktivnost, rotarod i gubitak refleksa uspravljanja, ili pentilentetrazolski test.
4. Ispitivanje profilaktičkog antinociceptivnog efekta DK-I-56-1 u animalnom modelu trigeminalnog neuropatskog bola nakon hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca posredstvom selektivne modulacije $\alpha 6$ GABA_A receptora smeštenih na neuronima trigeminalnog ganglion.

3. MATERIJAL I METODE

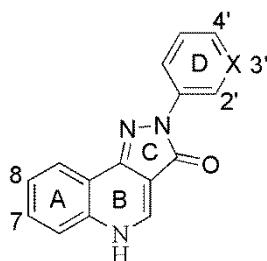
3.1. Ogledne životinje

U ogledima su korišćeni mužjaci pacova Wistar (Vojna farma, Beograd, Srbija) i Sprague Dawley (kolonija vivarijuma Farmaceutskog fakulteta, Beograd, Srbija) soja stari 8-10 nedelja (180-250 g na početku eksperimenata) i C57BL miševi (Vojna farma, Beograd) stari oko 10 nedelja (24-30 g). Pacovi su bili čuvani u standardnim kavezima od pleksiglasa (42 cm × 26,5 cm × 18 cm) (4-5 životinja po kavezu, osim za eksperiment modelovanja neuropatskih bolova kada su bili raspoređeni pojedinačno). Miševi su bili čuvani u kavezima od pleksiglasa (33 × 15 × 13 cm) (7-8 životinja po kavezu). Životinje su bile smeštene u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta, na konstantnoj temperaturi od $21 \pm 1^\circ\text{C}$, relativnoj vlažnosti vazduha 40–70% i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (osvetljenje od 6 h do 18 h, intenzitet svetla 120 lx). Konzumiranje hrane (Veterinarski zavod Subotica) i česmenske vode bilo je *ad libitum*. Za eksperimente su korišćene naivne životinje kojima je bilo ostavljeno najmanje sedam dana da se aklimatizuju na uslove vivarijuma pre nego što uđu u eksperiment (odnosi se na životinje koje su nabavljane sa Vojne farme).

3.2. Ispitivane supstance

U eksperimentima je korišćeno 15 pirazolohinolinonskih liganada čije su molekulske formule, kodni nazivi i hemijski nazivi predstavljeni u Tabeli 2. Ligandi su sintetisani na Institutu za hemiju i biohemiju Univerziteta u Viskonsinu (Milvoki, SAD) (Knutson i sar., 2018, uz napomenu da fluorovani analozi nisu publikovani). GL-II-73 (Tabela 3) je takođe sintetisan na Institutu za hemiju i biohemiju Univerziteta u Viskonsinu i predstavlja pozitivni alosteri modulator GABA_A receptora, selektivan za receptore koji sadrže $\alpha 5$ podjedinicu (Prevot i sar., 2019). Diazepam (Tabela 3) je dobijen od Galenike (Srbija). Pentilentetrazol (6,7,8,9-tetrahidro-5H-tetrazolo[1,5-a]azepin) (Sigma Aldrich) je korišćen kao prokonvulzivni agens (Löscher i Schmidt, 1988). Uz primenu ultrazvuka, PQ ligandi su bili suspendovani u vehikulumu/solvensu (SOL), pripremljeni u obliku rastvora ili nanoemulzije za i.p. primenu, odnosno u 0,25% rastvoru metilceluloze u destilovanoj vodi za oralnu gavažu, odnosno peroralnu (p.o.) primenu. Sastav formulacija PQ liganada za parenteralnu primenu prikazan je u Tabeli 4. Diazepam je bio formulisan u obliku nanoemulzije za i.v. primenu, odnosno, uz primenu ultrazvuka, suspendovan u SOL-u za i.p. primenu. Nanoemulzija diazepamama sastavljena od mešavine triglicerida srednje dužine lanca (24%) i sojinog ulja (6%) kao komponente masne faze, lecitina soje (Lipoid S75) (3%) i polisorbata 80 (3%) kao emulgatora, butilhidroksitoluena (0,05%) kao antioksidansa, glicerola (2,5%) kao sredstva za podešavanje izotoničnosti i 0,01 M rastvora fosfatnog pufera (pH 8,0) (do 100 g) kao vodene faze, pripremljena je homogenizacijom pod visokim pritiskom kao što je opisano u Đorđević i sar., 2013. Istim postupkom pripremljene su i nenoemulzije PQ liganada. Pentilentetrazol je rastvoren u fiziološkom rastvoru. Ukoliko su eksperimenti podrazumevali i.p. primenu dve različite supstance, one su aplikovane na dva različita mesta na donjem abdomenu (u desni, odnosno u levi abdominalni kvadrant).

Tabela 2. Molekulske strukture i hemijski nazivi pirazolohinolinonskih liganada korišćenih u istraživanju. Na vrhu tabele navedena je opšta struktura pirazolohinolinona sa označenim prstenovima i brojevima gde se nalaze različiti supstituenti, u zavisnosti od kojih su ligandi svrstani u određene subhemotipove.



Molekulska struktura i kodni naziv liganda	Hemijski naziv liganda	Molekulska struktura i kodni naziv liganda	Hemijski naziv liganda
 PZ-II-029	7-metoksi-2-(4-metoksifenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on	 LAU463	7-bromo-2-(4-metoksifenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on
 DK-I-56-1	7-metoksi-2-(4-metoksi-d ₃ -fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on	 DK-I-58-1	7-bromo-2-(4-metoksi-d ₃ -fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on
 RV-I-029	7-metoksi-d ₃ -2-(4-metoksifenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on	 DK-II-58-1	7-bromo-2-(6-metoksi-d ₃ -piridin-3-il)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on
 DK-I-60-3	7-metoksi-d ₃ -2-(4-metoksi-d ₃ -fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on	DK-IV-15-1	Strukturna i molekulska formula supstance ne mogu da se otkriju
 DK-I-86-1	7-metoksi-d ₃ -2-(6-metoksipiridin-3-il)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on	 DK-I-87-1	8-hloro-2-(2-metoksi-d ₃ -fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on

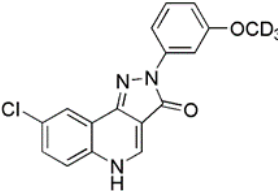
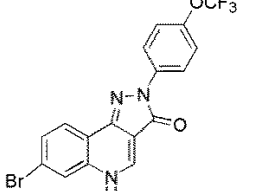
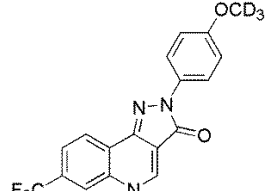
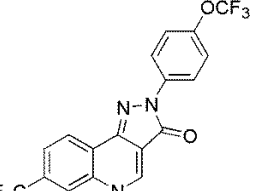
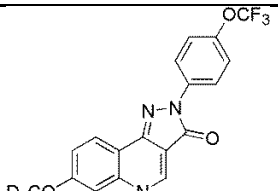
 <p>DK-I-59-1</p>	8-hloro-2-(3-metoksi-d ₃ -fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on	 <p>DK-IV-22-1</p>	7-bromo-2-(4-trifluorometoksifenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on
 <p>DK-IV-19-1</p>	7-trifluorometil-2-(4-metoksi-d ₃ -fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on	 <p>MM-I-10</p>	7-trifluorometil-2-(4-trifluorometoksifenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on
 <p>DK-IV-20-1</p>	7-metoksi-d ₃ -2-(4-trifluorometoksifenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on		

Tabela 3. Molekulske strukture i hemijski nazivi GL-II-73 i diazepama

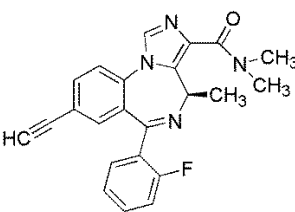
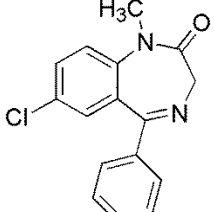
Molekulska struktura i kodni naziv liganda	Hemijski naziv liganda	Molekulska struktura i nezaštićeni naziv leka	Hemijski naziv liganda
 <p>GL-II-73</p>	diemetilamid-8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-2,5,10b-traiza-benzo[e]azulen-3-karboksilne kisleine	 <p>Diazepam</p>	7-hloro-1-metil-5-fenil-1,3-dihidro-benzo[e][1,4]diazepin-2-on

Tabela 4. Sastav formulacija suspenzije, rastvora i nanoemulzije

Suspenzija	Rastvor	Nanoemulzija
1% Tween (polisorbat 80) (sredstvo za kvašenje)	20% dimetilsulfoksid (DMSO) (korastvarač)	2% Lipoid S 75 (lecitin soje) (komponenta masne faze iz grupe fosfolipida)
14% propilenglikol (korastvarač)	20% Cremophor EL (korastvarač)	13,33% trigliceridi srednje dužine lanca (komponenta masne faze)

ad 100% visoko prečišćena voda (spoljašnja faza suspenzije)	60% NaCl 0.9% (rastvarač)	6,67% ricinusovo ulje (komponenta masne faze)
		0,05% butil-hidroksitoluen (BHT) (antioksidans)
		2% DMSO (korastvarač)
		2% polisorbat 80 (emulgator, nejonski, u/v)
		0,03% Na-oleat (emulgator, jonski, u/v)

3.3. Protokoli *in vitro* eksperimenata

3.3.1. Određivanje farmakokinetičkih profila i parametara izabranih liganada u ciljnim tkivima oglednih životinja

U cilju procene sposobnosti liganada, formulisanih u obliku rastvora, suspenzije ili nanoemulzije, da se apsorbuju nakon primene različitim putevima, distribuiraju u ciljna tkiva, pre svega u moždano, sprovedi smo studije određivanja farmakokinetičkih profila i izračunali farmakokinetičke parametre u plazmi i mozgu adultnih mužjaka Wistar pacova (prvi, drugi i treći eksperiment), plazmi i mozgu adultnih mužjaka Sprague Dawley pacova (četvrti eksperiment), odnosno plazmi, mozgu, jetri i bubregu adultnih mužjaka C57BL miševa (peti eksperiment) za izabrane PQ ligande.

U prvom eksperimentu, određeni su profili za PZ-II-029, DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3, DK-I-86-1 i DK-I-87-1, formulisanih u obliku suspenzije u koncentraciji od 2 mg/ml. U cilju postizanja doze od 10 mg/kg, svaki ligand je aplikovan i.p. u zapremini od 5 ml/kg, za pet, unapred definisanih vremenskih tačaka: 5, 20, 60, 180 i 720 minuta (8 h).

Drugi eksperiment imao je za cilj da se ispita uticaj formulacije na farmakokinetiku odabranog liganda, tako da je profil DK-I-56-1 određen i nakon i.p. primene nanoemulzije, odnosno rastvora, kroz iste vremenske tačke kao u prvom eksperimentu. Koncentracija nanoemulzije i rastvora bila je ista, 2 mg/ml, a ciljna doza 10 mg/kg (aplikacija tretmana bila je u zapremini od 5 ml/kg telesne mase životinje).

U trećem eksperimentu određena je apsolutna biološka raspoloživost PZ-II-029 i DK-I-56-1 pripremljenih u obliku nanoemulzije koncentracije 2 mg/ml nakon p.o. i i.v. primene, u dozi od 2 mg/kg i volumenu od 1 ml/kg, u sledećim vremenskim tačkama: 5, 30, 120, 720, 1440 minuta (24 h).

Četvrti farmakokinetički eksperiment sproveden je na mužjacima Sprague Dawley pacova u cilju procene da li sintezom *prodrug* forme PQ liganda može da se poveća rastvorljivost u vodi i time unapredi kinetika nakon p.o. primene kao klinički najprihvatljivijeg puta primene lekova. Kroz eksperiment kasetnog doziranja farmakokinetički profili i parametri su određeni za polazno jedinjenje LAU463, njegov direktni deuterisani analog DK-I-58-1, deuterisani analog koji osim što ima tri atoma deuterijuma, poseduje i atom azota u D prstenu DK-II-58-1 i *prodrug* oblik

LAU463, DK-IV-15-1. Suspenzija u 0,25% rastvoru metilceluloze za sve četiri supstance zajedno pripravljena je u koncentraciji od 0,4 mg/ml za svaku supstancu, tako da aplikacijom u zapremini od 5 ml/kg, dobijena je ciljna doza supstanci od 2 mg/kg. Kako bi se dobila što homogenija suspenzija, nakon dodatka rastvora metilceluloze odmerenim supstancama, sistem je bio izložen ultrazvuku u trajanju od nekoliko minuta. Tretman je aplikovan pomoću plastičnih gastričnih sondi. Uzorci krvi i mozga nakon anesteziranja životinja ketaminom, uzorkovani su u šest, prethodno definisanih vremenskih tačaka: 15, 30, 60, 180, 480 i 1440 (24 h).

U petom eksperimentu sprovedeno je određivanje farmakokinetičkih profila i parametara za 14 PQ liganada kroz kasetno doziranje. Naime, miševi ($n = 90$) su podeljeni u pet kohorti od kojih je svaka obuhvatala šest grupa od po tri životinje. Svaka od šest grupa odgovarala je po jednoj vremenskoj tački koje su unapred bile definisane: 5, 20, 60, 240, 960 and 2160 min (36 h). Prva kohorta životinja primila je kasetu supstanci označenu kao A: DK-I-56-1, DK-I-58-1, DK-II-58-1; druga kohorta kasetu B: DK-VI-19-1, DK-IV-20-1, MM-I-10; treća kohorta kasetu C: DK-IV-22-1, DK-I-86-1 and LAU 463; četvrta kohorta kasetu D: RV-I-029, PZ-II-029, DK-I-87-1 i peta kohorta kasetu E: DK-I-60-3, DK-I-86-1, DK-I-59-1. Jedna supstanca (DK-I-86-1) je urađena kroz dve kasete radi interne provere metodologije. Po tri supstance jedne kasete suspendovane su u SOL-u uz primenu ultrazvuka u koncentraciji 0,3 mg/ml. Kasetna suspenzija je aplikovana i.p. u zapremini od 10 ml/kg kako bi se dobila ciljna doza od 3 mg/kg za svaku od tri supstance date kasete.

Za sva određivanja, broj životinja po vremenskoj tački bio je tri. Neposredno pre žrtvovanja, srčane punkcije i dekapitacije, pacovi su bili anestezirani ketaminom (90 mg/kg, 10% *Ketamidol*, Richter Pharma AG, Wels, Austrija). Krv je uzorkovana pomoću heparinizovanih špricева i igala u prethodno heparinizovane tube, a solidni organi (mozak, jetra i bubreg) u prethodno tarirane tube. Krv je centrifugirana 10 minuta na 1 (1×1000) rcf (*MiniSpin[®] plus centrifuge*, Eppendorf, Nemačka). U tube sa, prethodno izmerenim, uzorcima mozgovia i jetre dodato je po 1,25 ml metanola, a u uzorke bubrega po 1 ml metanola (u zavisnosti od dodate zapremine metanola, kasnije u izračunavanju koncentracija, u obzir se uzima faktor razblaženja). Uzorci mozgovia su homogenizovani na ultrazvučnom homogenizatoru (*Bandelin Sonopuls mini 20*, Bandelin Electronics, Nemačka) uz primenu 70% amplitude dva puta po 20 s (po potrebi tri puta po 20 s); uzorci jetre i bubrega: 80% amplituda, 3×20 s (po potrebi 4×20 s) i centrifugirani 20 minuta na 3,4 ($3,4 \times 1000$) rcf.

Nakon centrifugiranja, supernatanti su odvojeni i dalje pripremljeni tečno-čvrstom ekstrakcijom (eng. solid-phase extraction—SPE) uz pomoć *Oasis[®] HLB* kertridža (*Waters Corporation, Milford, Massachusetts, SAD*), prethodno kondicioniranih metanolom i destilovanom vodom. Kao uzorci nanošeni su plazma ili razblaženi supernatant homogenata mozga, jetre ili bubrega, kertridži zatim ispirani sa 1 ml 5% metanola i sušeni pod vakuumom, a supstance od interesa eluirane sa 1 ml metanola. Koncentracije liganada su određivane metodom ultra-visokoeffikasne tečne hromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS), u saradnji sa Katedrom za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Pogledati deo **LC-MS/MS analitička metoda**). Za potrebe generisanja kalibracione krive pripremani su kalibracioni rastvori koncentracija 0,05, 0,25 0,5, 1,25, 2,5 i 5 μM koji su, takođe, procesuirani metodom ekstrakcije. Naime, tokom tečno-čvrste ekstrakcije za kalibraciju svi koraci su bili isti kao pri radu sa uzorcima, osim što su na kolone nanošeni plazma, homogenat mozga/jetre/bubrega životinje

koja prethodno nije tretirana nijednim ligandom, a zatim u dodatnom koraku na kolonu su nanošene, protokolom određene, zapremine kalibracionih rastvora. U slučaju pripreme rastvora za dobijanje kalibracionih krivih za eksperiment kasetnog doziranja, osnovni, *stock* rastvori svake od tri ili četiri supstance pravljene su odvojeno, da bi u sledećem koraku razblaživanja bio napravljen kasetni rastvor supstanci, a od njega daljim razblaživanjem kalibracioni rastvori u opsegu prethodno navedenih koncentracija.

U svim farmakokinetičkim eksperimentima, nakon određivanja profila liganada u kompartmentima organa, izvedena je neprostorna farmakokinetička analiza pomoću *PK Functions* dodatka za Microsoft Excel softverski paket. Iz dobijenih profila koncentracije PQ liganada u funkciji vremena, u plazmi, moždanom tkivu, jetri i bubregu oglednih životinja izračunati su sledeći farmakokinetički parametri: maksimalna koncentracija (C_{max}), vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije (T_{max}), površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (AUC_{0-t}), površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do beskonačnosti ($AUC_{0-\infty}$), poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$) i konstanta brzine eliminacije (β). Apsolutna biološka raspoloživost (F) za PZ-II-029 i DK-I-56-1 u plazmi i moždanom tkivu izračunata je nakon peroralne i intravenske primene nanoemulzije datih liganda, primenom formule: $F = AUC_{0-t, p.o. primena, plazma} / AUC_{0-t, i.v. primena, plazma}$, odnosno $F = AUC_{0-t, p.o. primena, mozak} / AUC_{0-t, i.v. primena, mozak}$.

Potencijal ciljane isporuke supstanci je procenjen izračunavanjem parametra tkivo–plazma particioni koeficijent ($K_p = AUC_{0-t, tkivo} / AUC_{0-t, plazma}$). Vrednost ovog parametra > 1 ukazuje da ispitivane supstance poseduju dobar potencijal za prolazak u tkivo/organ gde je potrebno da ostvare farmakološko dejstvo, kao i afinitet ka zadržavanju u ekskretornim organima (bubreg, jetra).

U petom farmakokinetičkom eksperimentu računat je i parametar α koji predstavlja udeo supstance kojoj je izloženo moždano tkivo u odnosu na ukupnu izloženost u sva četiri kompartmana gde su koncentracije merene ($\alpha = AUC_{0-t, mozak} / (AUC_{0-t, plazma} + AUC_{0-t, mozak} + AUC_{0-t, jetra} + AUC_{0-t, bubreg})$). Dodatno, procenjivana je i izloženost ekskretornih organa sabiranjem $AUC_{0-t, jetra} + AUC_{0-t, bubreg}$. U svim prethodno navedenim formulama t predstavlja poslednju vremensku tačku u kojoj su merene koncentracije.

3.3.2. Određivanje slobodne frakcije izabranih liganada u plazmi i moždanom tkivu

Studije procene vezivanja izabranih PQ liganada (DK-I-56-1 i DK-I-60-3) za proteine plazme i moždanog tkiva sprovedene su kroz određivanje slobodnih frakcija u plazmi i homogenatu mozga pomoću aparature za brzu ekvilibrijumsku dijalizu sa 48 bunarića (eng. *rapid equilibrium dialysis* (RED), Thermo Scientific, Rockford, Illinois) prema proceduri prilagođenoj iz Obradović i sar. (2014). Plazma i homogenat mozga su pripremljeni na isti način kao za određivanje koncentracija u plazmi i homogenatu mozga, s time što se ovde za homogenizaciju solidnih organa (u ovom slučaju mozga) koristi PBS pufer (eng. *phosphate-buffered saline*, pH 7,4) umesto metanola. Naime, krv je odmah centrifugirana, dok su u tube sa mozgovima pacova dodata po 4 zapreminska dela PBS-a tako da je postignuto razbaženje 1:5, nakon čega je svaki uzorak tkiva homogenizovan i homogenati centrifugirani. U bunariće su postavljeni umeci (inserti) sa dve komorice (jedna za uzorak – crvena, koja predstavlja donorski deo RED inserta; druga za pufer – bela, koja predstavlja

akceptorski deo RED inserta). U crveni deo je dodato 190 μL plazme ili supernatanta homogenata mozga i 10 μL radnog rastvora ispitivanog liganda (DK-I-56-1 i DK-I-60-3) koncentracije 100 μM pripremljenog u dimetilsulfoksidu (DMSO), kako bi se dobila ukupna koncentracija liganda u crvenom delu umetka od 5 μM . U beli deo umetka dodato je 350 μL pufera (PBS). Nakon inkubacije u trajanju od 4 h, na 37°C, pri brzini od 50 obrtaja/min u ES-20 orbitalnom šejker-inkubatoru, 50 μL alikvota pufera, plazme i homogenata mozga preneto je u tubice u kojima je prethodno dodata ista zapremina DMSO-a. Zatim, u alikvote plazme i homogenata mozga (iz crvenog dela) dodato je po 50 μL kontrolnog pufera (koji nije podvrgnut dijalizi), dok je u alikvote pufera iz dijalize (beli deo) dodato po 50 μL sveže plazme i homogenata mozga, koji nisu prošli dijalizu. Na ovaj način se dobijaju identični matriksi između puferskih i nepuferskih uzoraka. U tako pripremljene uzorke dodato je po 300 μL 5 μM rastvora internog standarda (SH-I-048A) u acetonitrilu. Posle vorteksovanja (1000 obrtaja/min, 10 min, 4°C) i centrifugiranja (13000 \times g, 10 min, 4°C), po 100 μL supernatanta je prenošeno u vijale za LC-tandem MS analitičku metodu (LC-MS/MS) kako bi se odredile slobodne koncentracije ispitivanih liganda. Isti protokol korišćen je i za pripremu matriksa za kalibracionu krivu, pri čemu, pre dijalize, u plazmu i homogenat mozga nije dodavan radni rastvor liganda, već je nakon dijalize u 50 μL praznog (*blank*) dijalizata plazme, homogenata mozga i pufera dodato 50 μL standardnog rastvora ispitivanog liganda u DMSO poznate koncentracije u koncentracionom rasponu od 0,5 μM do 50 μM .

Nevezana frakcija DK-I-56-1 i DK-I-60-3 u plazmi ($f_{u,\text{plazma}}$) određena je kao odnos izmerenih koncentracija liganda u puferu (beli deo) i plazmi (crveni deo). Slobodna frakcija u nerazblaženom mozgu ($f_{u,\text{mozak}}$) izračunata je po formuli: $f_{u,\text{mozak}} = 1/D[(1/f_{u,\text{homogenat mozga}} - 1) + 1/D]$, gde D predstavlja faktor razblaženja za homogenat mozga a $f_{u,\text{homogenat mozga}}$ slobodnu frakciju određenu kao odnos koncentracija liganda u puferu (beli deo) i razblaženom homogenatu mozga (crveni deo) (Kalvass i Maurer, 2002).

3.3.3. LC-MS/MS analitička metoda

Analiza je izvršena na UHPLC hromatografu ACELLA (*Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD*), koji je povezan sa triplkvadrupolskim masenim detektorom *TSQ Quantum Access MAX* (*Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD*), koji vrši elektrosprej jonizaciju analita sa zagrevanjem. Korišćena je XTerra MS C18 kolona (150 mm x 2,1 mm, veličina čestica 3,5 μm). Mobilna faza je bila:

- acetonitril/0,1% rastvor mravlje kiseline u vodi = 50:50 (v/v) za analite PZ-II-029, RV-I-029, DK-I-60-3, DK-I-86-1, DK-I-87-1 i DK-I-59-1;
- acetonitril/0,1% rastvor mravlje kiseline u vodi = 60:40 (v/v) za analite LAU 463, DK-IV-19-1, DK-IV-20-1, DK-IV-22-1 i MM-I-10;
- acetonitril/0,1% rastvor mravlje kiseline u vodi = 45:55 (v/v) za analite DK-I-56-1, DK-I-58-1 i DK-II-58-1.

Protok mobilne faze je bio 0,3 mL/min, temperatura kolone je bila podešena na 35 °C, a injekciona zapremina je bila 10 μL .

Ispitana su jonizaciona svojstva svih analita u pozitivnom i negativnom modu i u Tabeli 5 su prikazane tranzicije koje su korišćene za njihovu kvantifikaciju:

Tabela 5. Tranzicije polazni jon-fragment i odgovarajuće kolizione energije korišćene za kvantifikaciju analita

Analit	Mod	Polazni jon	Fragment	Koliziona energija (V)
PZ-II-029	negativan	320,20	305,08	21
DK-I-56-1	pozitivan	325,60	306,93	24
RV-I-029	negativan	322,60	289,80	29
DK-I-60-3	pozitivan	328,30	281,38	29
DK-I-86-1	pozitivan	326,50	310,85	25
LAU 463	negativan	369,80	355,08	24
DK-I-58-1	pozitivan	373,60	328,00	33
DK-II-58-1	pozitivan	375,70	358,01	27
DK-I-87-1	pozitivan	329,70	310,59	25
DK-I-59-1	pozitivan	329,30	252,32	41
DK-IV-19-1	pozitivan	363,70	345,14	27
DK-IV-20-1	pozitivan	379,70	333,18	35
DK-IV-22-1	negativan	423,90	355,09	33
MM-I-10	pozitivan	414,40	196,02	37
SH-I-048A (interni standard)	pozitivan	348,01	302,00	29

Kalibracione krive su pravljene u rasponu 0,05 - 5 $\mu\text{mol/L}$, pri čemu su za njihovu konstrukciju korišćeni odnosi površina pikova analita i internog standarda.

3.4. Protokoli bihejvioralnih eksperimenata

U cilju bazične bihejvioralne karakterizacije supstanci selektivnih za $\alpha 6$ podtip GABA_AR kao i ispitivanja njihove interakcije sa široko primenjivanim benzodiazepinima (diazepam) na oglednim životinjama korišćeni su sledeći testovi: test spontane lokomotorne aktivnosti, uzdignuti plus-lavirint, test jačine stiska, Morisov vodeni lavirint, rotarod test, test gubitka refleksa uspravljanja i pentilentetrazolski test. Sva testiranja sprovedena su tokom svetle faze ciklusa sa početkom u 9 h. Celokupno ponašanje životinje u testovima spontana lokomotorna aktivnost, uzdignuti plus lavirint i Morisov vodeni lavirint praćeno je digitalnom kamerom, postavljenom direktno iznad aparature, povezanom sa ANY-maze softverom (Stoelting Co., Wood Dale, IL, SAD) koji omogućava izračunavanje odabranih parametara (varijabli) (Savić i sar., 2008; 2009). Posle svake životinje aparatura za izvođenje eksperimenta je čišćena razblaženim rastvorom etanola (70%) i papirnom vatom kako bi se uklonili oflaktorni tragovi, a po potrebi, pre etanola, čišćenje je vršeno sušnikom i običnom, česmenskom, vodom. Svi eksperimenti sa oglednim životinjama sprovedeni su u prostorijama vivarijuma Farmaceutskog fakulteta namenjenim za tu svrhu.

3.4.1. Test spontane lokomotorne aktivnosti

Promena u obimu i obrascu motorne aktivnosti je prepoznata kao fundamentalna karakteristika psihijatrijskih i neuroloških bolesti. Zapravo, procena motoričke aktivnosti ima važnu ulogu u definisanju kriterijuma za dijagnozu mentalnih i neuroloških bolesti (Henry i sar., 2010). S tim u vezi, procena opšte motorne i lokomotorne aktivnosti glodara predstavlja jedan od najčešće korišćenih bihejvioralnih metoda u ispitivanju uticaja genetskih, fizioloških i farmakoloških manipulacija na ponašanje ogleđnih životinja (Geyer, 1990). Termin „spontana lokomotorna aktivnost” ukazuje da se radi o grupi neuslovljenih testova u kojima nema eksplicitnih uslovljavanja i gde se rutinski prate parametri motorne i eksplorativne aktivnosti: kretanje, propinjanje, timarenje, grickanje i dr. Mnoge psihotropne supstance se definišu kao stimulansi ili depresori centralnog nervnog sistema dominantno na osnovu njihovog opšteg uticaja na lokomotornu aktivnost glodara. Povećanje lokomotorne aktivnosti u ovom testu pod dejstvom npr. amfetamina ili dizocilpina može se povezati sa pozitivnim simptomima shizofrenije ili bipolarnog poremećaja, i iskoristiti za otkrivanje novih lekova (npr. antipsihotika i stabilizatora raspoloženja). Sa druge strane, smanjenje aktivnosti u ovom testu može biti posledica sedativnog efekta pojedinih psihotropnih supstanci, npr. benzodiazepina, što omogućava da se u eksperimentima interakcija otkriju potencijalni lekovi koji bi antagonizovali neželjene efekte benzodiazepina.

Spontana lokomotorna aktivnost životinja ispitivana je u polu-prozirnim kavezima od pleksiglasa veličine 40 cm × 25 cm × 35 cm, smeštenim na velikom stolu u sobi sa prigušenim crvenim svetlom (20 lx). Radi kontrasta, u slučaju eksperimenata sa albino pacovima korišćena je tamna (crna) podloga na koju su slagane SLA kutije, dok pri radu sa C57BL miševima postavljena je svetlo siva podloga. Odmah nakon primene odgovarajućeg tretmana životinje su stavljane u centar kaveza, a istovremeno su praćene po četiri životinje u pojedinačnim kutijama. U trećem eksperimentu vreme praćenja životinja bilo je najduže (120 minuta), u prvom, drugom, i desetom 90 min, a u preostalih šest eksperimenata 60 minuta. Za praćenje uticaja ispitivanih tretmana u ovom testu analiziran je parametar ukupni pređeni put (tokom čitavog praćenja testa). U poslednjem, devetom, eksperimentu osim ukupnog pređenog puta, analiziran je i dodatni parametar ukupno vreme mobilnosti.

U prvom eskeprimentu, ispitano je pet PQ liganda (PZ-II-029, DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3 i DK-I-87-1) u dozi od 15 mg/kg (n=31). Svi tretmani, uključujući i rastvarač u kontrolnoj grupi (0,25% rastvor metilceluloze) aplikovani su p.o. u zapremini od 15 ml/kg telesne mase eksperimentalne životinje (mužjaci pacova Sprague Dawley soja).

U drugom eskperimentu na Sprague Dawley pacovima (n=42), testirana su dva odabrana PQ liganda, DK-I-56-1 i DK-II-58-1, u dve različite doze, 3 mg/kg i 10 mg/kg, nakon i.p. primene u zapremini od 4 ml/kg telesne mase eksperimentalne životinje. Životinje kontrolne grupe primale su SOL u istoj zapremini.

U trećem eskperimentu koji je sproveden na Sprague Dawley pacovima (n=48), dizajn je uključivao dva faktora varijacije: diazepam (3 mg/kg) i dva PQ ligandada (DK-I-56-1 i DK-I-58-1, oba u dozi od 10 mg/kg). Tretman za životinje kontrolne grupe podrazumevao je SOL + SOL. Kao i u prethodnom eskperimentu, svi tremani su aplikovani u zapremini od 4 ml/kg telesne mase ogleđnih životinja.

Četvrti eksperiment sproveden je na mužjacima pacova Wistar soja (n=32) koji su bili ravnomerno raspodeljeni u četiri eksperimentalne grupe: DK-I-56-1, DK-I-87-1 (formulisani u obliku nanoemulzije koncentracije 2 mg/ml) placebo nanoemulzija, kao jedna kontrolna grupa, i fiziološki rastvor (*saline*, SAL), kao druga kontrolna grupa. Svi tretmani su aplikovani i.p. u zapremini od 5 ml/kg telesne mase životinje, kako bi se postigla ciljna doza ligandada od 10 mg/kg, a sve životinje, uključujući i kontrolne, primile su istu zapreminu tečnosti.

Peti eksperiment predstavlja ponovljen četvrti eksperiment, bez DK-I-87-1 kao jedne od eksperimentalnih grupa, a sa ciljem pouzdanog utvrđivanja efekta susptance DK-I-56-1 u kontekstu spontane lokomotorne aktivnosti. Naime, Wistar pacovi (n=24) ravnomerno su podeljeni u tri eksperimentalne grupe i i.p. tretirani susptancom DK-I-56-1 formulisanom u obliku nanoemulzije (koncentracije 2 mg/ml) u dozi od 10 mg/kg, odnosno placebo nanoemulzijom ili fiziološkim rastvorom.

U šestom eksperimentu ispitan je dozni raspon 1 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg i 30 mg/kg za DK-I-56-1 formulisanog u obliku nanoemulzije nakon i.p. primene, na pacovima Wistar soja (n=28), uz placebo nanoemulziju kao kontrolnu grupu. S obzirom da je koncentracija nanoemulzije bila 2 mg/kg, da bi se postigle predviđene doze, tretmani su aplikovani u sledećim zapreminama: 1,5 ml/kg, 5 ml/kg i 15 ml/kg, redom. Dodatno, radi ujednačavanja količine tečnosti koju životinje primaju i.p., bilo je potrebno, u određenim grupama (doze od 3 i 10 mg/kg), aplikovati uz aktivan tretman i placebo nanoemulziju (10 ml/kg, odnosno 13,5 ml/kg). Zbog potrebe da se i.p. primene veće zapremine, tretmani su za svaku životinju deljeni u dve doze i aplikovani u levi i desni donji abdominalni kvadrant.

U sedmom eksperimentu ispitan je dozni raspon 3 mg/kg, 10 mg/kg i 30 mg/kg za PZ-II-029 formulisanog u obliku nanoemulzije nakon i.p. primene, na miševima C57BL soja (n=40), uz placebo nanoemulziju i fiziološki rastvor kao kontrolne grupe. Aplikacija tretmana bila je po istom protokolu kao u šestom eksperimentu.

Osmi eksperimentu je sproveden po istom protokolu kao sedmi. Ispitan je dozni raspon 3 mg/kg, 10 mg/kg i 30 mg/kg za DK-I-56-1, formulisanog u obliku nanoemulzije nakon i.p. primene, na miševima C57BL soja (n=40), uz placebo nanoemulziju i fiziološki rastvor kao kontrolne grupe. Deveti eksperiment je sproveden na C57BL miševima (n=20) u cilju ispitivanja interakcije između diazepama (3 mg/kg) formulisanog u obliku suspenzije (SOL) i DK-I-56-1 (10 mg/kg) formulisanog u obliku nanoemulzije. Kontrolnu grupu činile su životinje tretirane SOL i placebo nanoemulzijom. Kao i prethodno, nanoemulzija je primenjena u zapremini od 5 ml/kg, a diazepam 2 ml/kg.

Deseti eksperiment je sproveden na adultnim mužjacima C57BL miševa (n = 72) po protokolu sa periodom *wash out*-a i dehabituacije. Testirano je 17 ligandada ukupno, od kojih je 14 PQ ligandada (PZ-II-029, DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3, DK-I-86-1, DK-I-59-1, DK-I-87-1, LAU 463, DK-I-58-1, DK-II-58-1, DK-VI-19-1, DK-IV-20-1, DK-IV-22-1, MM-I-10) i tri kontrolne grupe: SOL kao neutralna kontrola, dizapam kao negativna kontrola i GL-II-73 kao pozitivna kontrola. Sve supstance su bile pripremljene kao suspenzije u SOL-u uz primenu ultrazvuka i aplikovane i.p. u zapremini od 10 ml/kg kako bi se postigle ciljne doze. Doziranje PQ ligandada bilo je 3 mg/kg, diazepam 1,5 mg/kg i GL-II-73 10 mg/kg. Eksperiment je sproveden iz dva dela. Prvi deo je trajao pet dana, testirane su sve 72 životinje i dobijen je n=4 za 16 eksperimentalnih grupa, dok je n=8 bio samo za SOL kontrolnu grupu. Drugi deo je započeo 16 dana nakon završenog prvog dela (period *wash out*-a i dehabituacije), takođe je trajao pet dana, testirane su sve 72 životinje ali tako

da životinja koja je u prvom delu primila jedan tretman, u drugom delu eksperimenta primila je drugi, različit tretman. Generisan je isti broj podataka kao u prvom delu eksperimenta. Na taj način, na kraju eksperimenta za svaku grupu n je bio 8, osim kontrolne SOL grupe gde je n bio 16.

3.4.2. Rotarod test

Pre više od šest decenija, pokazano je da se neurološki deficiti kod miševa ili pacova, kao i stepen relaksacije skeletne muskulature koju prouzrokuju određene farmakološki aktivne supstance (miorelaksansi, konvulzivi, depresori CNS-a) može proceniti na osnovu sposobnosti miša ili pacova da ostane na pokretnom valjku (Dunham i Miya, 1956). Rotarod test se i danas rutinski koristi, ali prvenstveno za procenu ataksičnog dejstva psihotropnih lekova (Licata i sar., 2009). Ovo je od naročitog značaja za farmakologiju benzodiazepina koji kao neželjeno dejstvo imaju motorno oštećenje pod kojim se podrazumeva ataksija, tj. gubitak motorne koordinacije i miorelaksacija (Milić i sar., 2012), što ograničava kliničku primenu benzodiazepina kao anksiolitika.

Za ispitivanje motorne koordinacije pacova korišćen je rotarod aparat prilagođen pacovima (model 47700; Ugo Basile, Komerio, Italija). U svim eksperimentima, pacovi su bili trenirani tokom tri uzastopna dana, sa tri dvominutna pokušaja svakog dana. Brzina rotiranja rotirajućeg vretena bila je fiksirana na 15 rpm (eng. *rounds per minute*). Četvrtog dana, pre samog eksperimenta, napravljena je konačna selekcija: samo oni pacovi koji su ispunili kriterijum da ostanu 180 s na rotirajućem vretenu, bez padanja, izabrani su za dalja testiranja. Vreme koje životinja provede na rotirajućem vretenu do padanja (latenca do padanja) beleženo je automatski za svaku životinju i predstavlja parametar od interesa. Beležene su tri vrednosti vremena za svaku životinju (što znači da je svaka životinja imala tri pokušaja da se održi na rotirajućem vretenu), osim u slučaju da je životinja ostajala na vretenu 180 s pri čemu je beleženo to vreme. Srednja vrednost tri vrednosti datog parametra korišćena je za analizu.

U prvom eksperimentu (n=50), uticaj na motornu koordinaciju ispitan je za PZ-II-029, DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3, LAU 463, DK-I-58-1 i DK-I-87-1, 45 minuta nakon p.o. primene u dozi od 10 mg/kg i u zapremini od 10 ml/kg za sve ligande.

Svi ligandi iz prvog eksperimenta uz dodatak još dva liganda, DK-II-58-1 i DK-I-86-1 testirani su u drugom eksperimentu (n=93) u kombinaciji sa diazepamom. PQ ligandi su primenjeni p.o. u dozi od 30 mg/kg (i zapremini od 10 ml/kg), a 25 minuta nakon njihove primene, i.p. je aplikovan diazepam u dozi od 5 mg/kg (i zapremini od 4 ml/kg). Životinje su u test išle 45 minuta nakon primene PQ liganada.

3.4.3. Test gubitka refleksa uspravljanja

Uobičajena metoda koja se koristi za procenu gubitka svesti kod glodara je gubitak refleksa uspravljanja (Merenick i sar., 2021). Kada se životinja stavi na leđa, refleks uspravljanja aktivira vestibularne organe koji iniciraju pokrete glave i očiju, a nakon toga se ostatak tela vraća u normalan položaj u odnosu na gravitacionu silu. Smatra se da je životinja uspešno izgubila refleks uspravljanja kada je u leđnom položaju sa sve četiri šape podignute u vazduh i ne uspeva da se

vrati u trbušni ležeći, ili u stojeći položaj. Postoji značajna korelacija između gubitka svesti kod ljudi i gubitka refleksa uspravljanja kod miševa i pacova za brojne anestetike (Franks, 2008).

Interesantno je napomenuti da je doza datog anestetika pri kojoj će se pojaviti gubitak refleksa uspravljanja kod pripadnika jedne vrste izuzetno konzistentna, ali se može značajno promeniti pod uticajem faktora sredine. Na primer, pacovi koji su bili lišeni sna su izraženo osetljiviji i na inhalacione i na intravenske anestetike, a pacovi sa visokim aerobnim kapacitetom su manje osetljivi na izofluran (Pal i sar., 2012). Takođe se pokazalo da hipotermija smanjuje dozu brojnih anestetika potrebnih za uspavljivanje kod velikog broja vrsta (Vitez i sar., 1974). Da bi se pouzdano identifikovala doza anestetika pri kojoj se javlja gubitak refleksa uspravljanja kod eksperimentalnih životinja, ključno je da se okruženje za procenu pažljivo kontroliše kako bi se smanjio stres, održala eutermija i isporučile jednake količine leka svim subjektima (McCarren i sar., 2013).

U cilju procene uticaja PQ liganda na hipnotički/anestetički efekat benzodiazepina, sproveden je test diazepamom-indukovanog gubitka refleksa uspravljanja. Pacovi ($n=45$) su podeljeni u 6 eksperimentalnih grupa koje su podrazumevale sledeće tretmane: SOL (kontrolna grupa), PZ-II-029, DK-I-60-3, DK-I-58-1, DK-II-58-1 ili DK-I-87-1. Svi PQ ligandi su primenjeni i.p. u dozi od 20 mg/kg i volumenu 4 ml/kg, 30 minuta pre primene diazepama. Svaka pojedinačna životinja stavljena je u ristrejner od pleksiglasa i rep zagrevan u toploj vodi. Nakon venodilatacije, u lateralnu repnu venu aplikovan je diazepam u dozi od 30 mg/kg u obliku nanoemulzije (koncentracija 2,5 mg/ml) brzinom od 0,5 ml/min pomoću „leptir” infuzionog sistema (veličina igle 25 G) povezanog sa špricom koji je prethodno napunjen tretmanom. Špric je bio pričvršćen na infuzionu pumpu sa motorom (Stoelting Co., Wood Dale Illinois, SAD) koja obezbeđuje isporuku preciznih i tačnih količina tečnosti. Nakon primene odgovarajućih tretmana, životinje su vađene iz ristrejnera i mereno je vreme između gubitka i vraćanja refleksa uspravljanja. Gubitak refleksa uspravljanja se definiše kao gubitak sposobnosti životinje da se uspravi nakon postavljanja u ležeći položaj sa prednjim delom tela okrenutim na gore. Nakon uspravljanja prvi put, potrebno je životinju još jednom vratiti u isti položaj i ukoliko se u toku 15 sekundi uspravi, onda se računa da se životinja oporavila, tj. da je refleks uspravljanja vraćen i beleži se vreme.

Za procenu rezidualne ataksije, odmah nakon vraćanja refleksa uspravljanja, životinje su ispitane kroz test spontane lokomotorne aktivnosti. Procedura je bila ista kao što je opisano u delu **Test spontane lokomotorne aktivnosti**. Pojedinačni pacovi ($n=39$) stavljani su u čiste kutije od pleksiglasa, bez prethodne habituacije i ponašanje praćeno 60 minuta. Ukupan pređeni put (m) je korišćen kao parametar za analizu.

3.4.4. Intravenski pentilentetrazolski test

Pentilentetrazol je stimulant centralnog nervnog sistema, nekompetitivni antagonist GABA_A receptora koji se u laboratorijskim istraživanjima koristi zbog svog konvulzivnog i anksigenog efekta. U zavisnosti od primenjene doze i puta primene PTZ može izazvati mioklonične, klonične, tonične i tonično–klonične napade kod glodara. Intravenski PTZ test predstavlja veoma precizan test za procenu praga konvulzivne aktivnosti kod pojedinačne životinje i omogućava dobijanje validnih podataka na relativno malom broju životinja. Osim toga, dobar je prediktor kliničke efikasnosti lekova koji deluju inhibicijom protoka Ca²⁺ kroz kanale T-tipa, kao što su etosuksimid

ili valproat, ali i supstanci koje povećavaju protok Cl^- jona kroz GABA_AR (benzodiazepini) (Löscher, 2009).

Da bi se procenio efekat odabranih PQ liganda, samih ili u kombinaciji sa diazepamom, na dozu PTZ potrebnu da dovede do konvulzivnog napada pacova, sproveden je intravenski PTZ test.

Pacovi ($n = 41$) podeljeni su u 6 eksperimentalnih grupa koje su primale SOL, DK-I-56-1 (15 mg/kg) ili DK-II-58-1 (15 mg/kg), u kombinaciji sa SOL ili diazepamom (5 mg/kg). PQ ligandi i diazepam su primenjeni i.p., u zapremini od 10 ml/kg, odnosno 2 ml/kg. Pola sata nakon primene odgovarajućih tretmana, pojedinačna životinja stavljana je u ristrejner od pleksiglasa i rep zagrevan u toploj vodi. Nakon venodilatacije, u lateralnu repnu venu aplikovan je PTZ koji je pripremljen rastvaranjem u fiziološkom rastvoru tako da koncentracija bude 40 mg/ml. Kao i u prethodnom ekseperimentu, tretman je davan konstantnom brzinom od 0,5 ml/min pomoću „leptir” infuzionog sistema povezanog sa špricom koji je prethodno napunjen tretmanom i pričvršćen na infuzionu pumpu sa motorom koja obezbeđuje isporuku preciznih i tačnih količina tečnosti. Tokom infuzije životinju su posmatrala dva obučena i za tretman slepa posmatrača. Beležena je zapremina primenjenog rastvora PTZ do pojave prvog klonusa (karakterišu ga brze nevoljne ritmičke kontrakcije i relaksacije ekstremiteta), sa naknadnom toničnom ekstenzijom prednjih i/ili zadnjih ekstremiteta (karakteriše je istežanje ekstremiteta, obično udruženo sa gubitkom svesti) (Mandhane i sar., 2007). Doza pentilentetrazola (mg/kg) potrebna za izazivanje konvulzivnog napada računa se na osnovu zabeležene zapremine rastvora PTZ (ml), koncentracije rastvora PTZ (mg/ml) i telesne težine eksperimentalne životinje (kg), koristeći formulu: zapremina pentilentetrazola (ml) * koncentracija pentilentetrazola (mg/ml)/telesna težina (kg). U skladu sa prethodnim rezultatima iz naše laboratorije (Kovačević i sar., 2014), parametri intravenske infuzione primene (koncentracija PTZ i brzina infuzije) optimizovani su tako da se konvulzivni događaji kod pacova iz kontrolne grupe javljaju za manje od 1 min.

3.4.5. Baterija bihejvioralnih testova na Wistar pacovima

Uzdignuti plus lavirint, test jačine stiska i Morisov vodeni lavirint sprovedeni su kao baterija bihejvioralnih testova na mužjacima pacova Wistar soja (8 životinja po eksperimentalnoj grupi), težine 200-300 g, 45 minuta nakon primene tretmana. Testirani ligandi bili su DK-I-56-1 i DK-I-87-1 formulisani u obliku nanoemulzije pripremljene u koncentraciji od 2 mg/ml. Aplikacijom volumena od 5 ml/kg telesne mase životinje, postignuta je ciljna doza od 10 mg/kg. Kontrolna grupa životinja tretirana je placebo nanoemulzijom (nanoemulzija bez aktivnih supstanci).

3.4.5.1. Uzdignuti plus lavirint

Uzdignuti plus-lavirint (eng. *elevated plus-maze*) koji se zasniva na ispitivanju neuslovljenog, ili spontanog ponašanja životinje, predstavlja verovatno najčešće korišćeni animalni model anksioznosti u bihejvioralnoj farmakologiji (Rodgers i Dalvi, 1997). Uzdignuti plus lavirint se koristi u proučavanju mehanizama koji leže u osnovi anksioznosti, kao i u bihejvioralnoj karakterizaciji nosivih sintetičkih psihotropnih liganda, pri čemu se može detektovati i anksiogeni i anksiolitički efekat primenjenog tretmana. Uzdignuti plus lavirint se bazira na dva bazična biološka fenomena. Prvi je eksploracija – istraživanje nepoznate okoline, dok je drugi razdvajanje

privlačnih i odbojnih delova nepoznatog prostora, a podstaknut je kontrastom koji nepoznata okolina sadrži (u slučaju UPL to su dva otvorena i dva bočnim zidom zatvorena kraka lavirinta). Zbog fenomena tigmotaksije („lokomotorni odgovor na kontakt ili dodir”) odnosno urođenog odabira oivičenog prostora, glodari češće ulaze i duže borave u zatvorenim kracima lavirinta. U ovakvim eksperimentalnim okolnostima, životinja je suočena sa konfliktom između urođenog straha glodara prema otvorenom prostoru i težnje da istraži nepoznati prostor u kome se nalazi kako bi pronašla izlaz (Belzung, 1999; Steimer, 2011).

U našem istraživanju korišćen je lavirint izrađen od pleksiglasa crne boje koji nosači podižu na visinu od 50 cm. Po dva otvorena (50 cm dužine × 10 cm širine) i dva zatvorena kraka (50 cm dužine × 10 cm širine × 40 cm visine) su naspramno postavljena, u obliku znaka plus, i povezana centralnim prostorom (10 cm × 10 cm). Eksperimentalna soba je bila osvetljena pomoću jedne crvene neonske cevi, tako da je na površini krakova lavirinta intenzitet svetla bio 10 lx.

Nakon aplikacije tremana životinje su stavljane u zasebne kaveze i prenošene u prostoriju gde se sprovodi eksperiment kako bi se aklimatizovale na prostor. Nakon 45 minuta od aplikacije tretmana pacov je bio postavljen u centralni prostor, okrenut prema jednom od zatvorenih krakova. Ponašanje životinje praćeno je ANY–maze softverom tokom 5 minuta. Najmanje 90% životinje moralo je preći virtuelnu liniju koja razdvaja centralni kvadrat lavirinta od kraka kako bi softver registrovao ulazak u zonu, dok se izlazak registruje kada 90% životinje napusti odgovarajući krak lavirinta.

U eksperimentu su praćeni i statistički analizirani standardni prostorno–vremenski parametri: ukupni pređeni put, broj ulazaka u zatvorene krake i procenat ulazaka u otvorene krake. Podaci o ponašanju na otvorenim kracima su izražavani kao procenat ukupne aktivnosti (npr. broj ulazaka u otvorene krake/(broj ulazaka u otvorene krake + broj ulazaka u zatvorene krake)), da bi se izbegao uticaj eksplorativne aktivnosti životinje u centralnoj zoni plus–lavirinta.

Bihevioralni parametri koji se prate u ovom modelu ukazuju na dve, a prema nekim autorima i više, dimenzije („faktora”) ponašanja. Jedna koja odražava anksioznost, i druge koja se može povezati sa motornom aktivnošću (prema Rodgers i Johnson, 1995, navode se i dimenzije ponašanja vezane za eksploraciju, za procenu rizika i donošenje odluka). Od parametara koje smo mi analizirali, procenat ulazaka u otvorene krake je parametar izrazito zavisian od faktora koji se može povezati sa nivoom anksioznosti eksperimentalne životinje, dok se ukupni pređeni put i broj ulazaka u zatvorene krake može smatrati relativno specifičnim indeksom lokomotorne aktivnosti (Cruz i sar., 1994; Rodgers i Johnson, 1995).

3.4.5.2. Test jačine stiska

Decenijama unazad za procenu miorelaksantnog efekta lekova i toksičnih supstanci, kao i neuroloških deficita koji se javljaju u sklopu određenih bolesti koristi se test jačine stiska glodara u kom se meri sila kojom pacov svojim prednjim šapama povlači žicu. Uveden je i kao deo regulatorne baterije testova u ispitivanju neurobihevioralne toksičnosti (Maurissen i sar., 2003). Miorelaksantni farmakološki efekat benzodiazepina može se ispitivati testom jačine stiska sa velikom pouzdanošću, što omogućava da se ove supstance mogu koristiti i u cilju validacije metode (Meyer i sar., 1979).

Odmah nakon okončane procedure u uzdignutom plus lavirintu svaka životinja podvrgnuta je testu za procenu miorelaksantnog dejstva primenjenih liganada. Naime, jačina stiska prednjih šapa pacova testirana je komercijalno dostupnim aparatom (model 47105; Ugo Basile, Milano, Italija).

Eksperimentator pacova pridržava jednom, dok mu drugom rukom pomaže da uhvati trouglastu žicu. Prilikom povlačenja pacova za rep, u horizontalnoj ravni, on se refleksno hvata za žicu u cilju odupiranja ovom povlačenju unazad. Trouglasta žica je direktno povezana sa transdjuserom koji predstavlja izometrijski pretvarač primenjene sile (pretvara je u masu). Tako da aparat zapravo meri maksimalnu silu konstantnog povlačenja (u gramima) koju primenjuje eksperimentator kako bi nadvladao jačinu stiska prednjih šapa pacova. Svaka životinja je imala tri uzastopna pokušaja (pokušaj je završen tek kada pacov ispusti žicu), a medijana normalizovana u odnosu na telesnu težinu životinje (jačina stiska (kg)/telesna masa životinje (kg)) uzimana je za dalju statističku analizu.

3.4.5.3. Morisov vodeni lavirint (MVL) - „*cued-learning*” protokol

Morisov vodeni lavirint (eng. *Moris water maze*) predstavlja laboratorijski test koji se koristi u bihevioralnim neuronaukama za proučavanje neurobiologije i neurofarmakologije prostornog učenja i pamćenja kod pacova i miševa. Prate se dve komponente memorije: proceduralna ili implicitna i deklarativna ili eksplicitna (Izquierdo i sar., 1999, 2006). Proceduralna memorija u MVL podrazumeva da životinja treba da nauči da plivanjem pronalazi platformu koja predstavlja potencijalni izlaz iz nepoznate sredine (eng. *swimming-to-escape*), dok put plivanja do platforme, koga definišu prostorni znaci tj. orijentiri pripada deklarativnoj komponenti memorije (eng. *swimming-to-a-specific-location*) (Izquierdo i sar., 2006).

U našoj studiji koristili smo jedan od protokola MVL-a prema kome se na platformu postavlja orijentir (učenje pomoću znakova; eng. „*cued-learning*”) i ispituje se sposobnost životinje da nauči da pliva prema obeleženom cilju (Vorhees i Williams, 2006). Moris je ovaj protokol uveo kao kontrolnu proceduru pre izvođenja originalnog testa prostornog učenja životinja uz pomoć distalnih orijentira. Naime, ukoliko postoji deficit u učenju pomoću direktnih orijentira, onda postoji velika verovatnoća da će postojati deficit u prostornom učenju kada se koriste distalni znaci kao orijentiri. To je zato što učenje sa postavljenim znakom zahteva iste osnovne sposobnosti: očuvan vid, motoričke sposobnosti (plivanje), osnovne strategije (plivanje dalje od zida, učenje penjanja na platformu) i istu motivaciju (bekstvo iz vode) kao i verzija zadatka gde je skrivena platforma, kada su distalni znaci orijentiri u njenom pronalaženju.

U cilju ispitivanja uticaja odabranih PQ liganada na bazičnu senzorno-motornu aktivnost, nakon testa jačine stiska, sproveden je test vodenog lavirinta sa postavljenim znakom kao navigacijom za oglednu životinju. Vodeni lavirint koji je košrišćen predstavlja crni okrugli bazen prečnika 2 m i dubine 60 cm sa jednoličnom unutrašnjom površinom. Bazenu se puni vodom (temperatura 22 ± 1 °C) do visine od 30 cm. Oznakama za strane sveta (sever, jug, zapad, istok) koje se nalaze na ivicama bazena, u ANY-maze softveru napravljena je virtuelna podela bazena na četiri kvadranta i više regija koje su od značaja za analizu ponašanja životinje: centralni deo zauzima 10%, središnji prsten (u kome se nalazi platforma i ciljni region) 40% i periferni prsten 50% celokupne površine bazena (Savić i sar., 2009).

Ciljna platforma (10 cm × 15 cm) čije pronalaženje od strane životinje predstavlja okončanje procedure, potopljena je 2 cm ispod površine vode, fiksirana je za dno bazena, nalazi se u sredini severo-istočnog kvadranta bazena, i iste je boje kao unutrašnjost bazena, što je čini nevidljivom za pacove. U okolini bazena nalaze se mnogi distalni orijentiri (vrata, cevi na zidovima i plafonu,

uglovi prostorije, kamera postavljena iznad centra lavirinta), za koje se ne može isključiti da su od pomoći životinji prilikom orijentacije u prostoru. Međutim, u protokolu koji smo mi koristili na platformi se nalazio objekat visine 21 cm koji predstavlja proksimalni orijentir tj. svesno postavljenu orijentaciju za životinje kao pomoć prilikom pronalaženja platforme. Aparatura je osvetljena indirektnom belom svetlošću koju obezbeđuju dve bele neonske sijalice koje su postavljene na zid ispod ravni gornjeg ruba bazena.

Svaki pacov je podvrgnut eksperimentalnom bloku koji se sastojao od četiri uzastopna plivanja (pokušaja). Svaki put pacov je spuštano u vodu glavom okrenut prema ivici bazena, sa iste, jugo-zapadne, startne pozicije koja predstavlja najudaljeniju tačku od platforme. U slučaju nalaska platforme pacovu se dozvoljavalo da ostane na njoj oko 15 s. Pokušaj je trajao od trenutka puštanja pacova u bazen do nalaženja platforme. Ukoliko pacov ne uspe da pronađe platformu za predviđeno vreme od 120 s, eksperimentator ga uzima u ruku i po površini vode dovodi do platforme. U tom slučaju podrazumeva se da je rezultat maksimalan, odnosno 120 s.

Parametri koji su korišćeni za statističku obradu i analizu bili su: ukupni pređeni put (m), srednja brzina plivanja (m/s) i % puta koji je životinja plivala u perifernom prstenu.

3.5. Protokol ispitivanja profilaktičkog antinociceptivnog efekta DK-I-56-1 na modelu trigeminalne neuropatije kod pacova

3.5.1. Model unilateralne hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog nerva (eng. *chronic constriction injury of infraorbital nerve (IoN-CCI)*)

U literaturi je opisana metodologija oko 40 različitih modela neuropatskog bola, što je u velikoj meri doprinelo razumevanju perifernih i centralnih patogenetskih mehanizama koji doprinose njegovom nastanku i održavanju. Dodatno, animalni modeli omogućavaju ispitivanje efikasnosti postojećih i novootkrivenih potencijalnih lekova i drugih terapijskih strategija u lečenju neuropatskih bolova. Od sedamdesetih godina 20. veka počinju da se uvode modeli hroničnog bola zasnovani na različitim povredama perifernih nerava (Jaggi i sar., 2011). Model unilateralne hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog nerva kod pacova predstavlja model trigeminalne neuropatije koji smo koristili u našoj studiji. Operativna procedura podvezivanja nerva izvedena je, uz određene modifikacije, prema protokolima navedenim u Vos i sar. (1994) i Deseure i Hans (2015).

Pacovi Wistar soja (n=24) su anestetizirani i.p. primenom kombinacije ketamin hidrohlorida i ksilazin hidrohlorida (60 mg/kg, odnosno 10 mg/kg). Glava pacova je najpre obrijana, a onda napravljen rez na srednjoj liniji poglavine (Slika 14a). Disekcijom kraja orbite koju čine gornjevilična, čeona, suzna i zigomatična kost ekspoziran je infraorbitalni deo leve grane infraorbitalnog nerva. Kako bi se pristupilo infraorbitalnom nervu sadržaj orbite je pomoću štapića sa pamučnim vrhom nežno pomeren pazeći da se ne ošteti prednji etmoidalni nerv koji leži iznad infraorbitalnog nerva. Pomoću istog štapića i pincete, infraorbitalni živac je odvojen od okolnog tkiva i podvezan resorptivnim koncem 5-0 (Slika 14b) tako što su postavljene dve ligature na međusobnom rastojanju od 2 mm. Nakon podvezivanja, promer nerva je bio vidljivo smanjen, ali do nivoa da ne dodje do prekida cirkulacije u površinskoj vaskularnoj mreži. Rana je ušivena svilenim koncem (5-0), a životinje su raspoređene u pojedinačne kaveze do oporavka. Životinje

kontrolne grupe (n=22) su bile podvrgnute istoj hirurškoj proceduri, gde je pristupljeno infraorbitalnom živcu, ali on nije podvezan (eng. *sham* operacija).

a)



b)



Slika 14. a) Rez na srednjoj liniji pogravnice pacova i pristupanje levom infraorbitalnom živcu; b) podvezivanje levog infraorbitalnog živca tako da se redukuje promer živca. Plasiraju se dve ligature na međusobnom rastojanju od 2 mm.

3.5.2. Praćenje izazvanog bolnog ponašanja (mehaničke alodinije)

Poseban značaj modela trigeminalne neuropatije koji smo koristili ogleda se u tome što se hirurški izazvanom povredom infraorbitalnog nerva kod pacova manifestuje kako spontano, tako i indukovano/izazvano bolno ponašanje životinje, što omogućava proučavanje mehanizama uključenih u nastanak trigeminalnog neuropatskog bola i njegovo lečenje (Deseure i Hans, 2015). Spontano bolno ponašanje podrazumeva prisustvo fizioloških, bihejvioralnih ili drugih manifestacija koje ukazuju na prisustvo bola u regiji koja je inervisana oštećenim nervom, a koji nije izazvan dodatnom stimulacijom bolnog mesta. Sa druge strane, izazvano bolno ponašanje podrazumeva alodinjiju (abnormalno intenzivna i produžena senzacija bola sa eksplozivnim karakterom izazvana blagom i neškodljivom somatosenzornom stimulacijom) i hiperalgeziju (intenzivnija i duža bolna senzacija izazvana noksičnim stimulusom u poređenju sa bolnom senzacijom koju bi ista noksa izazvala kod zdrave jedinke) (Vos i sar., 1994).

Po smeštanju u vivarijum životinje su raspoređene u pojedinačne kaveze i ostavljene dva dana da se priviknu na uslove smeštaja. Nakon toga, svakodnevno su prenošene u prostoriju, osvetljenu indirektnom belom svetlošću, gde su najpre bile navikavane na proceduru, a onda i testirane (praćenje ponašanja i beleženje vrednosti). Proces navikavanja na proceduru (tzv. *handling*) podrazumevao je prenošenje svake životinje u poseban stakleni kavez (250 mm x 150 mm x 165 mm) sa metalnim poklopcem u trajanju od 15 minuta sa ciljem adaptacije na von Frey filamente, počevši od sedmog dana pre beleženja bazalnih vrednosti do kraja ogleda. Tokom procesa adaptacije eksperimntator na svakih 30 sekundi podiže poklopac kaveza i dodiruje zid plastičnim štapićem. Testiranje životinja i beleženje vrednosti rađeno je na isti način kao i navikavanje životinja, s tim da se umesto otvaranja kaveza i dodirivanja zida plastičnim štapićem, primenjivao von Frey filament na koži lica životinje. Navikavanje životinja, kao i testiranje, sprovedeno je u

periodu od 9 do 14 h, dok su tretmani aplikovani nakon navikavanja ili praćenja ponašanja koje bi bilo sprovedeno tog dana, u periodu od 15 do 16 h.

Serijski kalibrirani von Frey filamenti od 1 g, 2 g i 6 g (Aesthesio[®] Von Frey Kit, Touch Sensory Evaluator, Ugo Basile, Varese, Italija) koji su se primenjivali na koži lica u predelu vibrisa korišćena je za praćenje izazvanog bolnog ponašanja životinje, tj. mehaničke alodinije. Jedan dan pred operaciju, utvrđene su bazalne vrednosti odgovora na von Frey filamente, a zatim 7-og, 14-og, 21-og i 28-og dana nakon operacije (vremenski tok eksperimenta prikazan je na slici Slici 16). Svaka reakcija na nadražaj ogleadne životinje registrovana je sledećom skalom: 0 – izostanak odgovora, 1 – otkrivanje nadražaja, 2 – reakcija blagog povlačenja glave od nadražaja i/ili pojedinačni pokret brisanja nadražene zone lica, 3 – reakcija izbegavanja ili napada, 4 – asimetrično ponavljano brisanje lica, najmanje tri u seriji, usmereno ka nadraženoj zoni (Vos i sar. 1994). Primenjena metodologija obuhvatala je protokol, po kome se svaka ogleadna životinja dodiruje po tri puta filamentom jedne gramaže u razmaku od nekoliko sekundi, u predelu vibrisa, na strani na kojoj je podvezan živac i na osnovu reakcije dodeljivana je po jedna ocena sa opisane skale. To je značilo da je svaka životinja dobijala po tri ocene (odgovori na seriju od tri filameta) iz kojih je izračunata srednja vrednost, koja je korišćena u statističkoj analizi. Manja ocena ukazivala je na slabiji odgovor na mehaničku stimulaciju filamentima tj. na manje bolno stanje, a veća ocena ukazivala je na jači, bolni (alodinijski) odgovor.

a)



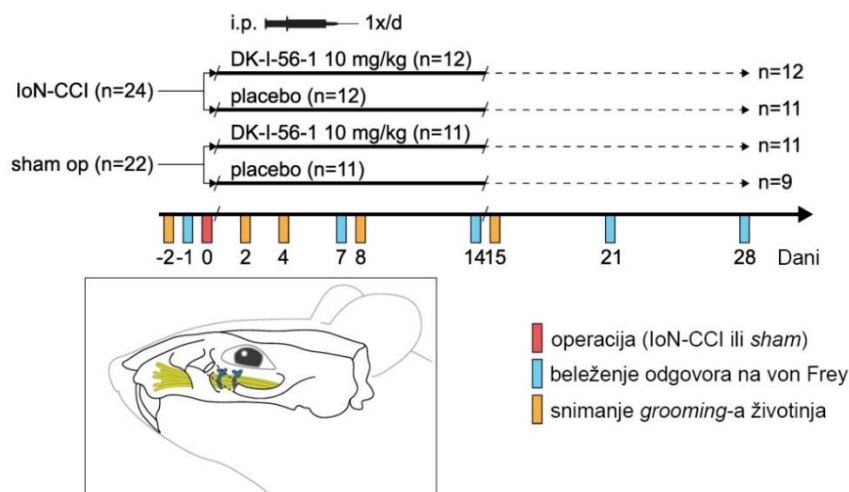
b)



Slika 15. a) Von Frey filamenti (Aesthesio[®] Von Frey Kit, Touch Sensory Evaluator, Ugo Basile, Varese, Italija) od kojih smo u našem eksperimentu koristili seriju do tri filameta (1 g, 2 g i 6 g); **b)** način primene filameta na kožu lica životinje u predelu vibrisa.

3.5.3. Ispitivanje profilaktičkog antinocicpetivnog efekta DK-I-56-1 u modelu trigeminalnog neuropatskog bola

U ovom delu istraživanja ispitivana je validnost modela hronične konstrikcione povrede na nastanak trigeminalne neuropatije, kao i protektivno antinocicpetivno dejstvo DK-I-56-1 u pomenutom modelu. Nakon operativne procedure podvezivanja infraorbitalnog nerva (IoN-CCI grupa), odnosno pristupa nervu ali bez podvezivanja (*sham* grupa), životinje su podeljene u četiri eksperimentalne grupe na sledeći način (Slika 16). Životinje IoN-CCI grupe podeljene su u dve jednake grupe od kojih je jedna tretirana placebo u obliku nanoemulzije bez aktivne supstance, a druga DK-I-56-1 u obliku nanoemulzije u dozi od 10 mg/kg, jednom dnevno, tokom 14 uzastopnih dana, počevši od prvog dana nakon operacije. Praćenje mehaničke alodinije *von Frey* filameta prema gorenavedenom rasporedu sprovedeno je jednostruko slepim istraživanjem.

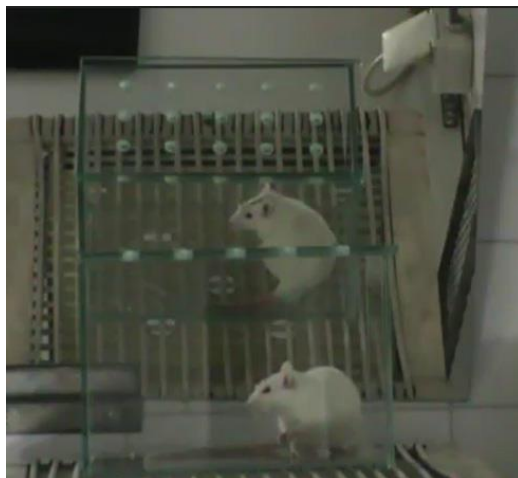


Slika 16. Vremenski tok eksperimenta ispitivanja profilaktičkog dejstva DK-I-56-1 primenivanog intraperitonealno u dozi od 10 mg/kg tokom 14 uzastopnih dana u modelu trigeminalne neuropatije. Formirane su četiri eksperimentalne grupe (dve u okviru IoN-CCI – DK-I-56-1 i placebo; dve u okviru sham – DK-I-56-1 i placebo) na kojima je praćen odgovor na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima u prethodno definisanom vremenskim tačkama (jedan dan pre operacije, 7., 14., 21. i 28. dana posle operativne procedure) kao i sprovedeno snimanje radi procene timarenja lica (*grooming*) u definisanim tačkama (dva dana pre operacije, 2., 4., 8., i 15. dana nakon operativne procedure). IoN-CCI- hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca (životinje kojima je živac podvezan); sham op – lažna operacija (životinje kod kojih je operativnom procedurom pristupljeno živcu, ali on nije podvezan).

3.5.4. Praćenje „umivanja“ lica životinja

Postoje dva tipa ponašanja eksperimentalne životinje koje podrazumeva dodirivanje predela lica prednjim šapama, što se označava terminom timarenje – „umivanje“ lica (eng. *face grooming*): izolovano „umivanje“ lica (eng. *isolated face grooming*), kome niti prethodi nisti sledi timarenje tela i „umivanje“ lica koje je deo generalnog timarenja tela (eng. *face groomig during body grooming*) kada životinja nakon što dodiruje lice, dodiruje i ostale delove tela. Stimulacija lica različitim noksama (npr. injekcija formalina) može da uzrokuje značajne promene (porast) u izolovanom „umivanju“ lica (Deseure i Hans, 2015). U eksperimentu modelovanja trigeminalne neuropatije, pratili smo „umivanje“ lica koji je deo generalnog timarenja i koji predstavlja pouzdan parametar za potencijalne nespecifične efekte lekova kao što su sedacija i motorna inakapacitacija (Deseure i Hans, 2015).

Snimanje životinja u trajanju od 10 minuta vršeno je u prostoriji gde i ispitivanje bolnog ponašanja, u istim, staklenim, kavezima sa poklopcem, i to dva dana pre operacije (bazična, kontrolna vrednost), 2, 4, 8, i 15 dana posle operacije (što bi otprilike bilo 18 h nakon 1, 3, 7 i 14 aplikacija tretmana). Sa suprotne strane kaveza u odnosu na poziciju kamere, bilo je postavljeno ogledalo kako bi se na snimcima životinja videla sa svih strana (Slika 17). Vreme koje životinja provede u *face grooming*-u (*face grooming during body grooming*) mereno je štopericom i analizirano od strane dva eksperimentatora koji su bili slepi za tretmane.



Slika 17. Aparatura za praćenje „umivanja“ lica životinja (stakleni kavez, ogledalo, kamera). Snimanje je trajalo 10 minuta, a parametar koji je analiziran bilo je vreme provedeno u timarenju lica kao delu generalnog timarenja tela.

3.6. Statistička analiza podataka

Svi numerički rezultati eksperimenata prikazani na slikama dati su kao srednja vrednost \pm standardna greška (eng. *standard error of the mean*, SEM). Pre primene analize varijanse, podaci su testirani na homogenost i normalnu raspodelu.

Samo na rezultate drugog farmakokinetičkog eksperimenta koji je imao za cilj da uporedi uticaj formulacije na farmakokinetiku supstance DK-I-56-1 u plazmi i mozgu, primenjena je statistička analiza. Naime, međusobno poređenje po tri vrednosti koncentracija u određenim vremenskim tačkama kao i parametara izvršena su jednofaktorskom analizom varijanse (jednofaktorska ANOVA) sa formulacijom kao jedinim faktorom varijacije (suspenzija, rastvor i nanoemulzija). Ostali farmakokinetički eksperimenti zbog velikog broja generisanih podataka za različite ligande, i zbog nemogućnosti jasnog grupisanja liganada i međusobnog poređenja, tumačeni su bez statističke analize.

Rezultati iz svih SLA eksperimenata sa izuzetkom trećeg i desetog eksperimenta, zatim iz rotarod testa, testa gubitka refleksa uspravljanja, uzdignutog plus lavirinta i testa jačine stiska analizirani su jednofaktorskom ANOVA-om sa tretmanom kao jedinim faktorom. Podaci iz desetog SLA eksperimenta analizirani su Student t-testom gde je poređenje svake od 16 grupa vršeno u odnosu na neutralnu kontrolnu grupu (SOL).

Podaci iz trećeg SLA eksperimenta i intravenskog PTZ testa analizirani su korišćenjem dvofaktorske ANOVA, gde su faktori uticaja bili prvi: SOL ili diazepam u slučaju oba eksperimenata i drugi: SOL, DK-I-56-1 ili DK-I-58-1, u slučaju trećeg SLA testa, odnosno SOL, DK-I-56-1 i DK-II-58-1 u slučaju intravenskog PTZ testa. U ovim slučajevima izabrana je dvofaktorska ANOVA kako bi se ispratila značajnost uticaja svakog od faktora posebno, kao i njihove interakcije.

Vrednosti parametara dobijenih u testu vodenog lavirinta tokom četiri uzastopna plivanja analizirane su dvofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanim merenjima, gde su nivoi tretmana i

pokušaji plivanja bili faktori. Različiti pokušaji plivanja (četiri nivoa), ujedno, predstavljaju i faktor koji se ponavljao za jedinke (*within-subjects factor*).

U animalnom modelu trigeminalne neuropatije, podaci dobijeni u odgovoru na von Frey filamente obrađeni su korišćenjem jednofaktorske ANOVA-e za dati dan, sa tretmanom kao jednim faktorom varijacije. Iako se stimulacijom von Frey filamentima dobijaju odgovori koji predstavljaju kategoričke, ordinalne varijable, analizirani su parametarskim testovima radi preglednijeg grafičkog prikaza dobijenih statističkih značajnosti, a što je statistički prihvatljivo na osnovu podataka u literaturi (Deseure i sar., 2003).

Podaci dobijeni iz eksperimenta praćenja „umivanja“ lica životinja analizirani su neparametarskim testovima, Kruskal Wallis-ovim i Friedman-ovim testom.

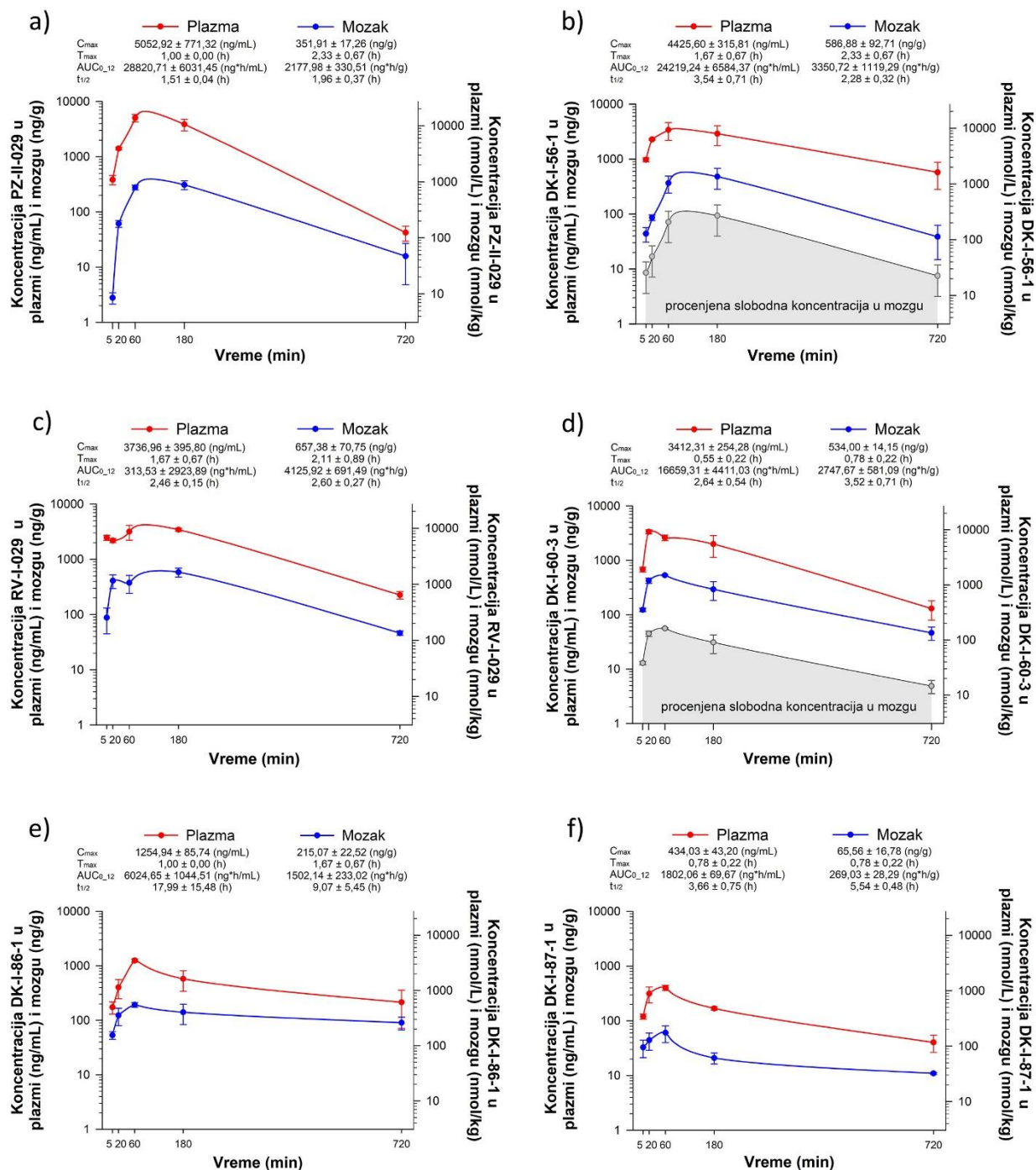
Ukoliko su uticaji faktora bili statistički značajni, *post hoc* poređenja vršili smo Student–Newman–Keuls (SNK) testom. Statističke analize su vršene pomoću komercijalnih softvera *ANY-maze Video Tracking Sistem* (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) i softvera Sigma Plot 12 (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA). U svim eksperimentima, razlike na nivou $p < 0,05$ uzimane su kao statistički značajne, dok su razlike $0,1 > p > 0,05$ smatrane trendom.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati *in vitro* eksperimenata

4.1.1. Određivanje farmakokinetičkih profila i parametara izabranih liganada u ciljnim tkivima oglednih životinja

Farmakokinetički profili i parametri PZ-II-029, DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3, DK-I-86-1 i DK-I-87-1 u plazmi i mozgu, nakon i.p. primene suspenzije navedenih liganada u dozi od 10 mg/kg, predstavljeni su na Slici 18. Krive odnosa koncentracija-vreme ukazuju da se svi testirani ligandi relativno brzo apsorbiraju i distribuiraju u mozak. Nedeuterisani PZ-II-029 ima nižu vrednost mozak – plazma particionog koeficijenta ($K_p=0,08 \pm 0,01$) u poređenju sa vrednostima za tri deuterisana analoga DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3 ($K_p=0,13 \pm 0,01$; $0,16 \pm 0,02$ i $0,17 \pm 0,02$, redom). Dodatno, deuterisani analozi imaju duže poluvreme eliminacije i u plazmi i u mozgu u poređenju sa PZ-II-029. Deuterisani N-hetero analog, DK-I-86-1, ima niže vrednosti parametra AUC_{0-12} u poređenju sa deuterisanim analogima koji ne sadrže atom azota u D prstenu (postiže svega 45%, 36% i 55% od vrednosti koje su dobijene za DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3, redom). Orto-OCD₃ supstituisani analog, DK-I-87-1, ima vrednost particionog koeficijenta od $K_p=0,15 \pm 0,01$ koja ukazuje da se ligand distribuira u mozak i da poseduje zadovoljavajući farmakokinetički profil, tako da se u *in vivo* studijama može koristiti kao kontrolna supstanca.



Slika 18. Farmakokinetički profili odabranih PQ liganada. Krive zavisnosti koncentracija (ng/mL, odnosno ng/g na levoj osi i nmol/L, odnosno nmol/kg na desnoj osi) od vremena, za PZ-II-029 (a), DK-I-56-1 (b), RV-I-029 (c), DK-I-60-3 (d), DK-I-86-1 (e) i DK-I-87-1 (f) nakon intraperitonealne primene doze od 10 mg/kg ($n=3$ po vremenskoj tački). Za ligande DK-I-56-1 i DK-I-60-3 predstavljeni su i profili procenjenih slobodnih koncentracija u mozgu u zavisnosti od vremena. C_{max} = maksimalna koncentracija u plazmi ili mozgu; T_{max} = vreme maksimalne koncentracije u plazmi ili mozgu; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-12} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (12 h).

Pošto su za tri deuterisana analoga PZ-II-029 dobijene generalno slične vrednosti farmakokinetičkih parametara, dalja ispitivanja smo nastavili sa dva od tri liganda, DK-I-56-1 i DK-I-60-3. U tom smislu, za njih su određene slobodne frakcije i izračunate slobodne koncentracije u plazmi i mozgu. Vrednosti slobodnih frakcija u plazmi bile su izrazito niske (0% za DK-I-56-1, odnosno 0,84% za DK-I-60-3). S obzirom da su samo slobodni molekuli leka dostupni za vezivanje za ciljne receptore i ostvarivanje farmakoloških efekata od posebnog značaja su vrednosti slobodnih frakcija u mozgu koje iznose 19,45% za DK-I-56-1, odnosno 10,51% za DK-I-60-3 (izračunate vrednosti slobodnih koncentracija izražene u nmol/kg prikazane su u Tabeli 5). Kada se na osnovu ovih vrednosti izračunaju slobodne koncentracije u datim vremenskim tačkama u mozgu dobija se farmakokinetički profil slobodnih koncentracija u mozgu DK-I-56-1 i DK-I-60-3 (predstavljeno na Slici 6b, odnosno 6d), na osnovu čega su dalje izračunati farmakokinetički parametri (Tabela 6). Poređenjem vrednosti parametra AUC_{0-12} uočava se da je oko dva puta veća vrednost za DK-I-56-1 u odnosu na DK-I-60-3 ($651,72 \pm 217,70$ ng*h/g, odnosno $288,78 \pm 61,07$ ng*h/g). Imajući u vidu elektrofiziološku aktivnost DK-I-56-1 koja iznosi približno 200% kada se primeni $0,1 \mu\text{M}$ DK-I-56-1 uz prisustvo $EC_{3.5}$ GABA-e (Knutson i sar, 2018), slobodne koncentracije liganda reda veličine do 100 nM su dovoljne da se ostvari modulacija $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptora *in vivo*. Stoga, DK-I-56-1 je odabran za istraživanje kroz bateriju bihevioralnih testova, kao i primenu u modelu trigeminog neuropatskog bola.

Tabela 6. Vrednosti slobodnih koncentracija (nmol/kg) DK-I-56-1 i DK-I-60-3 u mozgu. Predstavljene su srednje vrednosti tri određivanja \pm SEM.

Vremenska tačka	Slobodne koncentracije (nmol/kg) \pm SEM	
	DK-I-56-1	DK-I-60-3
5 min	$26,26 \pm 7,87$	$39,50 \pm 2,94$
20 min	$51,84 \pm 6,14$	$136,64 \pm 15,29$
1 h	$219,93 \pm 75,99$	$170,89 \pm 5,05$
3 h	$288,14 \pm 118,27$	$94,50 \pm 35,68$
12 h	$23,15 \pm 14,27$	$14,88 \pm 4,06$

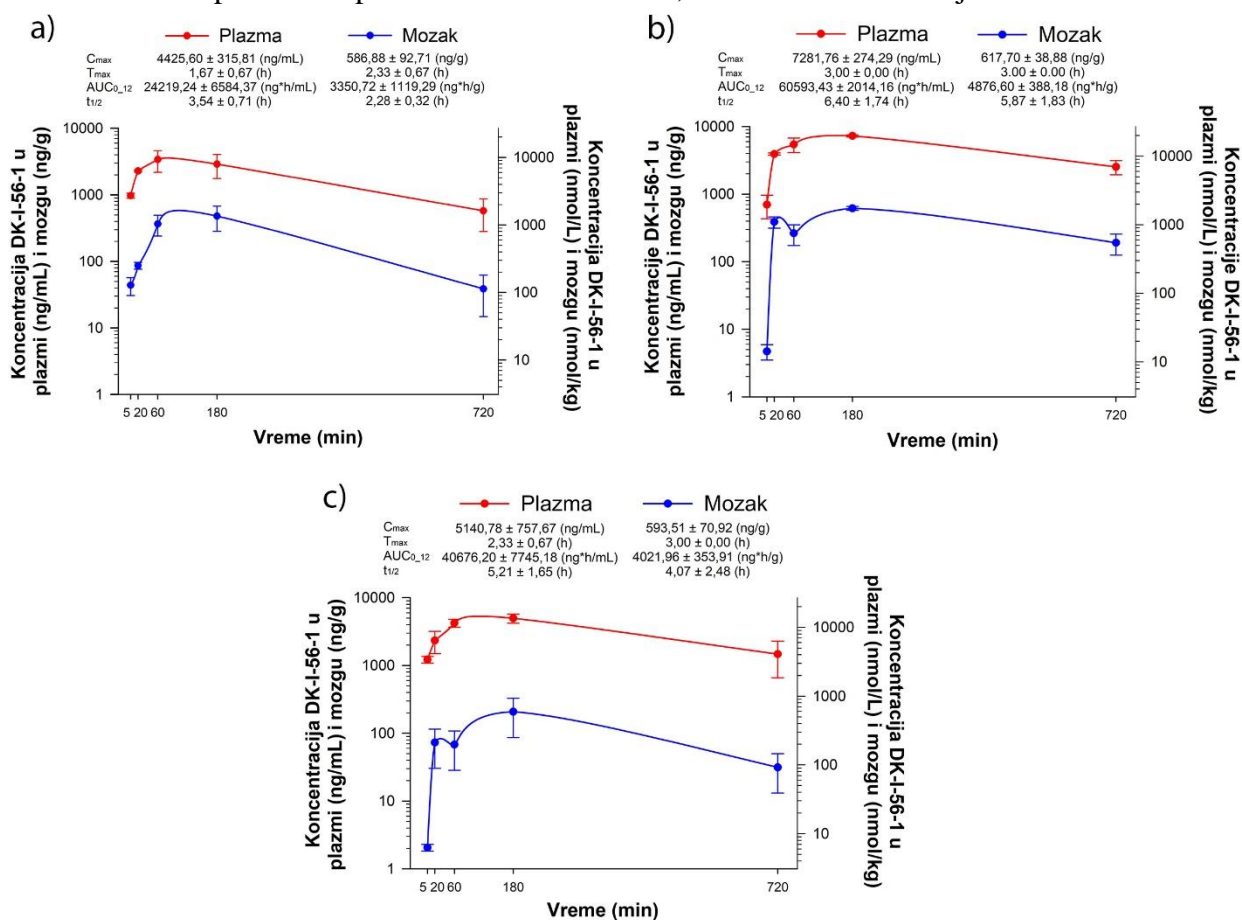
Tabela 7. Vrednosti parametara slobodnih koncentracija DK-I-56-1 i DK-I-60-3 u mozgu. Predstavljene su srednje vrednosti tri izračunavanja \pm standardna greska. C_{\max} = maksimalna koncentracija; T_{\max} = vreme maksimalne koncentracije; AUC_{0-12} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (12 h); $AUC_{0-\infty}$ = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do beskonačnosti; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; β = konstanta brzine eliminacije.

Parametar	DK-I-56-1	DK-I-60-3
C_{\max} (ng/g)	$114,15 \pm 18,03$	$56,12 \pm 1,49$
t_{\max} (h)	$2,33 \pm 0,67$	$0,78 \pm 0,22$
AUC_{0-12} (ng*h/mL)	$651,72 \pm 217,70$	$288,78 \pm 61,07$
$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)	$680,55 \pm 231,34$	$316,01 \pm 53,75$

$t_{1/2}$ (h)	$2,28 \pm 0,32$	$3,52 \pm 0,71$
β (1/h)	$0,31 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,05$

Drugi farmakokinetički eksperiment sproveden je da bi se ispitaio uticaj formulacije na farmakokinetičko ponašanje DK-I-56-1, a sa krajnjim ciljem procenjivanja potencijalne prednosti biokompatibilne nanoemulzije nad rastvorom koji sadrži 20% organskog rastvarača DMSO. S tim u vezi određeni su farmakokinetički profili i izračunati parametri nakon i.p. aplikacije nanoemulzije, odnosno rastvora datog liganda u dozi od 10 mg/kg (Slika 19). U statističku analizu uključeni su i farmakokinetički podaci koji su dobijeni za DK-I-56-1 u prvom esperimentu (formulacija suspenzija).

Uprkos očiglednim razlikama između vrednosti koncentracija u različitim vremenskim tačkama za različite formulacije za supstancu DK-I-56-1 (Tabele 7 i 8), statistički značajne razlike dobijene su samo u vremenskim tačkama od 3 h za plazmu [$F(2,6)=7,318$; $p=0,025$] i 5 min za mozak [$F(2,5)=6,662$; $p=0,039$]. *Post hoc* analiza je pokazala da je koncentracija u plazmi nakon primene rastvora u trećem satu bila viša nego nakon primene suspenzije, dok u odnosu na koncentraciju nakon primene nanoemulzije nije bilo razlike. Istom *post hoc* analizom pokazano je da je u mozgu, 5 minuta nakon primene suspenzije, koncentracija bila statistički značajno veća od dobijenih vrednosti nakon primene supstance u obliku rastvora, odnosno nanoemulzije.



Slika 19. Farmakokinetički profili DK-I-56-1 u tri različite formulacije. Krive zavisnosti koncentracija (ng/mL, odnosno ng/g na levoj osi i nmol/L, odnosno nmol/kg na desnoj osi) od vremena, nakon intraperitonealne primene doze od 10 mg/kg DK-I-56-1 formulisanog u obliku suspenzije (**a**), rastvora (**b**) i nanoemulzije (**c**) (n=3 po vremenskoj tački). C_{max} = maksimalna koncentracija u plazmi ili mozgu; T_{max} = vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi ili mozgu; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-12} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (12 h).

Tabela 8. Koncentracije supstance DK-I-56-1 (nmol/L) u plazmi predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM u različitim vremenskim tačkama (5 min, 20 min, 1 h, 3 h, 12 h) za različite formulacije (suspenzija, rastvor, nanoemulzija). #, između obeleženih vrednosti postoji statistički značajna razlika.

Vremenska tačka	Suspenzija (nmol/L)	Rastvor (nmol/L)	Nanoemulzija (nmol/L)	Statistički značajna razlika
5 min	3007,07 \pm 259,34	2157,97 \pm 823,31	3767,49 \pm 419,84	Ne
20 min	7047,04 \pm 234,71	12096,30 \pm 445,07	7220,38 \pm 2614,26	Ne
1 h	10458,35 \pm 3729,49	16786,28 \pm 4041,74	13037,88 \pm 1728,64	Ne
3 h	8930,02 \pm 3514,06 [#]	22450,31 \pm 845,65 [#]	15330,76 \pm 2385,12	Da
12 h	1778,18 \pm 913,09	7808,41 \pm 1847,56	4533,93 \pm 2504,85	Ne

Tabela 9. Koncentracije supstance DK-I-56-1 (nmol/L) u mozgu predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM u različitim vremenskim tačkama (5 min, 20 min, 1 h, 3 h, 12 h) za različite formulacije (suspenzija, rastvor, nanoemulzija). #, ¥, između obeleženih vrednosti postoji statistički značajna razlika.

Vremenska tačka	Suspenzija (nmol/kg)	Rastvor (nmol/kg)	Nanoemulzija (nmol/kg)	Statistički značajna razlika
5 min	135,03 \pm 40,44 ^{#¥}	14,51 \pm 3,74 [#]	19,34 \pm 2,14 [¥]	Da
20 min	266,52 \pm 31,57	1196,62 \pm 225,60	650,06 \pm 312,80	Ne
1 h	1130,74 \pm 390,68	812,12 \pm 274,24	607,69 \pm 109,10	Ne
3 h	1481,45 \pm 608,10	1904,43 \pm 119,87	1829,84 \pm 218,65	Ne
12 h	119,04 \pm 73,36	588,83 \pm 202,37	283,71 \pm 245,27	Ne

Uparedni pregled farmakokinetičkih parametara za supstancu DK-I-56-1 u plazmi i mozgu dat je u Tabelama 9 i 10. Statistička analiza je pokazala značajnu razliku u parametrima C_{max} i AUC_{0-12} u plazmi [$F(2,6)=8,847$; $p=0,016$ i $F(2,6)=9,267$; $p=0,015$, redom]. C_{max} je bila viša kod životinja koje su supstancu primile u obliku rastvora u poređenju sa ostale dve formulacije. AUC_{0-12} je bila viša nakon primene rastvora u poređenju sa suspenzijom ($p=0,021$), dok u odnosu na nanoemulziju nije bilo statistički značajne razlike. Ni za jedan farmakokinetički parametar u mozgu nije pokazana statistički značajna razlika, ako se posmatra formulacija kao faktor varijacije.

Tabela 10. Izračunati farmakokinetički parametri supstance DK-I-56-1 u plazmi predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM za različite formulacije (suspenzija, rastvor, nanoemulzija). #, između obeleženih vrednosti postoji statistički značajna razlika. C_{max} = maksimalna koncentracija; T_{max} = vreme maksimalne

koncentracije; AUC_{0-12} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (12 h); $AUC_{0-\infty}$ = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do beskonačnosti; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; β = konstanta brzine eliminacije.

Parametar	Suspencija	Rastvor	Nanoemulzija	Statistički značajna razlika
C_{max} (ng/mL)	4425,60 ± 315,81 [#]	7218,76 ± 274,29 [#]	5140,78 ± 757,67 [#]	Da
T_{max} (h)	1,67 ± 0,67	3,00 ± 0,00	2,33 ± 0,67	Ne
AUC_{0-12} (ng*h/mL)	24219,24 ± 6584,37 [#]	60593,43 ± 2014,16 [#]	40676,20 ± 7745,18	Da
$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)	27732,64 ± 8072,47	86905,21 ± 14791,05	55604,16 ± 19105,72	Ne
$t_{1/2}$ (h)	3,54 ± 0,71	6,40 ± 1,74	5,21 ± 1,65	Ne
β (1/h)	0,21 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,16 ± 0,04	Ne

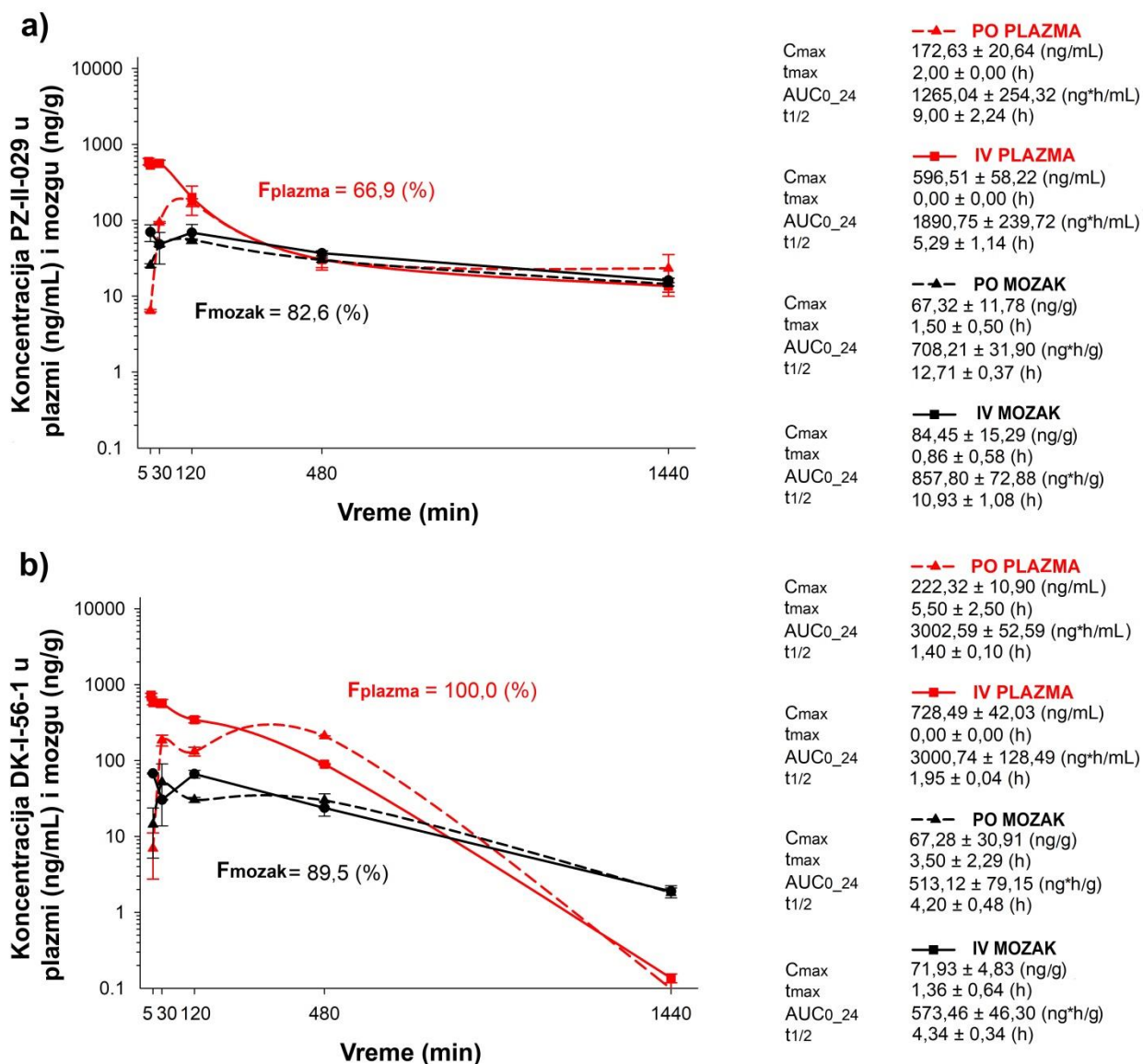
Tabela 11. Izračunati farmakokinetički parametri supstance DK-I-56-1 u mozgu predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška za različite formulacije (suspencija, rastvor, nanoemulzija). C_{max} = maksimalna koncentracija; T_{max} = vreme maksimalne koncentracije; AUC_{0-12} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (12 h); $AUC_{0-\infty}$ = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do beskonačnosti; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; β = konstanta brzine eliminacije.

Parametar	Suspencija	Rastvor	Nanoemulzija	Statistički značajna razlika
C_{max} (ng/g)	586,88 ± 92,71	617,70 ± 38,88	593,51 ± 70,92	Ne
t_{max} (h)	2,33 ± 0,67	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	Ne
AUC_{0-12} (ng*h/mL)	3350,72 ± 1119,29	4786,60 ± 388,18	4021,96 ± 353,91	Ne
$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)	3498,96 ± 1189,40	6751,40 ± 1456,43	5131,55 ± 19105,72	Ne
$t_{1/2}$ (h)	2,28 ± 0,32	5,87 ± 1,83	4,07 ± 2,48	Ne
β (1/h)	0,31 ± 0,04	0,14 ± 0,04	0,32 ± 0,04	Ne

Potencijal ciljane isporuke supstance DK-I-56-1 iz različitih formulacija je, takođe, procenjen izračunavanjem parametara mozak–plazma particioni koeficijent. Kada se jednofaktorskom ANOVA-om uporede izračunate vrednosti particionih koeficijenata za tri formulacije (suspenciju, rastvor i nanoemulziju) DK-I-56-1 ($K_p=0,13 \pm 0,01$; $0,08 \pm 0,01$ i $0,02 \pm 0,01$, redom) statistički značajna razlika se ne dostiže, ali je na nivou trenda [$F(2,6)=4,457$; $p=0,065$]. Ovo znači da rastvor nema prednost nad nanoemulzijom i susupencijom u ciljanoj isporuci aktivne supstance u mozak. Nešto bolju isporuku obezbeđuje suspencija kao formulacija u poređenju sa rastvorom i nanoemulzijom, ali bez statističke značajnosti.

Ukupne masene koncentracije u plazmi i moždanom tkivu u zavisnosti od vremena, kao i farmakokinetički parametri za supstance PZ-II-029 i DK-I-56-1 izračunati nakon p.o. i i.v. primene doze od 2 mg/kg, prikazani su na Slici 20. Vrednosti apsolutne oralne bioraspodivnosti PZ-II-029 i DK-I-56-1 iz nanoemulzionih formulacija, izračunatih na osnovu vrednosti AUC_{0-24} u plazmi

dobijenih nakon dva puta primene, iznosile su 66,9%, odnosno 100,0%. Ovi podaci ukazuju da je uvođenje deuterijuma u osnovnu strukturu PZ-II-029 rezultovalo optimizacijom farmakokinetičkog ponašanja nakon peroralne primene, što je dodatno podržano odgovarajućim vrednostima bioraspoloživosti u mozgu za PZ-II-029 i DK-I-56-1 (82,6% naspram 89,5%).



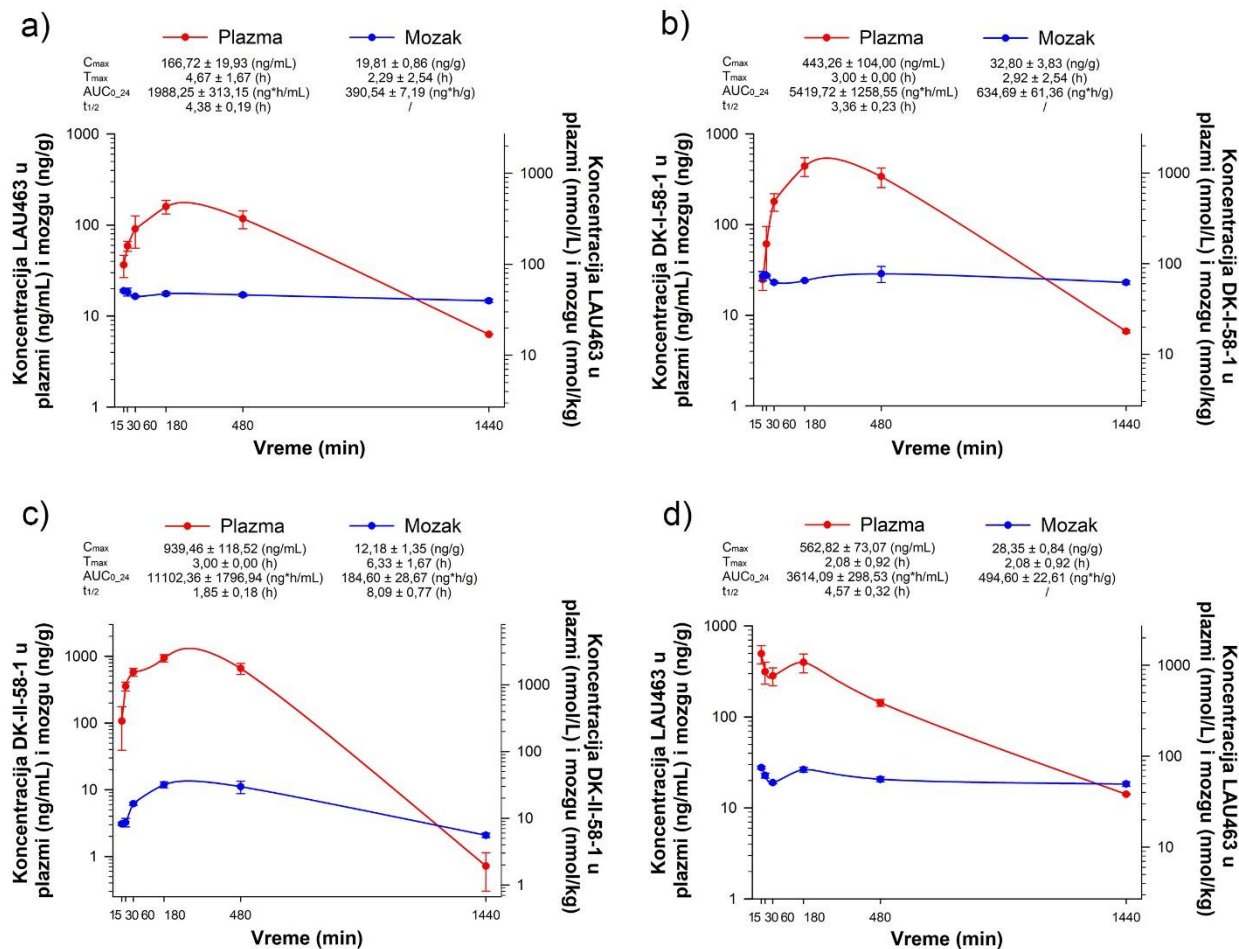
Slika 20. Farmakokinetički profili u plazmi i mozgu nakon oralne gavaže (PO) ili intravenske (IV) primene PZ-II-029 i DK-I-56-1. Profili apsolutne bioraspoloživosti plazme i mozga PZ-II-029 (a) i DK-I-56-1 (b) predstavljeni su na odgovarajućim graficima kao F_{plazma} i F_{mozak} čije su vrednosti izračunate kao odnos odgovarajućih vrednosti AUC_{0-24} dobijenih nakon IV i PO primene doze od 2 mg/kg ($n=3$ po vremenskoj tački). C_{max} = maksimalna koncentracija u mozgu ili plazmi; t_{max} = vreme postizanja maksimalne koncentracije u mozgu ili plazmi; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-24} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (24 h).

Farmakokinetički profili i parametri LAU463 i njegovih analoga, DK-I-58-1, DK-II-58-1 kao i *prodrug* oblika DK-IV-15-1 u krvi i mozgu adultnih pacova određeni su u četvrtom eksperimentu

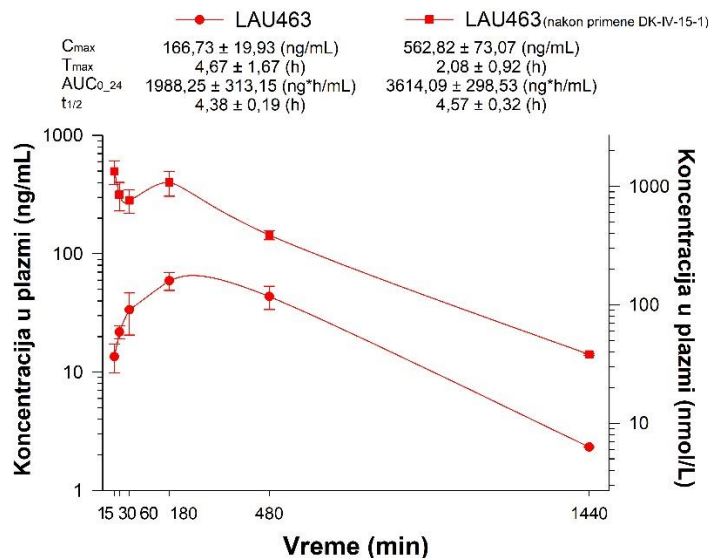
i predstavljeni na Slici 21. Sa panela slike odmah se uočava oblik krivih zavisnosti koncentracija od vremena u mozgu. Dobijene vrednosti koncentracija u mozgu su izuzetno niske, tako da se praktično gubi uobičajeni oblik krive sa koje se može uočiti postepen porast koncentracije, a zatim i pad koji odslikavaju apsorpciju, a zatim distribuciju i eliminaciju leka. Doza od 2 mg/kg u kojoj su primenjeni ligandi p.o. putem očigledno nije bila dovoljna da se dostigne odgovarajuća dispozicija supstanci u mozgu, čak ni u slučaju prodrug oblika leka gde se očekuje da se *in vivo* transformacijom u aktivan oblik obezbede više koncentracije na mestu dejstva. Određene koncentracije u mozgu su istog reda veličine i međusobno veoma slične tako da poluvreme eliminacije nije moglo da se izračuna, osim u slučaju DK-II-58-1 gde se beleži izvestan pad koncentracije nakon dostizanja maksimalne, pa je dati parametar izračunat. Zbog navedenih činjenica, vrednosti koncentracija u mozgu se ne mogu smatrati relevantnim i potrebno je da se esperiment po ovakvom protokolu izvede uz primenu većih doza odabranih PQ liganda.

Sa druge strane, vrednosti koncentracija u plazmi su merljive i veće tako da se može praviti međusobno poređenje. Kao i u ostalim farmakokinetičkim eksperimentima, i ovde je pokazano da deuteracija polaznog jedinjenja značajno doprinosi unapređenom kinetičkom ponašanju dobijenih analoga. Vrednosti nivoa liganada u plazmi tj. AUC_{0-24} veće su za oba analoga kao i za *prodrug* oblik, u odnosu na polazno jedinjenje LAU463 (AUC_{0-24} vrednost za DK-I-58-1 i DK-II-58-1 su približno tri, odnosno pet puta veći u odnosu na vrednost istog parametra polaznog jedinjenja, dok se u slučaju primene DK-IV-15-1 dobija blizu dva puta veća vrednost AUC_{0-24} u poređenju sa vrednošću nakon primene LAU463). C_{max} vrednosti ukazuju na isti trend. Znatno su veće vrednosti ovog parametra za oba analoga (DK-I-58-1 i DK-II-58-1) i prodrug oblik (DK-IV-15-1) u poređenju sa polaznim jedinjenjem (LAU463) ($443,26 \pm 104,00$; $939,46 \pm 118,52$; $562,82 \pm 73,07$ i $166,72 \pm 19,93$, redom). Na osnovu rezultata, može se reći da je dodatnom unapređenju kinetičkog ponašanja, osim deuteracije, doprinelo i nitrogenovanje D prstena, tako da od četiri testirana liganda, DK-II-58-1 ima najbolje farmakokinetičke osobine.

Kao alternativna metoda za povećanje biološke raspoloživosti i rastvorljivosti je sinteza *prodrug* forme leka koji se u organizmu transformiše u aktivan oblik. Na Slici 22 prikazane su krive zavisnosti koncentracija od vremena za LAU463 (u aktivnom obliku) i LAU463 nakon primene *prodrug* forme (DK-IV-15-1) u plazmi. Očigledno je da se više koncentracije dobijaju primenom *prodrug* oblika leka, a u prilog tome govore i vrednosti parametara AUC_{0-24} i C_{max} koje su veće u slučaju primene neaktivnog (*prodrug*) oblika leka. Kao što je prethodno pomenuto, potrebna su dodatna istraživanja sa većim dozama kako bi se potvrdila ili opovrgla prednost primene *prodrug* oblika leka u kontekstu ostvarivanja viših koncentracija u mozgu.



Slika 21. Farmakokinetički profili LAU463 i njegovih analoga određeni kroz eksperiment kasetnog doziranja. Krive zavisnosti koncentracija (ng/mL, odnosno ng/g na levoj osi i nmol/L, odnosno nmol/kg na desnoj osi) od vremena, nakon peroralne primene doze od 2 mg/kg LAU463 (a), DK-I-58-1 (b), DK-II-58-1 (c) i LAU463 nakon primene prodrug forme (DK-IV-15-1) (d) formulisanih u obliku kasetne suspenzije u 0,25% rastvoru metilceluloze (n=3 po vremenskoj tački). C_{max} = maksimalna koncentracija u plazmi ili mozgu; T_{max} = vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi ili mozgu; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-12} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (24 h).



Slika 22. Farmakokinetički profili LAU463 i njegove prodrug forme, DK-IV-15-1 određivanog kao LAU463 u plazmi. Krive zavisnosti koncentracija (ng/mL na levoj osi i nmol/L na desnoj osi) od vremena u plazmi, nakon peroralne primene doze od 2 mg/kg LAU463 (u aktivnom obliku) i LAU463 u neaktivnom, *prodrug* obliku (DK-IV-15-1). Ligandi su bili formulisani i primenjeni u obliku kasetne suspenzije u 0,25% rastvoru metilceluloze (n=3 po vremenskoj tački). C_{max} = maksimalna koncentracija u plazmi ili mozgu; T_{max} = vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi ili mozgu; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-12} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (24 h).

Farmakokinetički profili -OCH₃, -OCD₃, N-hetero i -OCF₃ supstituisanih liganada u plazmi, mozgu, jetri i bubrezima miševa nakon i.p. primene, sa izračunatim farmakokinetičkim parametrima, u eksperimentima kasetnog doziranja, prikazani su na Slikama 25, 26, 27, 28 i 29. Farmakokinetička studija je sprovedena da bi se uporedili *in vivo* procesi kojima podleže 14 pirazolohinolinona sličnih struktura koji su međusobni analozi u kontekstu deuteracije, nitrogenovanja D prstena i fluorovanja, i procenio njihov potencijal da postanu „*lead*” jedinjenja za prekliničke studije.

Sistemska izloženost ispitivanim ligandima, procenjena na osnovu vrednosti AUC_{0-36} i C_{max} u plazmi, bila je generalno visoka. Vrednosti AUC_{0-36} u plazmi bile su u opsegu od 1500 do 3900 ng*h/mL, osim za tri fluorovana derivata (MM-I-10, DK-IV-22-1, DK-IV-19-1) koji su imali izrazito više vrednosti AUC_{0-36} (AUC_{0-36} =19935,27 ± 1847,19; 10816,44 ± 146,06; 6609,31 ± 447,63 ng*h/mL, redom). C_{max} vrednosti u plazmi su uglavnom bile u opsegu od 1000 do 4000 ng/mL, dok je šest liganada imalo vrednosti ispod 1000 ng/mL (LAU463, DK-I-58-1, DK-IV-20-1, DK-I-86-1, DK-IV-22-1 i MM-I-10).

Ono što je od ključne važnosti za ovakvu *in vivo* studiju, svih 14 liganda uspelo je da permeira krvno-moždanu barijeru. Opseg vrednosti AUC_{0-36} u mozgu bio je između 1000 i 3500 ng*h/g, osim za dva fluorovana derivata (DK-IV-22-1 i MM-I-10) sa najvišim vrednostima AUC_{0-36} u mozgu (AUC_{0-36} =8147,74 ± 1044,88, odnosno 6374,56 ± 619,90). Izračunate vrednosti K_p (Tabela 11) bile su najveće za DK-I-56-1, DK-I-58-1, DK-IV-20-1, DK-II-58-1 i DK-I-86-1 (K_p =1,12 ± 0,52; 1,10 ± 0,43; 0,99 ± 0,17; 0,94 ± 0,35 i 0,92 ± 0,37, redom), a najniže za MM-I-10, LAU 463

i DK-IV-19-1 ($K_p=0,34 \pm 0,03$; $0,25 \pm 0,04$; $0,22 \pm 0,04$, redom). Ovo bi značilo da ligandi čije su vrednosti particionog koeficijenta za mozak bliske ili veće od jedinice veoma dobro prolaze krvno-moždanu barijeru i dospevaju u mozak. Udeo od ukupne vrednosti AUC_{0-36} (dobijene sabiranjem vrednosti AUC_{0-36} u svim kompartmanima gde su merene koncentracije) koji je stigao do mozga (α) (Tabela 11) bio je iznad 5% za DK-I-56-1, DK-I-60-3, DK-I-58-1, DK-II-58-1, RV-I-029 i DK-I-59-1 ($\alpha=6,16 \pm 2,15$; $6,13 \pm 2,47$; $6,08 \pm 2,56$; $5,65 \pm 1,89$; $5,05 \pm 2,49$; $5,03 \pm 2,45$, redom), a niži od 2% za DK-I-87-1, MM-I-10, DK-IV-19-1 i LAU 463 ($\alpha=1,79 \pm 0,84$; $1,72 \pm 0,12$; $1,54 \pm 0,17$; $1,39 \pm 0,37$, redom).

Ukupna izloženost organa za izlučivanje (Tabela 11) bila je najmanja za DK-I-60-3, DK-I-59-1, PZ-II-029 i DK-I-56-1 ($25914,07 \pm 7129,91$; $26429,53 \pm 6952,27$; $27756,00 \pm 6743,94$ i $28808,57 \pm 1777,79$ ng*h/mL, redom), dok je najveća za DK-IV-22-1 i MM-I-10 ($281097,78 \pm 6138,40$, odnosno $364350,03 \pm 8110,96$ ng*h/mL).

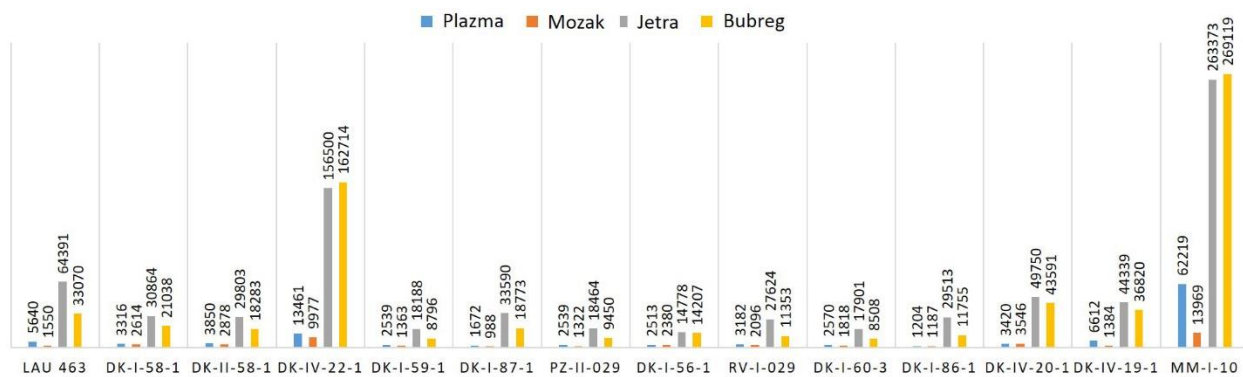
Dok su vrednosti parametra α za DK-I-58-1 i DK-II-58-1 relativno visoke, uvođenje fluora u odgovarajuće molekule imalo je za posledicu petostruko povećanje izloženosti organa za izlučivanje (Slika 23), uz odgovarajuće značajno smanjenje alfa vrednosti za DK-IV-22-1 i MM-I-10. Dodatno, značajno povećanje poluvremena eliminacije u svim kompartmanima (plazma, mozak, jetra, bubreg) vidi se kod liganda koji u strukturi sadrži šest atoma fluora (Slika 24).

Uporednim posmatranjem rezultata za PZ-II-029 i njegove analoge (DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3) s jedne strane, i LAU 463 i njegove analoge (DK-I-58-1 i DK-II-58-1) sa druge strane, može se zaključiti da su uvođenjem deuterijuma u *parent* ligand značajno povećane vrednosti parametara K_p , α i C_{max} u svim slučajevima, dok je ekspozicija organa za izlučivanje ostala približno isti u poređenju sa osnovnim strukturama (PZ-II-029 i LAU 463).

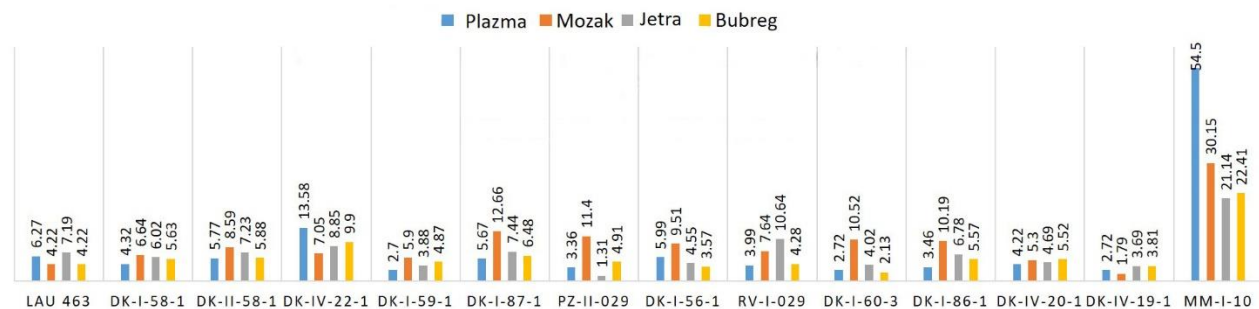
Tabela 12. Vrednosti za tri parametra koji nisu predstavljeni u okviru grafičkih prikaza farmakokinetičkih profila, za 14 PQ liganda testiranih kroz eksperimente kasetnog doziranja. K_p = particioni koeficijent za mozak ($K_p = AUC_{0-t,mozak}/AUC_{0-t,plazma}$); α = udeo supstance kojoj je izloženo moždano tkivo u odnosu na ukupnu izloženost u sva četiri kompartmana gde su koncentracije merene ($\alpha = AUC_{0-t, mozak}/(AUC_{0-t, plazma} + AUC_{0-t, mozak} + AUC_{0-t, jetra} + AUC_{0-t, bubreg})$); ukupna izloženost ekskretornih organa ($AUC_{0-t, jetra} + AUC_{0-t, bubreg}$). U navedenim formulama t predstavlja poslednju vremensku tačku u kojoj su određene koncentracije (36 h).

Ligand	K_p	α (%)	Ukupna izloženost ekskretornih organa (ng*h/mL)
PZ-II-029	$0,52 \pm 0,27$	$4,32 \pm 2,01$	$27756,00 \pm 6743,94$
DK-I-56-1	$1,12 \pm 0,52$	$6,16 \pm 2,15$	$28808,57 \pm 1777,79$
RV-I-029	$0,68 \pm 0,37$	$5,05 \pm 2,49$	$35513,95 \pm 5375,48$
DK-I-60-3	$0,63 \pm 0,18$	$6,13 \pm 2,47$	$25914,07 \pm 7129,91$
DK-I-86-1	$0,92 \pm 0,37$	$4,76 \pm 2,37$	$39749,85 \pm 20953,86$
LAU463	$0,25 \pm 0,04$	$1,39 \pm 0,37$	$95389,81 \pm 9549,83$
DK-I-58-1	$1,10 \pm 0,43$	$6,08 \pm 2,56$	$50641,73 \pm 18619,17$
DK-II-58-1	$0,94 \pm 0,35$	$5,65 \pm 1,89$	$46950,00 \pm 15433,55$

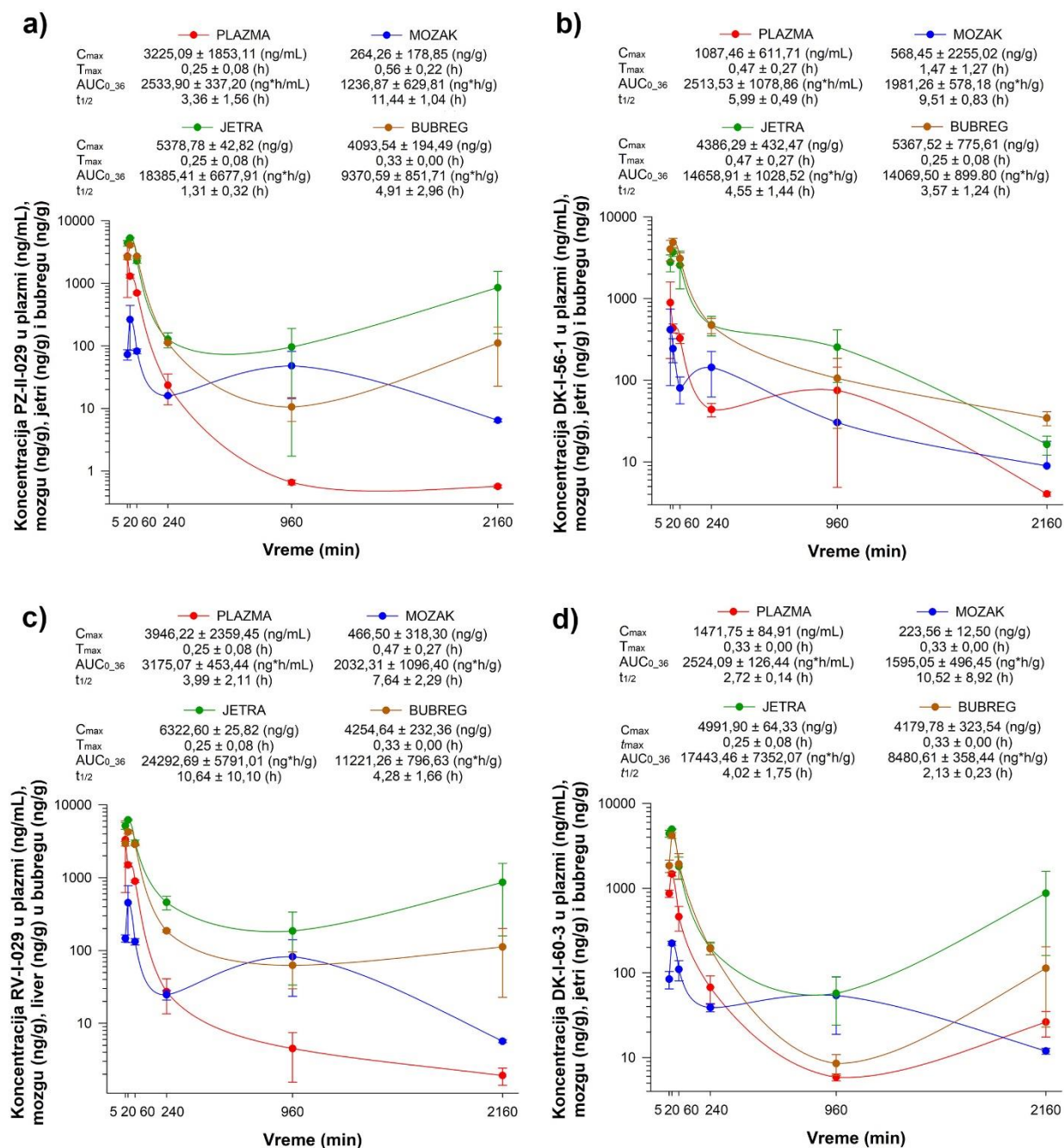
DK-I-87-1	0,51 ± 0,12	1,79 ± 0,84	48794,18 ± 4412,70
DK-I-59-1	0,52 ± 0,20	5,03 ± 2,45	26429,53 ± 6952,27
DK-IV-20-1	0,99 ± 0,17	3,34 ± 0,39	92461,79 ± 2792,15
DK-IV-19-1	0,22 ± 0,04	1,54 ± 0,17	81020,74 ± 3699,76
DK-IV-22-1	0,75 ± 0,09	2,72 ± 0,36	281097,75 ± 6138,40
MM-I-10	0,34 ± 0,03	1,72 ± 0,12	364350,03 ± 8110,96



Slika 23. Vrednosti parametra površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do beskonačnosti ($AUC_{0-\infty}$) koji odlikava nivoe liganada u kompartmanima (plazma, mozak, jetra i bubreg) u kojima su određivane koncentracije. Fluorirani analozi (MM-I-10, DK-IV-22-1, DK-IV-20-1 i DK-IV-19-1) pokazuju znatno povećanje nivoa u jetri i bubrezima.

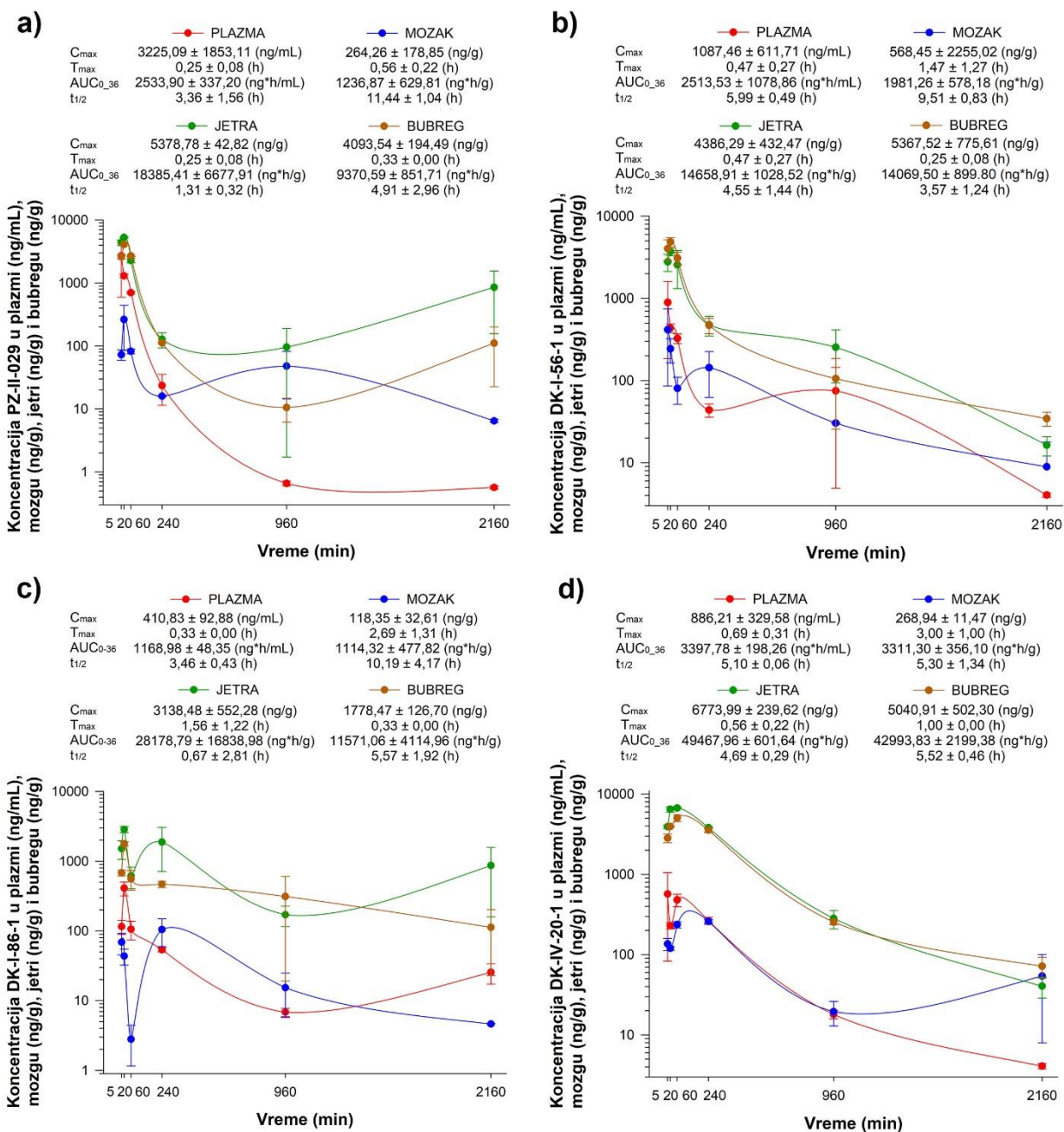


Slika 24. Vrednosti parametra poluvreme eliminacije 14 PQ liganada. Fluorirani analog (MM-I-10) pokazuje izraženo povećanje vrednosti analiziranog parametra u svim kompartmanima (plazma, mozak, jetra i bubreg) u kojima su određivane koncentracije.



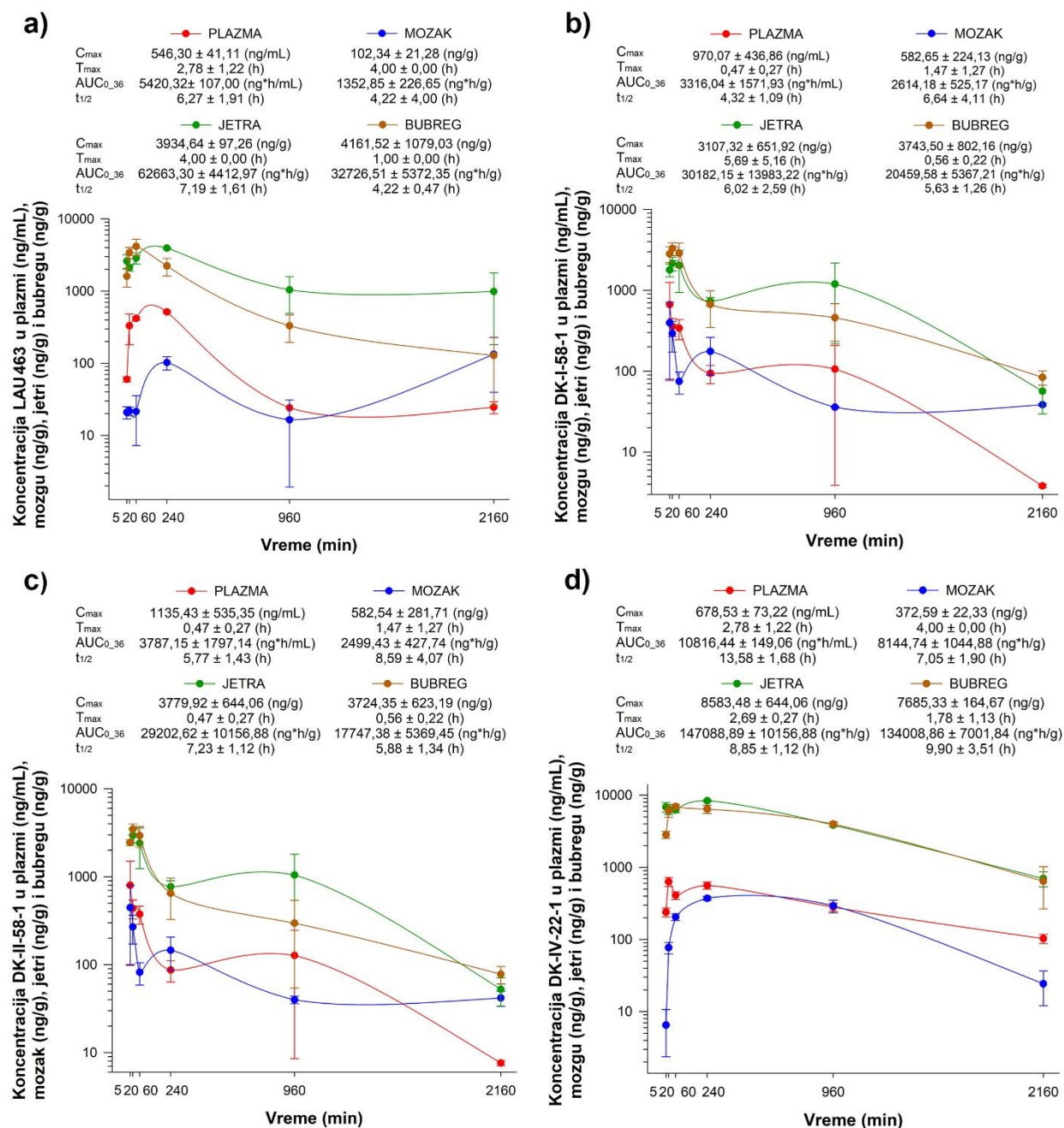
Slika 25. Farmakokinetički profili (plazma, mozak, jetra i bubrezi) PZ-II-029 i njegovih deuterisanih analoga DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3.

Krive zavisnosti koncentracija (ng/mL, odnosno ng/g) u plazmi (crvena), mozgu (plava), jetri (zelena) i bubregu (braon) od vremena nakon intraperitonealne primene doze od 3 mg/kg PZ-II-029 (a), DK-I-56-1 (b), RV-I-029 (c) i DK-I-60-3 (d) (n=3 po vremenskoj tački). C_{max} = maksimalna koncentracija u plazmi ili mozgu; T_{max} = vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi ili mozgu; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-36} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (36 h).



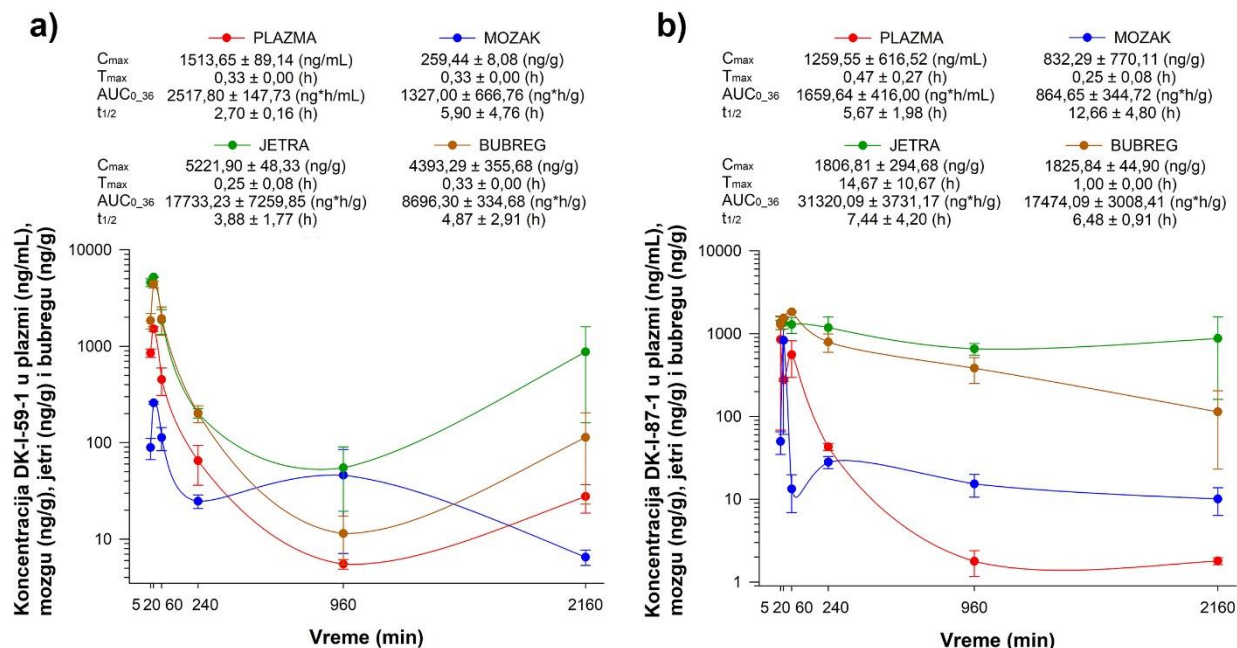
Slika 26. Farmakokinetički profili (plazma, mozak, jetra i bubrezi) PZ-II-029, njegovih analoga: deuterisani (DK-I-56-1), deuterisani i nitrogenovani (DK-I-86-1), deuterisani i fluorovani (DK-IV-20-1).

Krive zavisnosti koncentracija (ng/mL, odnosno ng/g) u plazmi (crvena), mozgu (plava), jetri (zelena) i bubregu (braon) od vremena nakon intraperitonealne primene doze od 3 mg/kg PZ-II-029 (a), DK-I-56-1 (b), DK-I-86-1 (c) i DK-IV-20-1 (d) (n=3 po vremenskoj tački). C_{max} = maksimalna koncentracija u plazmi ili mozgu; T_{max} = vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi ili mozgu; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-36} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (36 h).



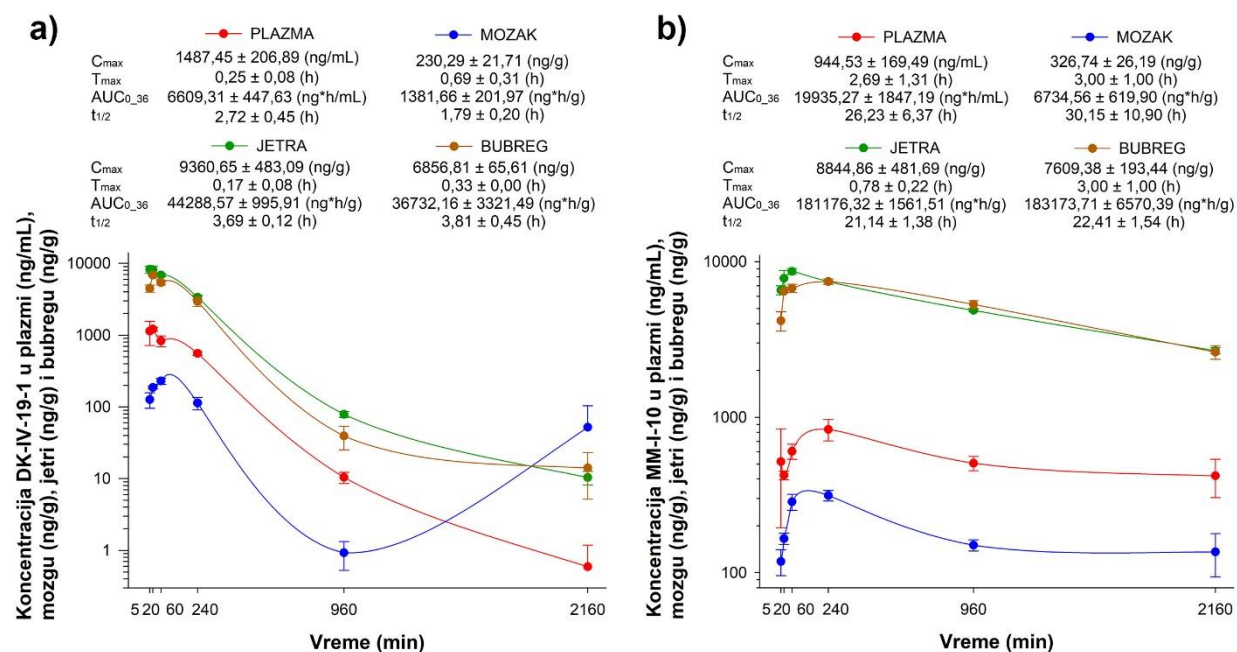
Slika 27. Farmakokinetički profili (plazma, mozak, jetra i bubrezi) LAU463 i njegovih analoga: deuterisani (DK-I-58-1), deuterisani i nitrogenovani (DK-II-58-1), i fluorovani (DK-IV-22-1).

Krive zavisnosti koncentracija (ng/mL, odnosno ng/g) u plazmi (crvena), mozgu (plava), jetri (zelena) i bubregu (braon) od vremena nakon intraperitonealne primene doze od 3 mg/kg LAU463 (a), DK-I-58-1 (b), DK-II-58-1 (c) i DK-IV-22-1 (d) (n=3 po vremenskoj tački). C_{max} = maksimalna koncentracija u plazmi ili mozgu; T_{max} = vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi ili mozgu; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-36} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (36 h).



Slika 29. Farmakokinetički profili (plazma, mozak, jetra i bubrezi) dva deuterisana liganda, koji su međusobni izomeri u pogledu položaja $-OCD_3$ grupe na D prstenu pirazolohinolinonske strukture: DK-I-59-1 (meta izomer) i DK-I-87-1 (orto izomer).

Krive zavisnosti koncentracija (ng/mL, odnosno ng/g) u plazmi (crvena), mozgu (plava), jetri (zelena) i bubregu (braon) od vremena nakon intraperitonealne primene doze od 3 mg/kg DK-I-59-1 (a) i DK-I-87-1 (b) ($n=3$ po vremenskoj tački). C_{max} = maksimalna koncentracija u plazmi ili mozgu; T_{max} = vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi ili mozgu; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-36} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (36 h).



Slika 29. Farmakokinetički profili (plazma, mozak, jetra i bubrezi) dva fluorovana analoga, od kojih je DK-IV-19-1 dodatno i deuterisan, a MM-I-10 u strukturi poseduje šest atoma fluora.

Krive zavisnosti koncentracija (ng/mL, odnosno ng/g) u plazmi (crvena), mozgu (plava), jetri (zelena) i bubregu (braon) od vremena nakon intraperitonealne primene doze od 3 mg/kg DK-IV-19-1 (a) i MM-I-10 (b) ($n=3$ po vremenskoj tački). C_{\max} = maksimalna koncentracija u plazmi ili mozgu; T_{\max} = vreme postizanja maksimalne koncentracije u plazmi ili mozgu; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-36} = površina ispod krive koncentracija–vreme od nultog vremena do poslednje vremenske tačke (36 h).

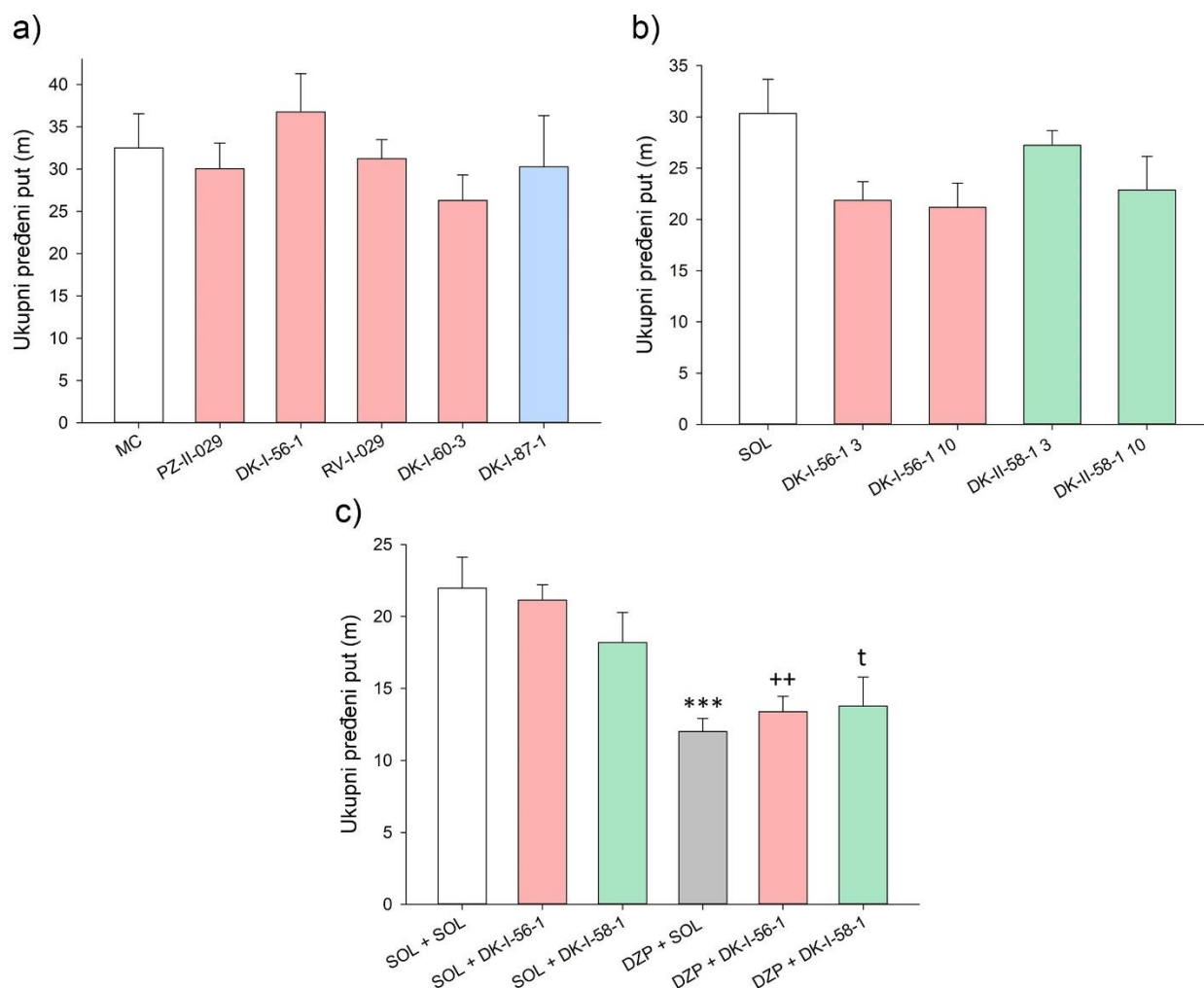
4.2. Rezultati bihevioralnih eksperimenata

4.2.1. Test spontane lokomotorne aktivnosti

U prvom eksperimentu ispitan je uticaj pet PQ liganda (PZ-II-029, DK-I-56-1, RV-I-29, DK-I-60-3 i DK-I-87-1) nakon peroralne primene u dozi od 15 mg/kg na spontanu lokomotornu aktivnost Sprague Dawley pacova koristeći parametar ukupni pređeni put (Slika 30a). Jednofaktorska ANOVA je pokazala da nijedan od PQ liganada nije imao značajan uticaj na lokomotornu aktivnost u poređenju sa kontrolnom grupom koja je tretirana sa 0,25% rastvorom metil celuloze [$F(5,31)=0,711$; $p=0,619$].

U drugom eksperimentu (Slika 30b), jednofaktorska ANOVA je pokazala da parametar ukupni pređeni put nakon i.p. primene dva odabrana PQ liganda (DK-I-56-1 i DK-II-58-1) u dve različite doze (3 mg/kg i 10 mg/kg), nije bio statistički značajan ni za jednu eksperimentalnu grupu u poređenju sa kontrolnim životinjama koje su primale SOL [F(2,22)=2,235; $p=0,084$].

U trećem eksperimentu je ispitivan uticaj PQ liganada (DK-I-56-1 i DK-I-58-1, oba u dozi od 10 mg/kg) na efekat diazepama (u dozi od 3 mg/kg) u SLA testu, uz kontrolnu grupu u kojoj su životinje primale SOL + SOL. Dvofaktorska ANOVA je pokazala da interakcija između dva tretmana kao faktora varijacije nije dostigla značajnost [$F(2,42)=1,451$; $p=0,246$]. Međutim, efekat prvog tretmana (rastvarača ili diazepama) na ukupni pređeni put je bio značajan [$F(1,42)=30,317$; $p<0,001$]. *Post-hoc* SNK metoda je otkrila da primena diazepama umesto SOL smanjuje ukupni pređeni put životinja tretiranih SOL ili DK-I-56-1 ($p<0,001$, odnosno $p=0,002$), dok je razlika DZP + DK-I-58-1 u odnosu na SOL + DK-I-58-1 bila na granici značajnosti ($p = 0,064$; Slika 30c). Dakle, DK-I-56-1 i DK-I-58-1, sami po sebi, nisu uticali na lokomotornu aktivnost, a takođe nisu uticali (DK-I-56-1) ili su ostvarili zanemarljiv uticaj (DK-I-58-1) na hipolokomotorni efekat diazepama.



Slika 30. Merenje uticaja na lokomotornu aktivnost mužjaka pacova Sprague-Dawley soja kroz tri različita eksperimenta. **a)** Uticaj PZ-II-029, DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3 i DK-I-87-1 primenjenih peroralno u dozi od 15 mg/kg, na ukupni pređeni put u poređenju sa kontrolnom grupom (MC) u kojoj su životinje tretirane 0,25% rastvorom metilceluloze. Broj životinja u svakoj grupi bio je 6, osim kontrolne grupe koja je uključivala 7 životinja; **b)** uticaj DK-I-56-1 (3 i 10 mg/kg) i DK-II-58-1 (3 i 10 mg/kg) primenjenih intraperitonealno na ukupni pređeni put u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL). Broj životinja po grupi bio je 8-9; **c)** uticaj kombinacije diazepama (3 mg/kg) i nebenzodiazepinskih modulatora DK-I-56-1 i DK-I-58-1 (oba u dozi od 10 mg/kg), primenjenih intraperitonealno, na ukupni pređeni put. Životinje kontrolne grupe tretirane su SOL+SOL. Broj životinja po grupi bio je 8-9.

Stubići dijagrama predstavljaju srednju vrednost date grupe \pm SEM. *Post hoc* značajne razlike su sledeće: *** $p < 0,001$, u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL + SOL); ++ $p < 0,01$, u poređenju sa grupom SOL + DK-I-56-1; t – trend, $0,05 < p < 0,1$, u poređenju sa SOL + DK-I-58-1.

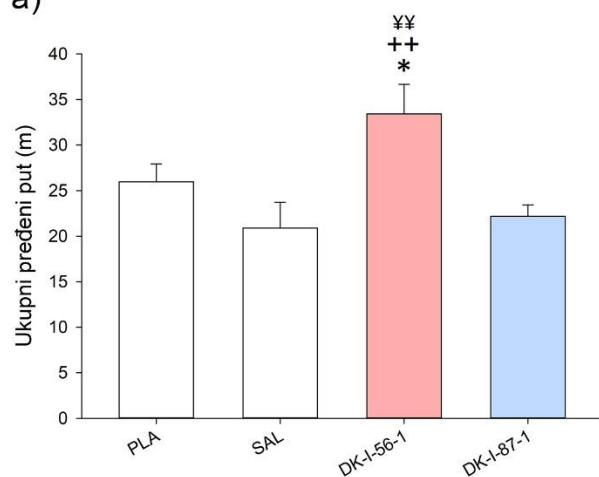
Uticaj na parametar ukupni pređeni put nakon i.p. primene nanoemulzije PQ liganda DK-I-56-1 i DK-I-87-1 u dozi od 10 mg/kg ispitan je na Wistar pacovima u četvrtom eksperimentu (Slika 31a). Jednofaktorska analiza varijanse je pokazala značajnost tretmana kao faktora varijacije [$F(3,28) = 5,335$; $p = 0,005$]. *Post hoc* analizom utvrđeno je da životinje koje su tretirane supstancom DK-I-56-1 prelaze statistički značajno duži put u poređenju sa obe kontrolne grupe, placebo

nanoemulzija i SAL, kao i sa supstancom DK-I-87-1 ($p=0,039$, $p=0,006$ i $p=0,008$, redom). Razlike između dve kontrolne grupe nije bilo ($p=0,322$), čime se isključuje doprinos same formulacije nanoemulzije u postizanju uočenog bihevioralnog efekta.

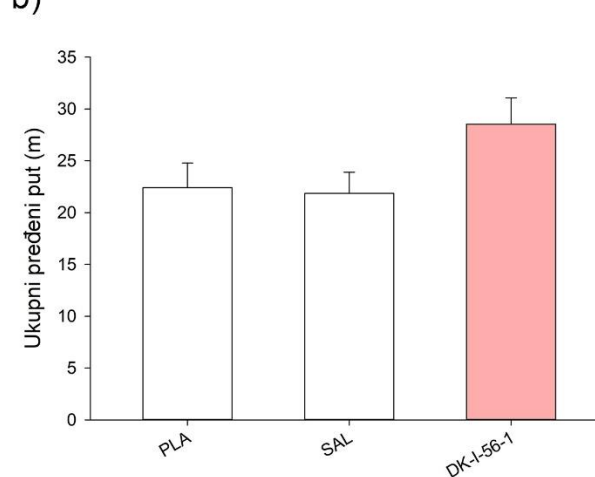
Peti eksperiment je sproveden s ciljem potvrđivanja hiperlokomotornog efekta DK-I-56-1 koji je pokazan u četvrtom eksperimentu. Međutim, primenom jednofaktorske ANOVA-e na vrednosti ukupnog pređenog puta dobijene u eskperimentu ne dostiže se statistički značajna razlika između grupa [$F(2,21)=2,542$; $p=0,103$] (Slika 31b).

Šesti eksperiment (Slika 31c) je sproveden kako bi se ispitala dozna zavisnost u postizanju hiperlokomotornog efekta supstance DK-I-56-1 na Wistar pacovima. S tim u vezi, nakon statističke analize dobijenih podataka, otkrivena je značajnost tretmana kao faktora [$F(4,23)=3,685$; $p=0,018$]. SNK metodom je utvrđeno da su životinje koje su tretirane DK-I-56-1 u dozi od 3 mg/kg i 10 mg/kg prelazile statistički značajno duži put u poređenju sa kontrolnom grupom gde su životinje tretirane placebo nanoemulzijom ($p=0,023$ i $p=0,029$, redom). Životinje koje su tretirane DK-I-56-1 u dozi od 1 mg/kg ili 30 mg/kg nisu se značajno razlikovale od kontrolne grupe u vrednostima ukupnog pređenog puta za definisani period praćenja ($p=0,264$ i $p=0,459$, redom). Navedeni statistički nalaz ukazuje da u ispitivanom doznom opsegu DK-I-56-1 pokazuje aktivnost oblika obrnutog slova „U”.

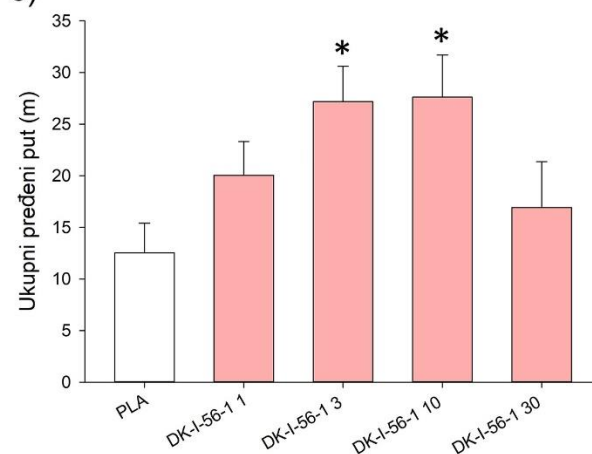
a)



b)



c)

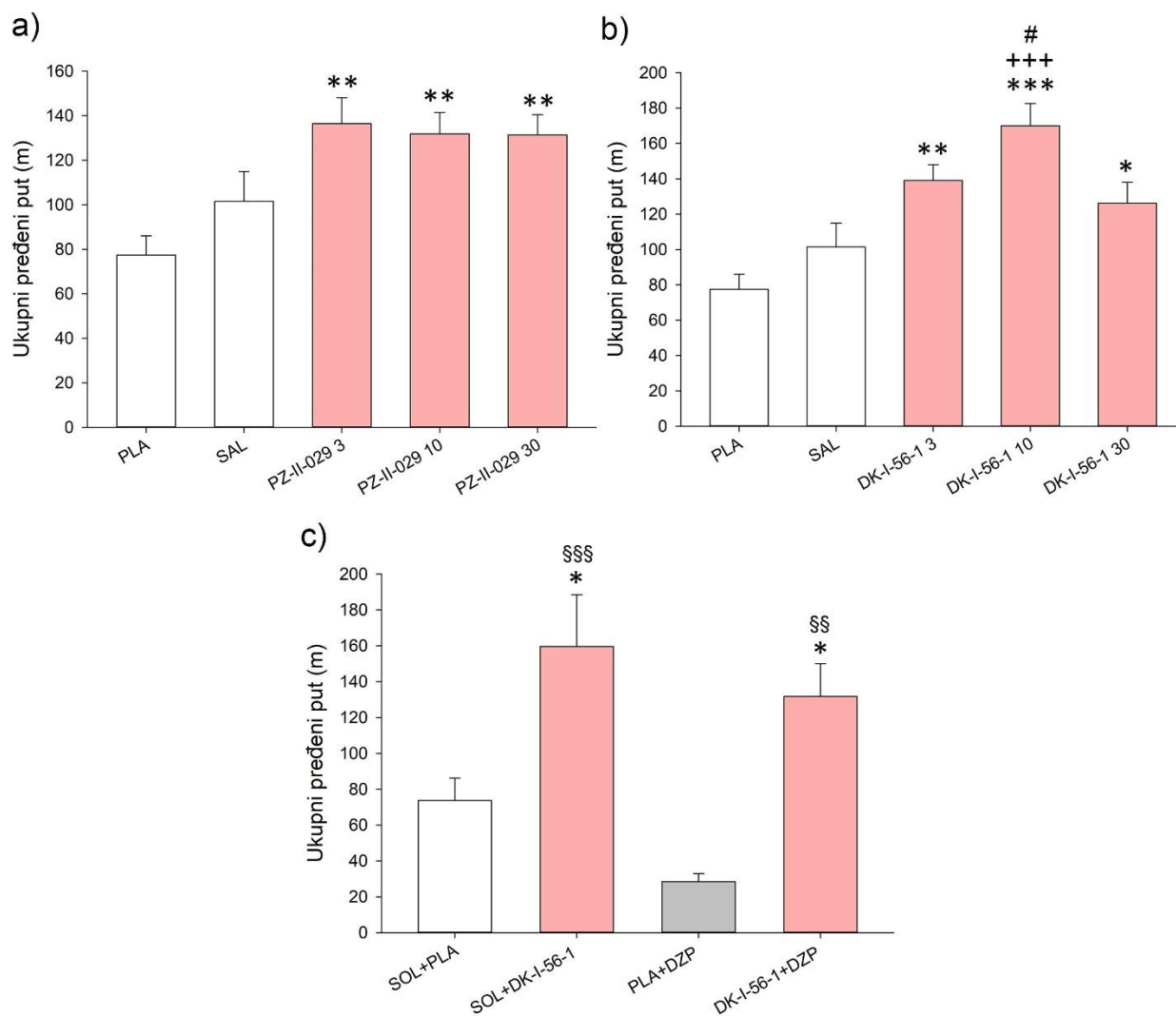


Slika 31. Merenje uticaja na lokomotornu aktivnost mužjaka pacova Wistar soja kroz tri različita eksperimenta. **a)** Uticaj DK-I-56-1 i DK-I-87 primenjenih intraperitonealno u dozi od 10 mg/kg na ukupni pređeni put u odnosu na kontrolne grupe u kojima su životinje tretirane placebo nanoemulzijom (PLA), odnosno fiziološkim rastvorom (SAL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 8; **b)** uticaj DK-I-56-1 primenjenog intraperitonealno u dozi od 10 mg/kg na ukupni pređeni put u odnosu na kontrolne grupe PLA, odnosno SAL. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8; **c)** uticaj doznog raspona DK-I-56-1 (1, 3, 10 i 30 mg/kg) primenjenog intraperitonealno na ukupni pređeni put u odnosu na kontrolnu grupu PLA. Broj životinja po grupama je bio 6, osim kontrolne grupe koja je obuhvatala 7 životinja, i grupe DK-I-56-1 30 mg/kg gde su (preliminarno) testirane 3 životinje. Stubići dijagrama predstavljaju srednju vrednost date grupe \pm SEM. *Post hoc* značajne razlike su sledeće: * $p < 0,05$ u poređenju sa PLA grupom; ++ $p < 0,01$ u poređenju sa SAL grupom; ¥¥ $p < 0,01$ u poređenju sa DK-I-87-1 grupom.

Primenom jednofaktorske analize varijanse na podatke iz sedmog eksperimenta koji je sproveden na C57BL miševima (Slika 32a), utvrđena je statistička značajnost tretmana [$F(4,35)=5,745$; $p=0,001$]. Naime, životinje koje su tretirane PZ-II-029 u sve tri doze (3 mg/kg, 10 mg/kg i 30 mg/kg) prelazile su statistički značajno duži put u poređenju sa kontrolnom grupom gde su životinje tretirane placebo nanoemulzijom ($p=0,003$, $p=0,005$ i $p=0,003$, redom). Poređenjem kontrolnih grupa (placebo nanoemulzija i SAL) razlika nije utvrđena ($p=0,118$).

Na isti način kao u sedmom eksperimentu, obrađeni su podaci iz osmog eksperimenta (Slika 32b). Jednofaktorska ANOVA je pokazala značajnost tretmana kao faktora varijacije [$F(4,35)=9,932$; $p < 0,001$]. *Post hoc* analizom je pokazano da životinje koje su primile DK-I-56-1 u dozi od 10 mg/kg prelaze statistički značajno duži put u poređenju sa obe kontrolne grupe (placebo nanoemulzija i SAL), kao i sa grupom koja je primila supstancu u dozi od 30 mg/kg ($p < 0,001$, $p < 0,001$ i $p=0,025$, redom). I u dozama od 3 mg/kg, odnosno 30 mg/kg supstanca DK-I-56-1 je ostvarila značajan uticaj na posmatrani parametar, tako da su životinje iz ovih eksperimentalnih grupa prelazile duži put u poređenju sa placebo nanoemulzijom kao kontrolnom grupom ($p=0,003$, odnosno $p=0,011$). Između placebo nanoemulzije i SAL kao kontrolnih grupa nije utvrđena značajna razlika ($p=0,138$) čime se potvrđuje da formulacija, sama po sebi, ne utiče na ponašanje ogleđnih životinja.

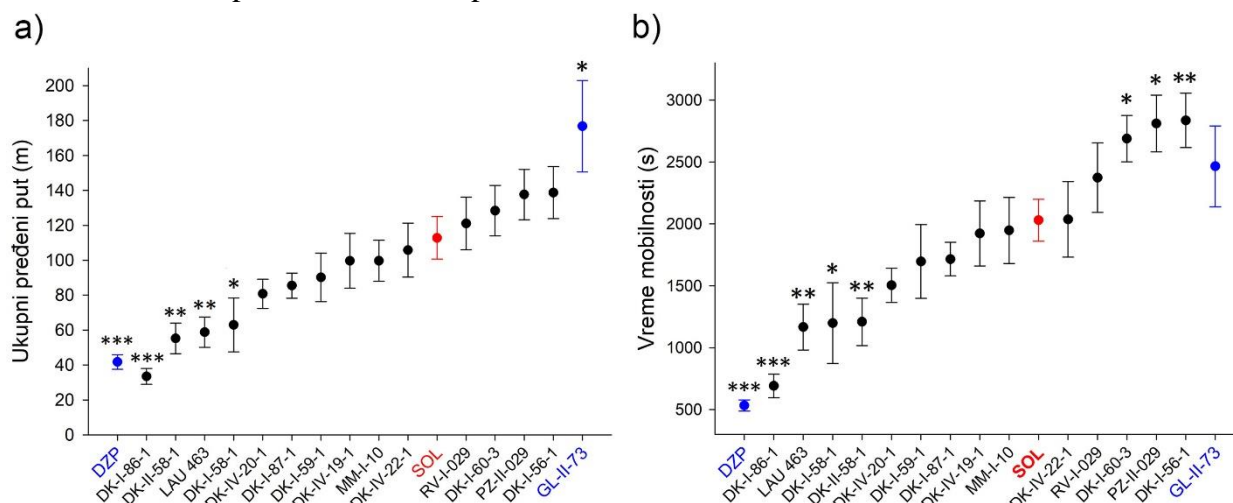
U devetom eksperimentu (Slika 32c), slično kao u trećem, ispitivana je interakcija PQ liganda, DK-I-56-1 u formi nanoemulzije u dozi od 10 mg/kg i diazepama u formi suspenzije u dozi od 3 mg/kg na C57BL miševima. Jednofaktorskom ANOVA-om utvrđena je značajnost tretmana [$F(4,35) = 9,932$; $p < 0,001$], a *post hoc* analiza je dalje utvrdila da je grupa tretirana sa DK-I-56-1 + SOL prelazila značajno duži put u poređenju sa kontrolnom (SOL + PLA) i grupom koja je primila diazepam (PLA + DZP) ($p=0,011$ i $p < 0,001$, redom). Dodatno, grupa koja je primila oba aktivna tretmana, DK-I-56-1 + diazepam, prelazila je statistički značajno duži put u poređenju sa kontrolnom grupom, kao i grupom koja je primila PLA + DZP ($p=0,039$ i $p=0,003$, redom). To znači da je hiperlokomotorni efekat DK-I-56-1 primenjenog u dozi od 10 mg/kg prisutan i u grupi miševa koji su dodatno primili sedativnu dozu diazepama, ukazujući da je supstanca DK-I-56-1 uspeła da antagonizuje efekat diazepama na nivou benzodiazepinskog mesta, kao i da izazove lokomotornu stimulaciju, potencijalno posredstvom GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu.



Slika 32. Merenje uticaja na lokomotornu aktivnost mužjaka C57BL miševa kroz tri različita eksperimenta. **a)** Uticaj doznog raspona PZ-II-029 (3, 10 i 30 mg/kg) primenjenog intraperitonealno na ukupni pređeni put u odnosu na kontrolne grupe u kojima su životinje tretirane placebo nanoemulzijom (PLA), odnosno fiziološkim rastvorom (SAL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 8; **b)** uticaj doznog raspona DK-I-56-1 (3, 10 i 30 mg/kg) primenjenog intraperitonealno na ukupni pređeni put uz kontrolne grupe PLA, odnosno SAL. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8; **c)** uticaj kombinacije diazepama (3 mg/kg) i nebenzodiazepinskog modulatora DK-I-56-1 (10 mg/kg), primenjenih intraperitonealno na ukupni pređeni put uz kontrolnu grupu (SOL + PLA). Broj životinja u svakoj grupi bio je 5. Stubići dijagrama predstavljaju srednju vrednost date grupe \pm SEM. Post hoc značajne razlike su sledeće: *, ** i ***, $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa PLA grupom; +++ $p < 0,001$ u poređenju sa SAL grupom; # $p < 0,05$ u poređenju sa grupom DK-I-56-1 30 mg/kg; §§ i §§§ $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa grupom PLA + DZP.

Uticaj 14 PQ liganada (PZ-II-029 i analoga: DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3 i DK-I-86-1; LAU463 i analoga: DK-I-58-1 i DK-II-58-1; dva strukturna izomera DK-I-87-1 i DK-I-59-1 i četiri fluorovana analoga: DK-IV-19-1, DK-IV-20-1, DK-IV22-1 i MM-I-10) u dozi od 3 mg/kg, diazepama (DZP) u dozi od 1,5 mg/kg, GL-II-73 u dozi od 10 mg/kg i rastvarača na ukupni pređeni put i vreme mobilnosti predstavljen je na Slici 33a, odnosno 33b. Dvostrani t-testovi (eng. *two-*

tailed t-tests) su pokazali značajno smanjenje, ili barem trend, ukupnog pređenog puta u grupama tretiranim sa DZP, DK-I-86-1, DK-II-58-1, LAU 463, DK-I-58-1 i DK-IV-20-1 u poređenju sa neutralnom kontrolnom grupom (SOL) [$p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,005$, $p = 0,008$, $p = 0,023$, $p = 0,094$, redom], ali i značajno povećanje u grupi tretiranoj sa GL-II-73 ($p < 0,018$). Parametar ukupno vreme mobilnosti pokazao se kao izuzetno robustan parametar bihevioralne hipoaktivnosti u grupama tretiranim sa DZP, DK-I-86-1, LAU 463, DK-II-58-1, DK-I-58-1 i DK-IV-20-1 u poređenju sa neutralnom kontrolom (SOL) [$p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,005$, $p = 0,007$, $p = 0,020$, $p = 0,056$, redom], kao i bihevioralne hiperaktivnosti ponašanja kod životinja tretiranih sa DK-I-56-1 i RV-I-029 [$p = 0,010$, odnosno $p = 0,013$].



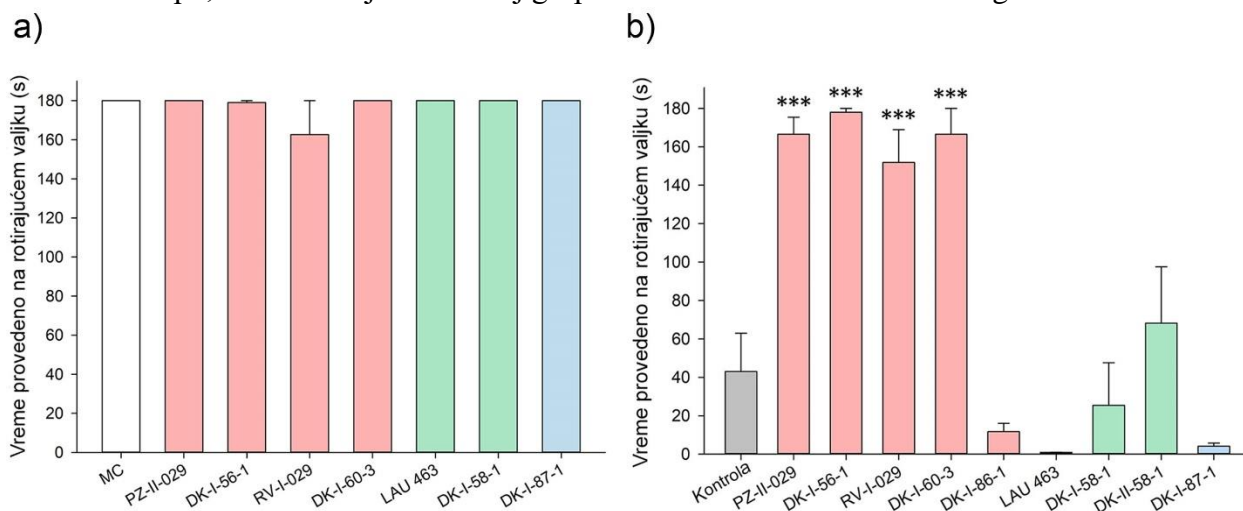
Slika 33. Uticaj 14 PQ liganda (3 mg/kg), diazepama (1,5 mg/kg) kao negativne kontrole, GL-II-73 (10 mg/kg) kao pozitivne kontrole i SOL-a kao neutralne kontrole, primenjenih intraperitonealno, na ukupni pređeni put (a) i vreme mobilnosti (b) mužjaka miševa C57BL soja u testu spontane lokomotorne aktivnosti. Tačke predstavljaju srednju vrednost ± SEM. *, ** i *** $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u poređenju sa neutralnom kontrolom (SOL).

4.2.2. Rotarod test

PQ ligandi PZ-II-029, DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3, LAU 463, DK-I-58-1 i DK-I-87-1 primenjeni peroralno u dozi od 10 mg/kg, 45 minuta pre testa, bili su kompletno lišeni ataksičnog uticaja na motorne performanse pacova u prvom eksperimentu (Slika 34a). Naime, jednofaktorska ANOVA je pokazala da nijedan od liganda nije uticao na vreme održavanja pacova na rotirajućem vretenu u poređenju sa kontrolnom grupom životinja koje su primile rastvor metilceluloze [$F(7,42) = 1,032$; $p = 0,419$].

U drugom eksperimentu ispitivana je interakcija PQ liganada iz prvog eksperimenta uz dodatak DK-II-58-1 i DK-I-86-1 koji su aplikovani p.o. u dozi od 30 mg/kg sa diazepamom koji je aplikovan i.p. u dozi od 5 mg/kg. Jednofaktorska ANOVA primenjena na dobijene podatke pokazala je statistički značaj uticaj tretmana na vrednosti parametra vreme održavanja na rotirajućem vretenu [$F(9,83) = 21,646$; $p < 0,001$, Slika 34b]. Diazepam u dozi od 5 mg/kg značajno otežava izvođenje rotarod testa i grupa pacova tretiranih diazepamom i rastvorom metilceluloze (kao vehikulum za PQ ligande) predstavljala je kontrolnu grupu. SNK *post hoc* analiza je otkrila statistički značajne razlike između pacova tretiranih diazepamom u kombinaciji sa PZ-II-029, DK-

I-56-1, RV-I-029 ili DK-I-60-3 u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$ za sve četiri grupe). To znači da su PZ-II-029 i njegovi deuterisani analozi uspeli da preveniraju motornu inkoordinaciju izazvanu diazepamom. S druge strane, statistički značajne razlike nije bilo poređenjem grupa koje su primile diazepam u kombinaciji sa LAU463, DK-I-58-1, DK-II-58-1, DK-I-87-1 i DK-I-86-1 i kontrolne grupe ($p = 0,301$, $p = 0,418$, $p = 0,248$, $p = 0,225$ i $p = 0,352$, redom). Efekat diazepama bio je primetan bez obzira na prisustvo LAU463 i njegova dva deuterisana analoga (DK-I-58-1 i DK-II-58-1), DK-I-87-1 i DK-I-86-1, pokazujući na taj način da inkapacitirajući efekat diazepama nije bilo moguće umanjiti dodatkom liganada koji pripadaju istom hemotipu, ali različitoj strukturalnoj grupi u odnosu na PZ-II-029 i analoge.



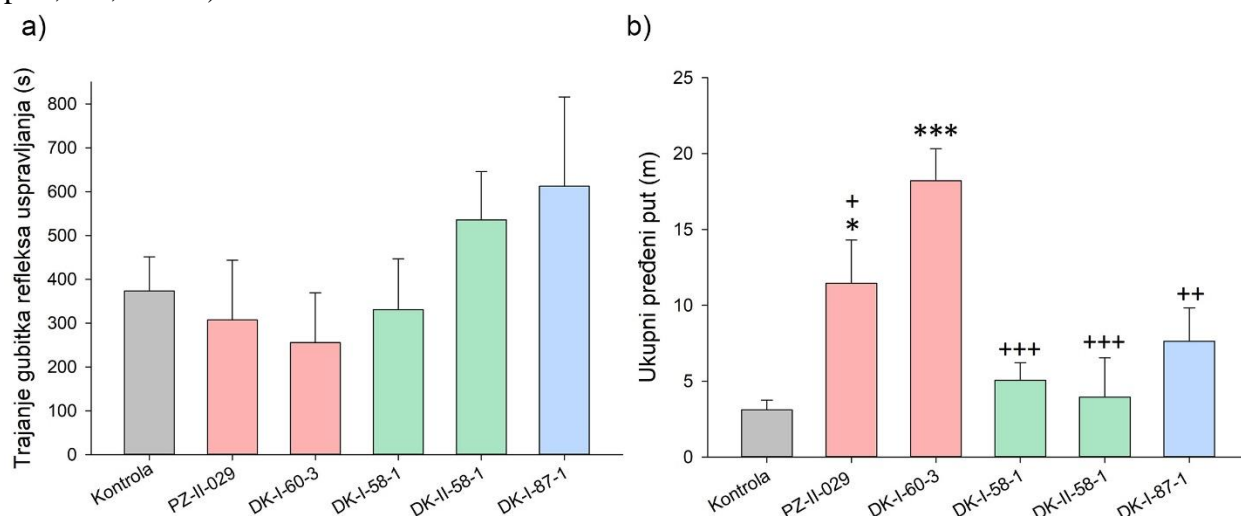
Slika 34. a) Uticaj odabranih PQ liganada primenjenih peroralno u dozi od 10 mg/kg na vreme održavanja na rotirajućem valjku rotarod aparata uz kontrolnu grupu u kojoj su životinje tretirane 0,25% rastvorom metilceluloze (MC). Broj životinja po grupi bio je 6-7; **b)** uticaj odabranih PQ liganda primenjenih peroralno u dozi od 30 mg/kg na ataksiju izazvanu diazepamom (5 mg/kg) u rotarod testu. Broj životinja po grupi bio je 7-14. Stubići dijagrama predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM. *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom (diazepam + 2,5% rastvor metil celuloze). Očigledne razlike između PZ-II-029, DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3 s jedne strane i LAU 463, DK-I-58-1, DK-II-58-1, DK-I-87-1 i DK-I-86-1 sa druge strane su statistički značajne, ali nisu prikazane.

4.2.3. Test gubitka refleksa uspravljanja

U cilju procene uticaja PQ liganda na hipnotički/anestetički efekat diazepama sproveden je eksperiment gde je diazepam primenjen intravenski u dozi od 30 mg/kg nakon što su pacovi i.p. pretretirani nekim od PQ liganda (PZ-II-029, DK-I-60-3, DK-I-58-1, DK-II-58-1 ili DK-I-87-1) u dozi od 20 mg/kg ili rastvaračem (SOL, kontrolna grupa). Primenom jednofaktorske analize varijanse pokazano je da nije bilo statistički značajne razlike u dužini trajanja gubitka refleksa uspravljanja između eksperimentalnih grupa [$F(5,39) = 1,151$; $p = 0,350$; Slika 35a]. Ispitivani PQ ligandi nisu sprečili niti potencirali hipnotičke/anestetičke efekte diazepama.

Jednofaktorska ANOVA je otkrila značajne efekte tretmana na ukupni pređeni put tokom 60 minuta praćenja nakon oporavka od gubitka refleksa uspravljanja [$F(5,33) = 8,424$; $p < 0,001$; Slika 35b]. *Post hoc* SNK poređenjem pokazano je da su životinje tretirane sa PZ-II-029 i DK-I-60-3 uz diazepam, prelazile statistički značajno duži put odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$ i $p = 0,02$,

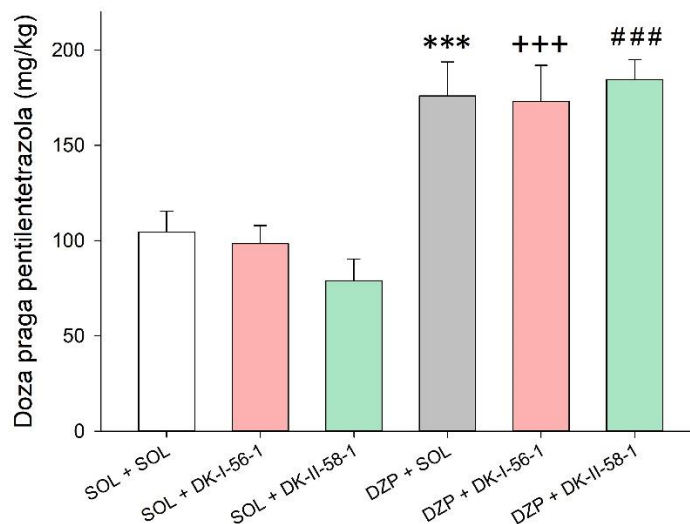
redom). Dodatno, grupa koja je pre primene diazepama tretirana sa DK-I-60-3 imala je statistički značajno veću vrednost ukupnog pređenog puta u poređenju sa grupama koje su pre diazepama tretirane sa PZ-II-029, DK-I-58-1, DK-II-58-1 ili DK-I-87-1 ($p=0,022$, $p<0,001$, $p<0,001$ i $p=0,004$, redom).



Slika 35. a) Uticaj odabranih PQ liganada primenjenih intraperitonealno u dozi od 20 mg/kg, 30 minuta pre intravenske primene diazepama (30 mg/kg) u testu diazepamom-indukovanog gubitka refleksa uspravljanja. Broj životinja po tretmanu bio je 7, osim kontrolne grupe gde je bio 10; **b)** uticaj liganada iz eksperimenta a) na ukupni pređeni put tokom 60 minuta praćenja nakon oporavka od gubitka refleksa uspravljanja. Stubići dijagrama predstavljaju srednju vrednost \pm SEM. *Post hoc* razlike su sledeće: * i *** $p<0,05$ i $p<0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL + diazepam); ++ i +++ $p<0,01$ i $p<0,001$, u poređenju sa DK-I-60-3 + DZP grupom. Broj životinja po grupi bio je 5-9.

4.2.4. Intravenski pentilentetrazolski test

Uticaj odabranih PQ liganda na antikonvulzivnu aktivnost diazepama ispitan je intravenskim pentilentetrazolskim testom u kome su pola sata pre primene PTZ i.p. primenjeni SOL ili diazepam (5 mg/kg) u kombinaciji sa SOL, DK-I-56-1 (15 mg/kg) ili DK-II-58-1 (15 mg/kg). Na izračunate vrednosti doza PTZ koje su bile potrebne da izazovu napad kod ogleđnih životinja primenjena je dvofaktorska analiza varijanse. Interakcija između dva tretmana kao faktora varijacije nije bila značajna [$F(2,24)=0,990$; $p=0,382$]. Efekat prvog tretmana (SOL ili diazepam) na dozu pentilentetrazola bio je statistički značajan [$F(1,35) = 58,152$; $p<0,001$]. *Post hoc* višestrukim poređenjem je pokazano da primena diazepama, samostalno ili u kombinaciji sa DK-I-56-1 ili DK-II-58-1, značajno povećava dozu pentilentetrazola potrebnu za izazivanje generalizovanog tonično-kloničnog napada kod pacova (Slika 36; $p<0,001$ za sva tri poređenja). U poređenju sa rastvaračem, DK-I-56-1 i DK-II-58-1 nisu uspeli da obezbede nikakvu zaštitu od konvulzivnih napada izazvanih pentilentetrazolom ($p=0,748$, $p=0,372$, redom).

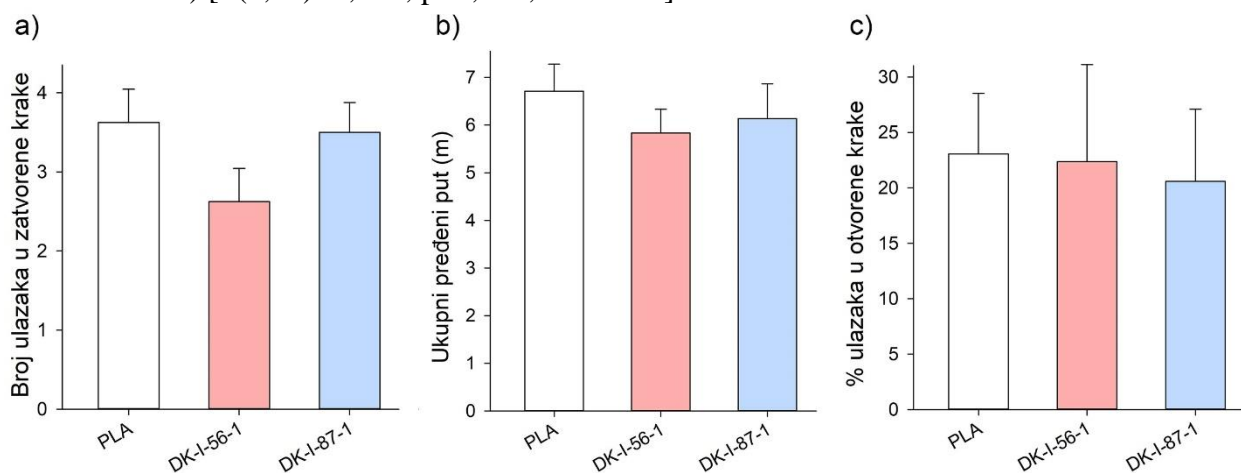


Slika 36. Uticaj PQ liganada DK-I-56-1 i DK-II-58-1 (oba u dozi od 15 mg/kg) primenjenih intraperitonealno, samostalno ili u kombinaciji sa diazepamom (5 mg/kg) na dozu pentilentetrazola potrebnu za izazivanje toničko-kloničkih konvulzivnih napada kod pacova uz kontrolnu grupu tretiranu rastvaračem (SOL + SOL). Stubići dijagrama predstavljaju srednju vrednost \pm SEM. Broj životinja po grupi bio je 6-7. *** $p < 0,001$ u poređenju sa SOL+SOL; +++ $p < 0,001$ u poređenju sa SOL + DK-I-56-1; ### $p < 0,001$ u poređenju sa SOL + DK-II-58-1.

4.2.5. Baterija bihevioralnih eksperijenata na Wistar pacovima

4.2.5.1. Uzdignuti plus lavirint

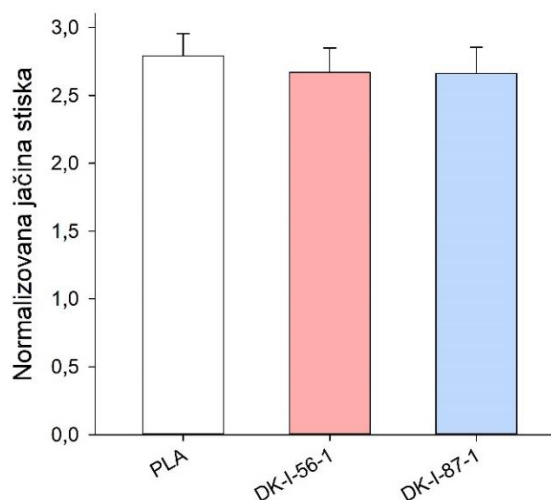
Kada smo analizirali efekte DK-I-56-1 i DK-I-87-1 primenjenih u dozi do 10 mg/kg na parametre aktivnosti na uzdignutom plus lavirintu ukupan efekat tretmana nije dostigao statističku značajnost niti za broj ulazaka u zatvorene krake [$F(2,21)=1,797$; $p=0,190$; Slika 37a] niti za ukupni pređeni put [$F(2,21)=0,544$; $p=0,589$; Slika 37b]. Ispitivani ligandi bili su lišeni uticaja i na parametar koji se može povezati sa anksioznošću životinje na uzdignutom plus lavirintu (% ulazaka u otvorene krake lavirinta) [$F(2,21)=0,033$; $p=0,968$; Slika 37c].



Slika 37. Uticaj DK-I-56-1 i DK-I-87-1 primenjenih intraperitonealno u dozi od 10 mg/kg na broj ulazaka u zatvorene krake (a), ukupni pređeni put (b) i procenat ulazaka u otvorene krake uzdignut plus lavirinta (c) u poređenju sa kontrolnom grupom u kojoj su životinje tretirane placebo nanoemulzijom (PLA). Stubići dijagrama predstavljaju srednju vrednost \pm SEM. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.

4.2.5.2. Test jačine stiska

Jednofaktorska ANOVA pokazala je da tretman nema statistički značajan uticaj na jačinu stiska prednjih šapa pacova kao meru mišićnog tonusa [$F(2,21)=0,163$; $p=0,851$; Slika 38]. Testirani PQ ligandi (DK-I-56-1 i DK-I-87-1; oba u dozi od 10 mg/kg) nemaju izražen miorelaksantni efekat u poređenju sa kontrolnom grupom životinja koje su tretirane placebo nanoemulzijom.

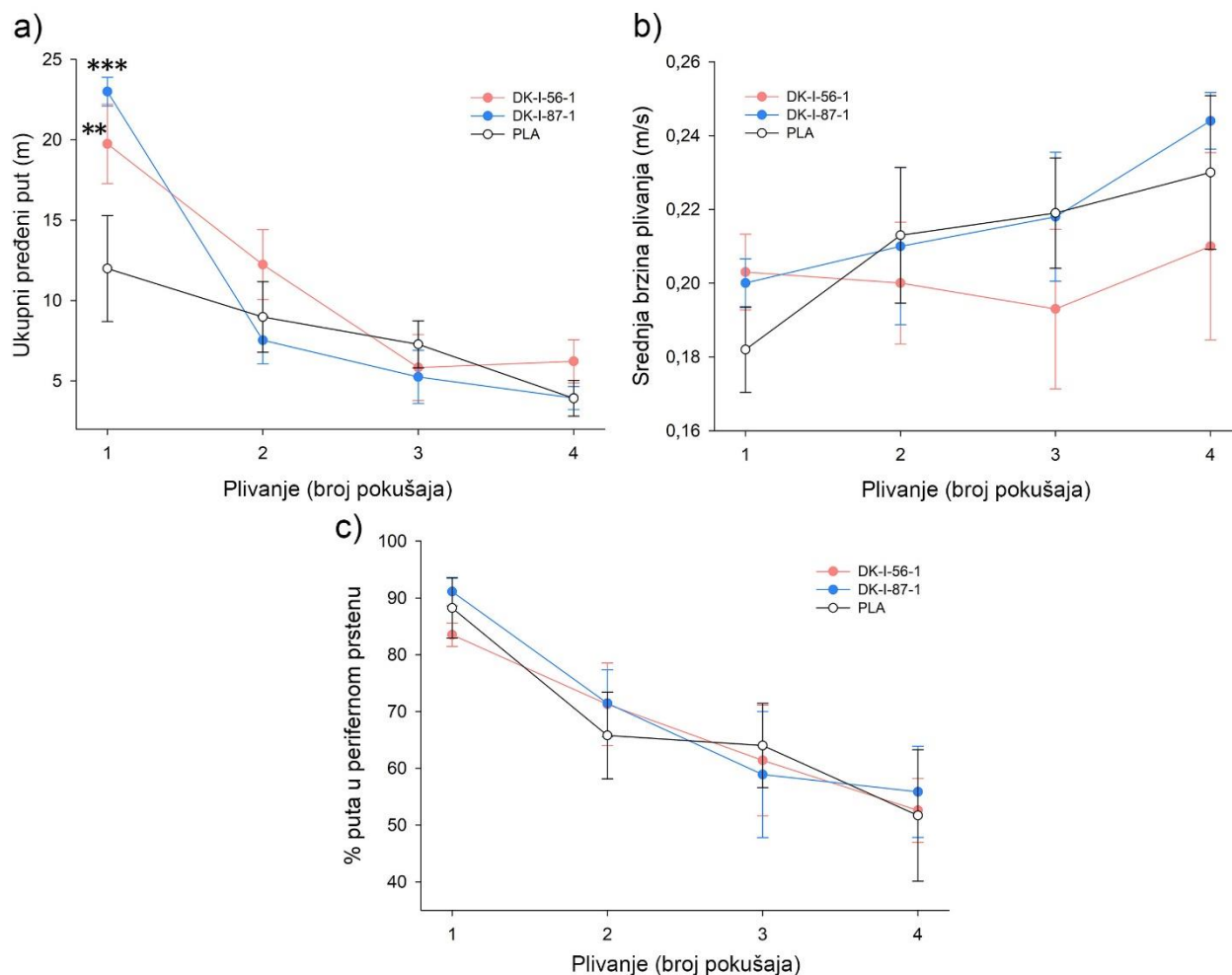


Slika 38. Uticaj DK-I-56-1 i DK-I-87-1 aplikovanih intraperitonealno u dozi od 10 mg/kg na mišićni tonus u testu jačine stiska u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj su životinje tretirane placebo nanoemulzijom (PLA). Stubići dijagrama predstavljaju srednju vrednost jačine stiska (normalizovana u odnosu na telesnu masu životinje) \pm SEM. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.

4.2.5.3. Morisov vodeni lavirint - „cued-learning” protokol

Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem (četiri pokušaja plivanja \times tretman) primenjena na ukupne podatke tokom sva četiri pokušaja plivanja potvrdila je da je uticaj tretmana na parametar pređeni put dostigao trend [$F(2,63)=3,183$; $p=0,062$], dok je interakcija faktora dostigla statističku značajnost [$F(6,63)=2,825$; $p=0,017$]. Post hoc SNK poređenjem pokazano je da su samo u okviru prvog pokušaja plivanja životinje tretirane DK-I-56-1 ili DK-I-87-1 prelazile statistički značajno duži put u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,005$, odnosno $p<0,001$; Slika 39a). U drugom, trećem i četvrtom pokušaju plivanja razlike u dužini pređenog puta do pronalaska platforme između tretmana nije bilo. Kada je dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem primenjena na ostala dva parametra od interesa, srednja brzina plivanja (Slika 39b) i % puta koji je životinja plivala u perifernom prstenu (Slika 39c), statistički značajna razlika nije otkrivena ni za tretman kao faktor, ni za interakciju faktora (srednja brzina plivanja: faktor tretman [$F(2,63)=0,447$; $p=0,645$]; tretman \times dani interakcija [$F(2,63)=0,739$; $p=0,620$]; % puta koji je životinja plivala u perifernom prstenu: faktor tretman [$F(2,63)=0,066$; $p=0,936$]; tretman \times dani interakcija [$F(2,63)=0,212$; $p=0,972$]).

Kada se uzmu u obzir rezultati bihevioralne baterije može se zaključiti da se potencijacijom GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu ne izazivaju farmakološki efekti klasičnih benzodiazepina. Razlika koja je otkrivena u Morisovom vodenom lavirintu, može da ukaže da i ako je postojao neki uticaj DK-I-56-1 i DK-87-1 na ukupni pređeni put do pronalaska platforme u prvom pokušaju plivanja, na njega se akutno razvio određeni stepen tolerancije, tako da su ligandi bili kompletno lišeni tog uticaja kroz preostale pokušaje plivanja.



Slika 39. Uticaj DK-I-56-1 i DK-i-87-1 primenjenih intraperitonealno u dozi od 10 mg/kg na ukupni pređeni put (a), srednju brzinu plivanja (b) i % puta koji je životinja plivala u perifernom prstenu (c) tokom četiri uzastopna pokušaja plivanja u Morisovom vodenom lavirintu. Tačke grafika predstavljaju srednju vrednost \pm SEM. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8. ** i ***, $p < 0,01$ i $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj su životinje tretirane placebo nanoemulzijom (PLA).

4.3. Rezultati ispitivanja profilaktičkog antinociceptivnog efekta DK-I-56-1 na modelu trigeminalne neuropatije kod pacova

Nakon sprovedene operativne procedure, u okviru grupa životinja kojima je podvezan nerv (IoN-CCI), odnosno koje su lažno operisane (*sham*) formirane su po dve jednake grupe (jedna koja prima DK-I-56-1 u dozi od 10 mg/kg i druga koja prima placebo nanoemulziju). Primena tretmana

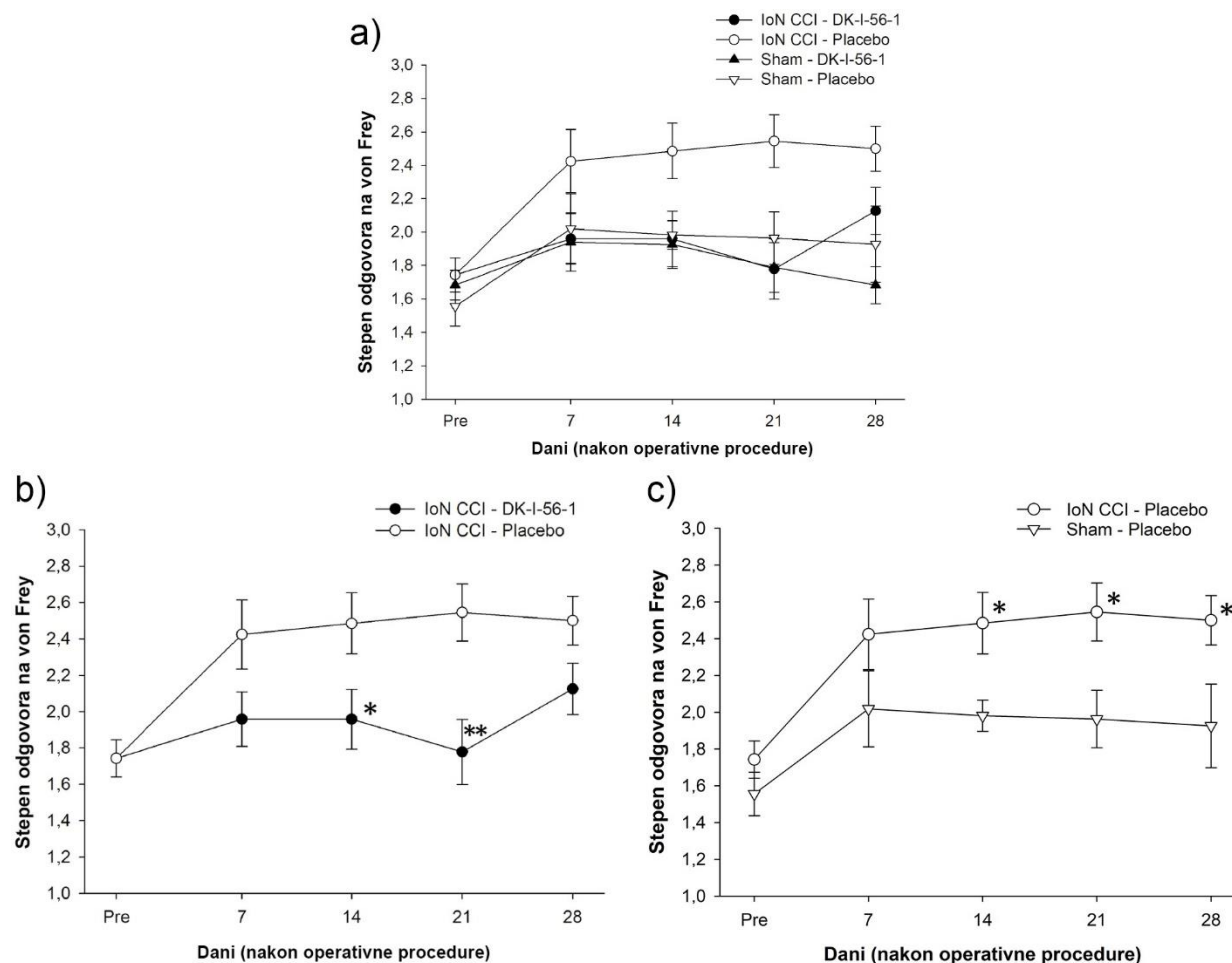
trajala je od 1. do 14. dana nakon operativne procedure, a životinje praćene u vremenskom intervalu od 28 dana, a sve u cilju procene potencijala profilaktičkog efekta PQ liganda DK-I-56-1 na razvoj neuropatskog bola (odgovor preosetljivosti). Na Slici 16 predstavljen je vremenski tok eksperimenta, dok Slika 40 prikazuje rezultate procene odgovora preosetljivosti životinja za određeni dan ispitivanja (skor odgovora na stimulaciju von Frey filamentom za sve četiri eksperimentalne grupe; merenja su obavljena za dati dan pre sledeće aplikacije DK-I-56-1 ili placebo nanoemulzije)). Tri pacova (jedan iz grupe operisanih životinja koje su primale placebo i dva iz grupe lažno operisanih životinja koje su primale placebo) nisu uključeni u statističku analizu zbog kriterijuma isključenja. Kriterijum je definisan na sledeći način. Za grupu životinja kojima je podvezan živac, a tretirane placebom – ukoliko je nakon podvezivanja živca odgovor na stimulaciju von Frey filamentima bio manji u poređenju sa bazalnim vrednostima. Za grupu životinja podvrgnutih proceduri ali bez podvezivanja živca, a tretiranih placebom – ukoliko je odgovor na stimulaciju von Frey filamentima bio za više ili jednako od 1,25 poena veći nakon podvezivanja živca u poređenju sa bazalnim vrednostima.

Vrednosti odgovora životinja na stimulaciju von Frey filamentima prikazane su u Tabeli 12. Primenom jednofaktorske analize varijanse na rezultate bazalnog odgovora (pre operacije) razlika između grupa nije pronađena [$F(3,39)=1,724$; $p=0,178$]. Takođe, primenom iste statističke analize razlika nije pronađena ni 7. dana nakon operacije. Statistički značajna razlika pronađena je primenom jednofaktorske ANOVA-e na odgovore životinja 14. dana posle opracije [$F(3,39)=3,201$; $p=0,034$], a daljom *post hoc* SNK metodom utvrđeno je da u su okviru grupe životinja kojima je podvezan živac, statistički značajno niži odgovor imale životinje koje su tretirane DK-I-56-1 u poređenju sa onim životinjama koje su primale placebo ($p=0,038$, Slika 40b). Dodatno, životinje kojima nije podvezan živac, a tretirane placebom imale su značajno manji odgovor na mehaničku stimulaciju u poređenju sa životinjama kojima je podvezan živac, a tretirane placebom ($p = 0,029$, Slika 40c). Dalje, 21. postoperativnog dana razlika među grupama je dostigla visoku značajnost [$F(3,39)=5,071$; $p=0,005$]. *Post hoc* poređenjem je pokazano da se razlika između IoN-CCI – DK-I-56-1 i IoN-CCI – placebo grupa koja je detektovana 14. dana, zadržava i 21. dana ($p=0,008$, Slika 40b), kao i razlika pronađena između grupa IoN-CCI – DK-I-56-1 i IoN-CCI – placebo ($p = 0,02$, Slika 40c). Analizom odgovora životinja poslednjeg dana praćenja (28. postoperativni dan) utvrđena je statistički značajna razlika među grupama [$F(3,39)=5,243$; $p=0,004$]. Višestrukim poređenjem, potvrđeno je da se razlika između grupa tretiranih placebom, IoN-CCI i *Sham*, i dalje zadržava ($p = 0,038$, Slika 40c), dok je razlika između IoN-CCI – DK-I-56-1 i IoN-CCI – placebo bila na nivou trenda ($p=0,08$).

Na osnovu rezultata odgovora životinja na von Frey filamente, DK-I-56-1 ostvaruje preventivni efekat na razvoj neuropatskog bola, na osnovu statistički značajnih razlika koje su dobijene između IoN-CCI – DK-I-56-1 i IoN-CCI – placebo grupe 14. i 21. postoperativnog dana. 28. postoperativnog dana, odnosno 14 dana nakon poslednje doze, značajan efekta DK-I-56-1 nije detektovan (razlika je bila na nivou trenda). Dakle, DK-I-56-1 je pokazao sposobnost da suzbije razvoj neuropatskog bola koji je povezan sa podvezivanjem grane trigeminalnog nerva tokom primene terapije i sedam dana nakon prekida terapije. Razlike koje su utvrđene između placebom tretiranih grupa (grupa gde je podvezan živac i grupa gde je pristupljeno živcu ali nije podvezan) 14., 21. i 28. postoperativnog dana ukazuje na validnost modela trigeminalnog neuropatskog bola.

Tabela 13. Profilaktički efekat DK-I-56-1: vrednosti odgovora ekperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima (srednja vrednost \pm SEM). IoN-CCI- hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca (životinje kojima je živac podvezan); *Sham*– životinje koje su podvrgnute operativnoj proceduri, ali nije podvezan živac. #, \$ - između obeleženih vrednosti postoji statistički značajna razlika

Period testiranja (dan)	IoN-CCI – DK-I-56-1	IoN-CCI – placebo	Sham – DK-I-56-1	Sham – placebo
Pre (- 1)	1,46 \pm 0,09	1,74 \pm 0,10	1,68 \pm 0,09	1,56 \pm 0,12
7	1,96 \pm 0,15	2,42 \pm 0,19	1,94 \pm 0,18	2,02 \pm 0,21
14	1,96 \pm 0,17 [#]	2,48 \pm 0,17 [#] \$	1,92 \pm 0,14	1,98 \pm 0,08 ^{\$}
21	1,78 \pm 0,18 [#]	2,54 \pm 0,16 [#] \$	1,79 \pm 0,15	1,96 \pm 0,16 ^{\$}
28	2,12 \pm 0,14	2,50 \pm 0,14 ^{\$}	1,68 \pm 0,11	1,93 \pm 0,24 ^{\$}

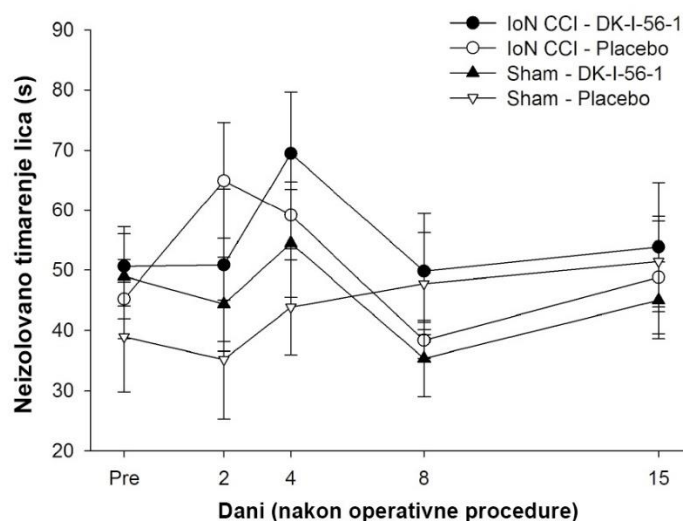


Slika 40. a) Rezultati odgovora na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima za sve četiri grupe (nisu prikazane razlike). Radi lakšeg praćenja statistički značajnih razlika iz zajedničkog grafika (a) konstruisana su dva odvojena grafika. Na panelu **b)** prikazano je poređenje IoN-CCI – DK-I-56-1 i IoN-CCI – placebo grupe, a na panelu **c)** poređenje IoN-CCI – placebo i *Sham* – placebo grupe.

Odgovor na primenu serije od tri von Frey filameta na levi predeo vibrisa kod životinja kojima je podvezan infraorbitalni živac (IoN-CCI grupa), odnosno životinja koje su podvrgnute operativnoj proceduri, ali živac nije podvezan (sham grupa) meren je dan pre operacije (pre) i 7., 14., 21. i 28. dana. Intraperitonealna primena DK-I-56-1 (10 mg/kg), odnosno placebo nanoemulzije započeta je dan nakon operacije, a trajala je 14 uzastopnih dana. Eksperimentalne grupe: IoN-CCI – DK-I-56-1, IoN-CCI – placebo, sham – DK-I-56-1 i sham – placebo obuhvatale su 12, 11, 11 i 9 životinja, redom. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. * i ** $p < 0,05$ i $p < 0,01$ u poređenju sa IoN-CCI – placebo grupom (b), odnosno sham – placebo grupom (c).

4.3.1. Praćenje „umivanja“ lica životinja

Rezultati praćenja umivanja lica životinja kao deo generalnog timarenja tela, kao fiziološke manifestacije ponašanja pacova na koje se očekuje da konstrikcija povreda infraorbitalnog živca neće imati, ili će imati zanemarljiv efekat, prikazani su na Slici 41. Nivo aktivnosti je bio različit u svakom od pet dana praćenja životinja, ali neparametarskom statističkom analizom nisu otkrivene značajne razlike među grupama. Ovaj parametar, koji karakteriše značajna varijabilnost, pokazao je da DK-I-56-1 ne ostvaruje sedativno kao ni motorno inkapacitirajuće dejstvo.



Slika 41. Uticaj intraperitonealno primenjenog DK-I-56-1 (10 mg/kg) ili placebo nanoemulzije na vreme neizolovanog timarenja lica pacova (timarenje lica kao deo generalnog timarenja dela) kod životinja kojima je podvezan infraorbitalni živac (IoN-CCI grupa), odnosno kod životinja kod kojih je operativnom procedurom pristupljeno živcu, ali nije podvezan (sham). Neizolovano timarenje lica pacova mereno je dva dana pre operacije (pre) zatim 2., 4., 8. i 15. dana nakon operacije. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM. (Broj životinja po eksperimentalnim grupama pogledati u legendi Slike 40).

5. DISKUSIJA

GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu primarno su locirani na granularnim ćelijama malog mozga (Pirker i sar 2000; Nusser i sar., 1998), ali su takođe eksprimirani u drugim regionima mozga (Gutierrez i sar., 1996; Yang i sar., 2006). Do nedavno se nije znalo mnogo o funkciji ovih receptora u mozgu. Međutim, *neuroimaging*, *post-mortem* i genetske studije kod ljudi, zajedno sa životinjskim modelima koji oponašaju neuropsihijatrijske fenotipove podržavaju ideju da jedinjenja koja pozitivno modulišu $\alpha 6$ GABA_AR mogu biti korisna u različitim stanjima kao što su esencijalni tremor i motorni poremećaji kod Tourette-ovog, Angelman-ovog, i Down-ovog sindroma, neuropsihijatrijski poremećaj sa senzorno-motornim deficitima (kao što su poremećaji iz spektra autizma, određeni simptomi shizofrenije, opsesivno kompulzivni poremećaj i poremećaji pažnje), poremećaji trigeminalnog sistema, depresija i migrena (Sieghart i sar., 2022 i brojne reference tu navedene). Bezbednosna farmakološka i neurotoksikološka ispitivanja u kontekstu CNS-a su od najveće važnosti za pravovremenu procenu mogućnosti da jedan lek kandidat uspešno prođe faze razvoja novog leka (Andronis i sar., 2020). Nedavno su identifikovana PQ jedinjenja kao prva koja imaju sposobnost da pozitivno modulišu $\alpha 6$ GABA_AR sa velikom selektivnošću (Varagić i sar., 2013a i 2013b; Treven i sar., 2018; Chiou i sar., 2016). Ona obećavaju razvoj lekova sa novim mehanizmom delovanja za niz neadekvatno lečenih hroničnih stanja u neurologiji i psihijatriji povezanih sa ovim podtipom jonotropnih receptora za GABA-u. Na osnovu strukture tri PQ liganda (PZ-II-029, LAU463 i LAU165), visoko selektivna za $\alpha 6$ GABA_AR, sintetisan je niz drugih PQ liganda od kojih je 15 korišćeno u eksperimentima prezentovanim u ovoj disertaciji. Sintetisani su sa ciljem povećanja njihove ograničene rastvorljivosti u vodi kao i metaboličke stabilnosti. Poznato je da zamena vodonika njegovim izotopom, deuterijumom, pozitivno utiče na metaboličku stabilnost lekova uz zadržavanje farmakološkog profila aktivnih jedinjenja (Harbeson i Tung, 2014). Supstitucija -OCH₃ grupe sa -OCD₃ grupom u polaznim jedinjenjima (PZ-II-029, LAU463 i LAU165) imala je za posledicu dobijanje deuterisanih analoga sa poboljšanom metaboličkom stabilnošću u testovima na mikrozomima humane i mišije jetre (eng. *human liver microsomes-HLM* i *mouse liver microsomes MLM*) (Knutson i sar., 2018).

Ovde smo pokazali odličan bezbednosni profil u ponašanju testiranih PQ liganda, koji su razvrstani u tri strukturne grupe, a što je procenjeno u testu spontane lokomotorne aktivnosti, uzdignutom plus lavirintu, rotarodu, testu gubitka refleksa uspravljanja, pentilentetrazolskom testu i Morisovom vodenom lavirintu, u kojima diazepam, kao referentni benzodiazepinski lek, delujući pozitivnom modulacijom GABA_AR ispoljava svoje sedativno, ansiolitičko/sedativno, ataksično, hipnotičko/anestetičko, antikonvulzivno i anterogradno-amnestičko dejstvo, redom. Dodatno, potencijal za stupanje u sinergističke ili antagonističke interakcije može biti važan za mehanicistički nove terapijske opcije koje su u razvoju, imajući u vidu da farmakodinamske interakcije sa većinom lekova koji efekte ispoljavaju na nivou CNS-a mogu uticati na njihovu kliničku efikasnost i podnošljivost (Johannessen i Landmark, 2010).

5.1. Određivanje koncentracije izabranih liganada u ciljnim tkivima oglednih životinja

Kao što je očekivano, deuterisani analozi zadržavaju efikasnost na $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA_AR koja je komparabilna sa onom koju imaju polazna (*parent*) jedinjenja. Međutim, farmakokinetičke osobine su unapređene na šta ukazuju rezultati dobijeni u eksperimentima farmakokinetičke karakterizacije odabranih PQ liganada. Deuteracijom se postiže bolja ciljana isporuka u mozak na šta ukazuju vrednosti particionih koeficijenata supstanci DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3 koje su veće u odnosu na K_p polaznog jedinjenja (PZ-II-029). Dodatno, približno dva puta su veće vrednosti maksimalnih koncentracija (C_{max}) koje u mozgu dostižu deuterisani analozi (DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3) u poređenju sa PZ-II-029. Sa druge strane, C_{max} N-hetero deuterisanog analoga, DK-I-86-1, manja je nego za PZ-II-029. Treba napomenuti da svi analozi (DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3 i DK-I-86-1) pokazuju slično povećanje metaboličke stabilnosti sa poluvremenima (u okviru standardnih greški) u opsegu 8,3 – 12,5 h (HLM) i 9,2 – 14,2 h (MLM) dok poluvremena za PZ-II-029 iznose 3,6 h (HLM) i 3,2 h (MLM) (Knutson i sar., 2018). Navedeni rezultati ukazuju da povećanje metaboličke stabilnosti ne znači nužno i više koncentracije liganda u mozgu, već brojni drugi faktori utiču na moždanu ekspoziciju kao što su rastvorljivost u lipidima, naelektrisanje, tercijarna struktura i stepen vezivanja za proteine (Banks, 2009). Uprkos povećanoj rastvorljivosti DK-I-86-1 u vodi (pogledati Tabelu 1) koja je postignuta uvođenjem N-hetero supstituenta u D prsten PQ strukture, smanjena je lipofilnost (cLogP = 2,17 u poređenju sa cLogP (PZ-II-029)=2,76; Knutson i sar., 2018) koja može da utiče na sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Inače, lipofilnost predstavlja veoma važnu fizičko-hemijsku osobinu koja ima pivotalnu ulogu u procesima apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije terapijskih agenasa. Lekovi koje odlikuje visoka lipofilnost su podložniji P450 posredovanom metabolizmu, što za posledicu ima brži klirens. Sa druge strane izrazito polarna jedinjenja pokazuju dobru rastvorljivost u vodi, shodno tome brži klirens putem bubrega, a često, i prisustvo jonizujućih funkcionalnih grupa ograničava njihov prolazak kroz krvno-moždanu barijeru (Waterhouse, 2003). Ovo znači da je optimalna lipofilnost uslov za dispoziciju supstance u mozak. DK-I-87-1 koji je farmakokinetički okarakterisan u prvom eksperimentu ne poseduje efikasnost posredovanu PQ mestom na $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA_AR (Slika 8b), ali na osnovu K_p vrednosti zaključuje se da se ligand distribuirao u mozak i da se shodno primarnom farmakološkom profilu može koristiti u eksperimentima kao kontrolna supstanca.

Imajući na umu da su jedino slobodni, nevezani, molekuli leka dostupni da ostvare farmakološke efekte, određivanje slobodnih koncentracija leka u kompartmanu gde ostvaruje dejstvo ima ključni značaj. S tim u vezi za dva PQ liganda, DK-I-56-1 i DK-I-60-3, procenjene su slobodne frakcije (u plazmi i mozgu) i izračunate slobodne koncentracije u mozgu. Slobodne frakcije oba liganda u plazmi bile su izuzetno niske (0% za DK-I-56-1 i 0,84% za DK-I-60-3), odnosno, slobodne koncentracije praktično nisu mogle biti izračunate. Međutim, slobodne frakcije u mozgu su bile veće, tako da su dostignute značajne koncentracije, što znači da su se zahvaljujući lipofilnosti supstance neometano distribuirale u mozak. Ettrup i sar. (2011) navode slično zapažanje za veliki broj lipofilnih N-benzil-supstituisanih fenetilamina, kod kojih niska slobodna frakcija liganada u plazmi ne utiče značajno na dispoziciju u moždano tkivo. Približno dva puta veća vrednost parametra AUC_{0-12, mozak} za supstancu DK-I-56-1 ukazuje na prednost nad DK-I-60-3. Dodatno, podaci iz studija primarne farmakodinamike (elektrofiziološka aktivnost DK-I-56-1 iznosi približno 200% kada se primeni 0,1 μ M DK-I-56-1 uz prisustvo EC₃₋₅ GABA-e (Knutson i sar,

2018)) ukazuju da su slobodne koncentracije koje DK-I-56-1 postiže u moždanom tkivu, a koje su reda veličine i iznad 100 nM, dovoljne da se ostvari modulacija $\alpha\beta\gamma 2$ receptora *in vivo*.

S obzirom na ograničenu rastvorljivost PQ liganada u vodi primenjene su određene farmaceutsko-tehnološke strategije i izrađene formulacije kojima se rešavaju izazovi vezani za rastvorljivost. Jedna od biokompatibilnih formulacija koju odlikuju brojne prednosti je nanoemulzija, tako da je deo farmakokinetičkih istraživanja posvećen poređenju uobičajeno korišćene suspenzije, rastvora koji sadrži 20% organskog rastvarača DMSO i 20% korastvarača *Cremophor EL* i nanoemulzije supstance DK-I-56-1. Poređenjem koncentracija u plazmi i mozgu za svaku vremensku tačku, za tri formulacije dobijeno je samo da u trećem satu rastvor obezbeđuje veće koncentracije DK-I-56-1 u plazmi u poređenju sa suspenzijom, i u tački od pet minuta koncentracija DK-I-56-1 u mozgu bila je značajno veća nakon primene suspenzije u poređenju i sa rastvorom i sa nanoemulzijom. Poređenjem farmakokinetičkih parametara za tri formulacije razlike su dobijene za C_{max} i AUC_{0-12} u plazmi. Naime, najveću maksimalnu koncentraciju u plazmi obezbedio je rastvor kao formulacija u poređenju sa preostale dve formulacije, dok je AUC_{0-12} rastvora bio značajno veći samo u odnosu na suspenziju. Formulacija kao faktor varijacije nije uzrokovala statistički značajne razlike u parametrima izračunatim za mozak.

Ukratko, rezultati ove farmakokinetičke studije su pokazali da između ispitivanih formulacija suspenzije, rastvora i nanoemulzije DK-I-56-1 primenjenih intraperitonealno kod pacova, postoje diskretne razlike u farmakokinetici inkorporirane aktivne supstance. Može se smatrati da su suspenzija i nanoemulzija optimalne formulacije za aplikaciju ogleđnim životinjama i da obezbeđuju prihvatljivu ciljanu isporuku supstanci u mozak. Značajno viša vrednost parametra C_{max} u plazmi za rastvor u odnosu na druge dve formulacije, takođe i u mozgu (ali bez dostizanja značajnosti), mogla bi da ukaže na primenjivost rastvora kao formulacije u nekim urgentnim stanjima, ali uz optimizaciju sastava rastvora.

U daljem toku farmakokinetičkih eksperimenata ispitivan je uticaj deuteracije na apsolutnu biološku raspoloživost u plazmi i mozgu pacova dve PQ supstance, PZ-II-029 i njenog direktnog deuterisanog analoga DK-I-56-1. Nakon što su određeni farmakokinetički profili i izračunati parametri u plazmi nakon i.v. i p.o. primene PZ-II-029 izračunata je F_{plazma} vrednost koja predstavlja apsolutnu oralnu bioraspoloživost u sistemskoj cirkulaciji. Na isti način je F_{plazma} vrednost izračunata za DK-I-56-1. Po analogiji, određeni su farmakokinetički profili u mozgu i izračunati parametri nakon i.v. i p.o. primene ispitivanih liganada, a zatim izračunate F_{mozak} vrednosti za obe supstance, koje predstavljaju apsolutnu oralnu bioraspoloživost u mozgu. Veću apsolutnu oralnu bioraspoloživost postigla je supstanca DK-I-56-1 i u plazmi i u mozgu u odnosu na vrednosti bioraspoloživosti supstance PZ-II-029. Ovi podaci ukazuju da je uvođenje deuterijuma u osnovnu strukturu PZ-II-029 rezultovalo optimizacijom farmakokinetičkog ponašanja nakon peroralne primene, čime se dodatno favorizuje primena DK-I-56-1 u eksperimentima bihejvioralne karakterizacije i ispitivanje njenih efekata u animalnim modelima bolesti.

Farmakokinetička karakterizacija LAU463, njegova dva deuterisana analoga (DK-I-58-1 i DK-II-58-1) kao i *prodrug* oblika (DK-IV-15-1) opet je dokazala da deuteracija ima za posledicu značajno poboljšanje farmakokinetičkih osobina deuterisanih jedinjenja. Treba dodati da DK-II-58-1 ima tendenciju dostizanja većih vrednosti parametara AUC_{0-24} i C_{max} u plazmi u odnosu na DK-I-58-1. Osim što deuterisani analozi LAU463 pokazuju unapređenu farmakokinetiku, njih

odlikuje i veća metabolička stabilnost (vrednosti poluvremena za LAU463 u prisustvu mikrozoma humane jetre odnosno, mikrozoma mišje jetre iznose približno (nisu prikazane SEM vrednosti) 1,7 odnosno 1,9 h, dok su iste vrednosti za DK-I-58-1, 3,4 i 2,3 h; a za DK-II-58-1, 38,6 i 70,8 h (Knutson i sar., 2018). Sa navedenim vrednostima stabilnosti DK-II-58-1 predstavlja metabolički najstabilnije jedinjenje u seriji PQ liganada, što mu opet daje blagu prednost nad DK-I-58-1. *Prodrug* oblik LAU463 takođe doprinosi poboljšanoj farmakokinetici i višim vrednostima parametara (C_{\max} i AUC_{0-24}) u plazmi. Što se tiče profila LAU463, analoga i *prodrug* oblika u mozgu neophodna su dodatna ispitivanja sa višim primenjenim dozama kako bi se dobili relevantni i pouzdani podaci.

U poslednjem farmakokinetičkom eksperimentu urađen je skrining 14 PQ liganda kroz eksperimente kasetnog doziranja. Ovakva tehnologija (poznata i kao „*N-in-1 dosing*”) pokazala se kao efikasan metod testiranja više jedinjenja za kraće vreme uz utrošak manjeg broja životinja. Imajuću u vidu da su podaci iz studija metabolizma i farmakokinetike leka presudni u odabiru „*hit*” struktura iz baza koje čine milioni jedinjenja, tehnologija kasetnog doziranja ima izuzetan značaj (Watanabe i sar., 2006; Nagilla i sar., 2011). Testirani su PZ-II-029 i njegovi deuterisani analozi (DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3 i DK-I-86-1); LAU463 i njegovi deuterisani analozi (DK-I-58-1 i DK-II-58-1); dva deuterisana strukturna izomera DK-I-87-1 i DK-I-59-1; i četiri fluorirana analoga (DK-IV-19-1, DK-IV-20-1, DK-IV-22-1 i MM-I-10).

Trend koji je uočen u prvom farmakokinetičkom eksperimentu, potvrđen je i u ovom. Naime, deuterisani analozi liganada PZ-II-029 (DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3) i LAU463 (DK-I-58-1 i DK-II-58-1) imaju znatno povećane vrednosti K_p , alfa i C_{\max} u svim slučajevima, dok je ekspozicija organa za izlučivanje ostala približno ista u poređenju sa osnovnim strukturama (PZ-II-029 i LAU 463). Vrednost K_p veću od jedan imaju samo dva od 14 testiranih liganda, DK-I-56-1 i DK-I-58-1, koji predstavljaju direktne deuterisane analoge PZ-II-029, odnosno LAU463 (pogledati Tabelu 2 sa molekulskim strukturama liganada) što znači da deuteracija kao relativno jednostavna hemijska manipulacija doprinosi značajnom unapređenju farmakokinetičkog profila supstance i njenoj poboljšanoj dispoziciji u mozak.

Još jedan parametar koji je u ovom eksperimentu uzet u razmatranje bio je α koji pokazuje udeo ukupnog nivoa supstance u mozgu u odnosu na ukupan nivo supstance u svim kompartmanima u kojima su merene koncentracije. Dok su vrednosti parametra α za DK-I-58-1 i DK-II-58-1 relativno visoke, uvođenje fluora u odgovarajuće molekule imalo je za posledicu petostruko povećanje izloženosti organa za izlučivanje, što je doprinelo značajnom smanjenju α vrednosti za DK-IV-22-1 i MM-I-10. Može se zaključiti da uvođenje fluora utiče na značajno opterećenje organa za izlučivanje, a o čemu govore ukupni nivoi fluorovanih analoga u jetri i bubregu (parametri $AUC_{0-36, \text{jetra}}$ i $AUC_{0-36, \text{bubreg}}$). Studije citotoksičnosti koje su sprovedene na dve ćelijske linije (ćelije humanog hepatocelularnog karcinoma (HEPG2) i ćelije bubrega humanog embriona (HEK293)) su pokazale da su PZ-II-029 i analozi, LAU 463 i analozi, kao i DK-I-87-1 i DK-I-59-1 netoksični čak i u koncentraciji od 400 μM (što znači da je $LD_{50} > 400 \mu\text{M}$) (Knutson i sar., 2018). Prema tome, supstitucija $-\text{OCH}_3$ grupe $-\text{OCD}_3$ grupom bilo u A ili D prstenu PQ strukture nema negativan uticaj na ćelijsko preživljavanje. Takođe, orto ili meta pozicija supstituenta u D prstenu, kao ni uvođenje N-hetero atoma u D prsten ne pokazuju citotoksičnost. Sa druge strane, fluorovani analozi pokazuju izvestan stepen citotoksičnosti. Ligandi koji imaju tri atoma fluora u strukturi (DK-IV-19-1, DK-IV-20-1 i DK-IV-22-1) pokazali su izvesnu toksičnost na HEK293

ćelijama (bubreg), dok je MM-I-10 koji sadrži šest atoma fluora pokazao toksičnost na obe ćelijske linije (jetra i bubreg) (nepublikovani rezultati saradničke laboratorije - Katedra za hemiju i biohemiju Instituta za otkriće lekova Milvoki, Univerzitet u Viskonsinu, Milvoki, SAD).

Može se zaključiti da su svi ligandi dostigli značajne maksimalne mikromolarne koncentracije u plazmi, dok je njihov prolazak u centralni nervni sistem bio blago ograničen. Ipak, kinetičke studije na glodarima pokazuju da ovi ligandi, a posebno DK-I-56-1, poseduju farmakokinetička svojstva koja su korisna za predloženu neuropsihofarmakološku primenu. Fluorovani analozi zbog tendencije da dostižu visoke nivoe u jetri i bubregu, kao i potencijalne citotoksičnosti utvrđene na ćelijama jetre i bubrega, ne predstavljaju kandidate za dalja ispitivanja na animalnim modelima bolesti.

5.2. Test spontane lokomotorne aktivnosti

Kao neizostavni deo bazične bihejvioralne karakterizacije novosintetisanih liganada, test spontane lokomotorne aktivnosti sproveden je za 14 liganada koji su predmet istraživanja disertacije, uz različite puteve primene liganada, različite doze i dozne raspone i na dve različite vrste i tri soja životinja.

U testu spontane lokomotorne aktivnosti sprovedenom na adultnim mužjacima pacova *Sprague Dawley* soja nije utvrđen nikakav značajan efekat na ukupni pređeni put nakon peroralne ili intraperitonealne primene odabranih PQ liganada, doziranih sa 15 mg/kg, odnosno 3 i 10 mg/kg. U istom testu, dva liganada (DK-I-56-1 kao analog PZ-II-029 i DK-I-58-1 kao analog LAU463), dozirani intraperitonealno u dozi od 10 mg/kg, nisu antagonizovali hipolokomotorne efekte diazepama.

U setu eksperimenata lokomotorne aktivnosti sprovedenim na adultnim mužjacima Wistar pacova, utvrđen je neočekivan, hiperlokomotorni efekat supstance DK-I-56-1 dozirane intraperitonealno (10 mg/kg). Efekat je potvrđen i u dozi od 3 mg/kg, ali nije u dozama od 1 i 30 mg/kg. Ovo ukazuje da je u testu utvrđena dozna zavisnost farmakološke aktivnosti u obliku obrnutog slova U (sreće se i naziv eng. *bell-shaped*), što nije neuobičajeno za psihotropne lekove (npr. nalazi sa antipsihoticima ili prokognitivnim supstancama; Narahashi i sar., 2004; Nishitani i sar., 2019).

Na mužjacima miševa C57BL soja hiperlokomotorni efekat utvrđen je za PZ-II-029 i DK-I-56-1 u sve tri ispitivane doze (3, 10 i 30 mg/kg) nakon njihove intraperitonealne primene. U ovom slučaju, nije viđen očigledan odnos doze i efekta supstance DK-I-56-1 u obliku inverznog slova U kao u prethodnom eksperimentu, ali tendencija postoji što potkrepljuje činjenica da životinje tretirane dozom od 10 mg/kg prelaze statistički značajno duži put u poređenju sa onima koje su primile dozu od 30 mg/kg.

Spontana lokomotorna aktivnost prema protokolu sa *wash-out* protokolom ispitana je za 14 PQ liganada primenjenih na miševima intraperitonealno u dozi od 3 mg/kg uz pozitivnu, negativnu i neutralnu kontrolu. Ovakvim protokolom redukovana je broj životinja, a generisan dovoljan broj podataka za pouzdanu statističku analizu. Na osnovu rezultata uočava se razdvajanje strukturnih grupa liganada na osnovu bioloških efekata. Naime, LAU463 i analozi (DK-I-58-1 i DK-II-58-1) značajno smanjuju pređeni put u poređenju sa SOL kontrolnom grupom. Suprotno, PZ-II-029 i analozi (DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3) imaju tendenciju ostvarivanja hiperlokomotornog dejstva bez dostizanja statističke značajnosti. Međutim, u vremenu mobilnosti, koji predstavlja

robusniji parametar od ukupnog pređenog puta, statistički značajno povećanje dostigle su i grupe životinja tretirane sa PZ-II-029, DK-I-56-1 i DK-I-60-3.

Ukratko, na osnovu rezultata iz eksperimenata merenja lokomotorne aktivnosti životinja zaključuje se da su PZ-II-029 i njegovi analozi (osim DK-I-86-1) lišeni sedativnog dejstva koje je karakteristično za klasične benzodiazepine. Iako to značajno doprinosi povoljnom bezbednosnom profilu navedene strukturne grupe liganada, neočekivana blaga hiperlokomorna aktivnost koja je dobijena na pacovima Wistar soja i miševima C57BL soja (gde je bila prisutna i u prisustvu sedativne doze diazepama), zahteva dalja istraživanja u cilju otkrivanja biološkog supstrata koji leži u osnovi dobijenog efekta. Hiperlokomocija može da bude posledica suptilnog povećanja motivacionog podsticaja što se može iskoristiti kod depresivnih poremećaja (Bewernick i sar., 2017), ali svakako da se ovakva pretpostavka mora evaluirati kroz dalje istraživanje. Takođe, utvrđeno je da jedan od PQ liganada koga odlikuje visok afinitet za BZ mesto gde ostvaruje neutralnu modulaciju, a u višim koncentracijama ostvaruje neselektivnu pozitivnu modulaciju posredstvom PQ mesta, CGS 9895 dozno zavisno antagonizuje antikonvulzivno dejstvo diazepama u pentilentetrazolskom testu na miševima (Katzman i Shannon, 1985). Oba skupa podataka dobijenih za PQ ligande sugerišu da su relativne uloge GABA_AR koje sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u regulaciji motoričkih funkcija sveobuhvatnije i istaknutije kod miševa nego kod pacova, što zahteva dalja istraživanja na sistematičniji način. Ova hipoteza proizilazi iz rezultata filogenetskog poređenja koji ukazuju da je $\alpha 6$, pored $\alpha 4$ podjedinice, najstarija α podjedinica, a da je δ podjedinica najstarija od svih podjedinica GABA_A receptora (Ortells i sar., 1995).

5.3. Rotarod test

Rotarod je jedan od najkorišćenijih testova za procenu uticaja psihotropnih lekova na motornu koordinaciju glodara, te s tim u vezi predstavlja važan eksperimentalni deo prikazanog istraživanja. Nijedan od osam PQ liganada primenjenih peroralno u dozi od 10 mg/kg ne dovodi do narušavanja motorne veštine kod pacova, što se procenjuje na osnovu vremena održavanja životinje na rotirajućem valjku (vretenu) rotarod aparata. Međutim, ligandi koji pripadaju jednoj strukturnoj grupi (subhemotipu) – PZ-II-029 i njegovi analozi DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3 primenjeni peroralno u dozi od 30 mg/kg – uspeavaju da antagonizuju diazepamom-indukovano oštećenje motorne koordinacije koje se manifestuje kao značajno smanjenje vremena održavanja na rotirajućem valjku. PZ-II-029 i strukturno slični analozi primenjeni zajedno sa diazepamom uspeavaju da to vreme povećaju do nivoa kontrolnih životinja. S druge strane, diazepamom-indukovanu motornu inkoordinaciju ne uspeavaju da preveniraju (antagonizuju) ligandi koji pripadaju drugom subhemotipu, LAU463 i dva analoga DK-I-58-1 i DK-II-58-1, kao ni DK-I-86-1 i DK-I-87-1, primenjeni u istoj dozi i istim putem kao PZ-II-029 i analozi. Kao što je uočeno u testu spontane lokomotorne aktivnosti (najizraženije u 10. eksperimentu), i ovde se vidi razdvajanje bioloških efekata u svetlu suptilnih strukturnih razlika između dva subhemotipa, tako da PZ-II-029 i strukturni analozi preveniraju ataksično dejstvo diazepama, za razliku od LAU 463 i strukturnih analoga, kao i DK-I-86-1 i DK-I-87-1.

5.4. Test gubitka refleksa uspravljanja

Procena gubitka refleksa uspravljanja postala je široko korišćeni laboratorijski standard za testiranje osetljivosti na hipnotičku i anestetičku aktivnost kod pacova, kao i više drugih vrsta,

uključujući miševе, zamorce, kuniće, ovce, pse (Smith, 1993; McCarren i sar., 2013). U našem eksperimentu procenjen je uticaj odabranih PQ liganda na diazepamom indukovani gubitak refleksa uspravljanja. Hipnotički/anestetički efekti diazepama nisu bili ni sprečeni niti potencirani PQ ligandima primenjenim intraperitonealno u dozi od 20 mg/kg. Nasuprot tome, hipolokomotorni efekat diazepama koji je praćen nakon oporavka od gubitka refleksa uspravljanja u testu spontane lokomotorne aktivnosti bio je preveniran ligandima PZ-II-029 i DK-I-60-3, za razliku od DK-I-58-1, DK-II-58-1 i DK-I-87-1 koji nisu uspeli da antagonizuju hipolokomotorni efekat diazepama. Stoga, i ovde je prisutna razlika u biološkim odgovorima dva subhemotipa koji su međusobno strukturno prilično slični. PZ-II-029 i analozi mogu smanjiti ataksiju kod životinja nakon buđenja, što nije slučaj sa LAU 463 i analogima, kao ni sa DK-I-87-1.

5.5. Pentilentetrazolski test

U pentilentetrazolskom testu, intraperitonealna primena dva odabrana PQ ligandada (DK-I-56-1 i DK-II-58-1 kao predstavnici dva subhemotipa) u dozi od 15 mg/kg nije uticala na protektivni antikonvulzivni efekat diazepama, niti je obezbedila bilo kakvu zaštitu od konvulzivnih napada izazvanih pentilentetrazolom. To znači da antikonvulzivni efekat diazepama ne izostaje u prisustvu pozitivnih modulatora $\alpha 6$ GABA_A receptora, kao i da u repertoaru farmakoloških efekata PQ ligandi ne poseduju inherentno antikonvulzivno dejstvo.

5.6. Baterija bihevioralnih eksperimenata na Wistar pacovima

Na osnovu prethodnih eksperimenata i dostupnih podataka, kao i zbog jednostavnije sinteze, $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA_AR-funkcionalno selektivni ligand DK-I-56-1 odabran je kao vodeće jedinjenje („*lead*“) za sledeće *in vivo* studije, iako su analozi RV-I-029 i DK-I-60-3 pokazali slično povećanje koncentracije u mozgu (C_{max}) kao DK-I-56-1, a u odnosu na polazni ligand PZ-II-029. Deuteracija metoksi grupe u D prstenu (DK-I-56-1) postignuta je kroz četiri koraka u sintezi, dok je deuteracija metoksi grupe A prstena (RV-I-029) zahtevala šest sintetičkih koraka. Za sintezu di-OCD₃ supstituisanog liganda DK-I-60-3 bilo je neophodno devet konvergentnih koraka, a to nije rezultiralo značajnim povećanjem bioraspoloživosti u odnosu na mono -OCD₃ supstituisani ligand DK-I-56-1 kojim bi se opravdali dodatni sintetički koraci potrebni za njegovo dobijanje (Knutson i sar., 2018). U skladu sa navedenim činjenicama, kroz bateriju bihevioralnih testova urađena je karakterizacija DK-I-56-1, koji je nakon toga testiran u animalnom modelu trigeminalne neuropatije. Takođe, za ligand DK-I-87-1 za koji je na osnovu elektrofizioloških podataka procenjeno da je pogodan da u *in vivo* eksperimentima bude negativna kontola, urađena je bihevioralna karakterizacija kroz bateriju testova.

Rezultati u uzdignutom plus lavirintu, testu jačine stiska i Morisovom vodenom lavirintu („*cued learning*“ protokol) bili su slični prethodnom nalazu u rotarodu. Naime, ligandi koji ostvaruju potencijaciju GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu ne izazivaju farmakološke efekte karakteristične za klasične benzodiazepine (sedacija, motorna inkoordinacija, miorelaksacija, anksiolitičko dejstvo). Razlika koja je otkrivena u Morisovom vodenom lavirintu, u prvom pokušaju plivanja, može da ukaže na suptilan uticaj DK-I-56-1 i DK-87-1 na ukupni pređeni put

do pronalska platforme, na koji se prividno razvila akutna tolerancija, tako je kroz preostale pokušaje plivanja uticaj tretmana u potpunosti iščezao.

5.7. Profilaktičko antinociceptivno dejstvo DK-I-56-1 u modelu hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca kod pacova

Ligatura kao hronična konstriktiona povreda infraorbitalne grane trigeminalnog nerva (IoN-CCI) ima za posledicu hiperreaktivnost na mehaničku stimulaciju kože životinja u predelu vibrisa (Hansson i Bouhassira, 2015) i predstavlja potvrđen model trigeminalnog neuropatskog bola (Deseure i Hans, 2015). Koristeći ovaj model, testirali smo hipotezu da pozitivni alosterični modulatori GABA_A receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu (Knutson et al., 2018) mogu sprečiti razvoj trigeminalnog neuropatskog bola. Konkretno, u modelu je testiran DK-I-56-1, jedinjenje odabrano kao „lead” na osnovu prethodno sprovedenih farmakokinetičkih i farmakodinamskih eksperimenata. Statistički značajne razlike koje su dobijene na nivou IoN-CCI grupe, između životinja intraperitonealno tretiranih sa DK-I-56-1 (10 mg/kg), odnosno placebo, 14. i 21. postoperativnog dana ukazuju na sposobnost PQ liganda da suzbije razvoj neuropatskog bola koji je povezan sa povredom grane trigeminalnog nerva, tokom primene terapije i sedam dana nakon prekida terapije. Međutim, 14 dana nakon primene terapije (28. postoperativni dan), antinociceptivni efekat DK-I-56-1 nije detektovan. Validnost modela trigeminalnog neuropatskog bola potvrđuju razlike koje su utvrđene između placebo tretiranih grupa (grupa gde je podvezan živac i grupa gde je pristupljeno živcu ali nije podvezan) 14., 21. i 28. postoperativnog dana.

Analogni rezultati utvrđeni su za selektivnog agonistu 5-HT_{1A} podtipa serotoninских receptora u sličnom IoN-CCI modelu (Deseure i sar., 2003). To bi značilo da efekti nemaju tendenciju da se održavaju duže vreme, već su uslovljeni nivoima leka u plazmi ili mozgu i nestaju nakon završetka primene tretmana i pada nivoa koncentracija u sistemske cirkulaciji i na mestu dejstva. Produženi efekat je, ipak, trajao izvesno vreme (sedam dana), ali treba napomenuti da je to verovatno vreme koje je bilo potrebno da se patološki proces razbukti nakon inicijalne supresije tretmanom. Profilaktičko antinociceptivno dejstvo DK-I-56-1 ispitivano je u uslovima ravnotežnog stanja (eng. *steady-state*) usled hroničnog trajanja lečenja. U tom smislu, ne očekuje se da je blaga hiperlokomocija utvrđena na Wistar pacovima i C57BL miševima, a koja predstavlja efekat DK-I-56-1 kao posledicu akutne, jednokratne primene i potencijalno odražava suptilno povećanje motivacionog podsticaja sa mogućnošću primene u lečenju depresivnih stanja (Bewernick, 2017), uticala na merenje ponašanja u ovom eksperimentu.

GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu najviše su proučavani u malom mozgu, gde je poznato da mogu biti lokalizovani sinaptički ($\alpha 6\beta 3\gamma 2$) i ekstrasinaptički ($\alpha 6\beta 3\gamma 2$ i $\alpha 6\beta 3\delta$) (Jechlinger i sar., 1998). Sa druge strane, važna lokalizacija GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu je i trigeminalni ganglion. Imunofluorescentne studije su utvrdile u eksperimentima na odraslim pacovima da 86%, 74% i 74% od svih malih, srednjih i velikih TG neurona, redom, eksperimentira $\alpha 6$ GABA_AR (Puri i sar., 2012). Na osnovu elektrofizioloških i farmakokinetičkih podataka, DK-I-56-1 ostvaruje selektivnost u efikasnosti aktivirajući $\alpha 6\beta 3\gamma 2$, $\alpha 6\beta 3\delta$ i $\alpha 6\beta 3$ GABA_AR u koncentracijama od 0,1 μ M i višim (Slika 8a). Selektivnost u efikasnosti se gubi tek pri koncentracijama većim od 1 μ M kada započinje blaga modulacija posredovana drugim podtipovima GABA_AR (Vasović i sar.,

2018). Dodatno, umerene vrednosti slobodnih koncentracija u mozgu (10-300 nM) doprinose očuvanju selektivnosti supstance DK-I-56-1.

U modelu trigeminalne neuropatije izazvane povredom infraorbitalnog živca dolazi do brzog generisanja akcionih potencijala od strane neurona trigeminalnog gangliona (Vos i sar., 1994). Poznato je da su ćelijska tela senzornih ganglija sisara, generalno, lišena sinaptičkih kontakata, međutim egzogena GABA može indukovati Cl⁻ struje u svim ispitivanim neuronima trigeminalnog gangliona. Dakle, svi GABA_AR prisutni na ćelijskim telima trigeminalnog gangliona su ekstrasinaptički (Hayasaki i sar., 2006). U trigeminalnom ganglionu, GABA-u sintetiše i oslobađa oko 70% svih neurona, ali se može akumulirati samo u njihovim okolnim satelitskim ćelijama. Pretpostavlja se da česti akcioni potencijali senzornih neurona dovode do povećanja ekstracelularne koncentracije K⁺ tokom repolarizacije, što može izazvati oslobađanje GABA-e iz satelitskih ćelija i/ili neurona, obezbeđujući na taj način inhibitornu povratnu informaciju senzornim neuronima (Hayasaki i sar., 2006). Posledična aktivacija GABA_AR koji sadrže α6 podjedinicu na ćelijskim telima neurona trigeminalnog gangliona verovatno smanjuje stvaranje akcionih potencijala ovih neurona, a samim tim i transdukciju stimulusa prema centralnim strukturama, tj. trigeminalnom *nucleus caudalis*-u (Karim i sar., 2013; Mortensen i sar., 2012).

DK-I-56-1 kao pozitivni alosterični modulator potencira efekat endogene GABA-e i time doprinosi značajnom smanjenju sinaptičke transmisije na odgovarajućim terminalima trigeminalnog *nucleus caudalis*-a čime se suzbija prenos bolnih stimulusa i percepcija bola.

Pošto trigeminalni ganglion ostvaruje veze sa periferijom, a takođe se projektuje i centralno, inhibicijom struktura na nivou trigeminalnog gangliona blokira se prenos informacija u njegovim putevima i projekcijama. Interesantno je napomenuti da je trigeminalni ganglion bogat lipidima, kao i da se nalazi izvan krvno-moždane barijere, tako da može biti mesto dejstva lekova nezavisno od sposobnosti da prođu krvno-moždanu barijeru (Eftekhari i sar., 2015). Ova činjenica je važna jer je u farmakokinetičkom eksperimentu određivanja slobodnih frakcija u plazmi i mozgu dobijeno da je u plazmi vrednost praktično 0%, dok se u mozgu dostižu značajne vrednosti slobodnih koncentracija. Međutim, ne može se isključiti mogućnost da se dodatna efikasnost može postići boljim pristupom CNS-u jer postoji mogućnost da su α6 GABA_AR kao mete za DK-I-56-1 lokalizovani više rostralno, na primer na sinaptičkim terminalima neurona trigeminalnog gangliona koji sadrže α6 podjedinicu u kičmenom trigeminalnom *nucleus caudalis*-u, ili bilo gde drugo u trigeminalnom putu bola, i na taj način u okviru krvno-moždane barijere (Shibuta i sar., 2012). Nezavisno od toga gde se nalaze receptori koji sadrže α6 podjedinicu i posreduju u efektima DK-I-56-1 u opisanom modelu trigeminalne neuropatije, očekuje se da će njegova farmakološki aktivna koncentracija na mestu dejstva biti u korelaciji sa koncentracijom u mozgu gde su izračunate slobodne koncentracije dovoljne da se ostvari dejstvo. Literaturni podaci pokazuju da nevezana frakcija u homogenatima moždanog tkiva nekoliko lekova male molekulske mase u velikoj meri korelira sa vrednostima u ganglijama dorzalnih rogova kičmene moždine, što se može uzeti kao surogat za situaciju u perifernom nervnom tkivu (Liu i sar., 2018).

5.8. Opšta diskusija

Sprovedeni testovi na glodarima sugerišu da psihomotorni neželjeni efekti, koji predstavljaju značajan klinički problem kod benzodiazepina i drugih lekova koji deluju na centralni nervni

sistem, nisu deo profila efekata na ponašanje deuterisanih PQ liganada koji poseduju funkcionalnu selektivnost za $\alpha 6$ GABA_AR (Knutson i sar., 2018; Tzeng i sar., 2021). Međutim, u eksperimentima koji su prikazani u ovom istraživanju otkriveni su zanimljivi rezultati za različite predstavnike hemotipa, kao što je blago hiperlokomotorno dejstvo kod C57BL miševa, čak i u prisustvu sedativnih doza diazepama. Ovakvi nalazi mogu implicirati postojanje strukturno zavisnih razlika u biološkoj aktivnosti među različitim predstavnicima nominalno homogenog hemotipa.

U okviru kontinuuma efekata diazepama koji su posledica potenciranja GABA-ergičke neurotransmisije, intenzivnije promene ponašanja, kao što su one koje se vide u rotarod i pentilentetrazolskom testu, a naročito u testu gubitka refleksa uspravljanja, zahtevaju veću okupiranost receptora molekulima leka na mestu delovanja (Burakt, 2022). U tom smislu, u različitim eksperimentalnim paradigmama koristili smo različite doze diazepama (3 mg/kg intraperitonealno u testu spontane lokomotorne aktivnosti, 5 mg/kg intraperitonealno u rotarod i pentilentetrazolskom testu i 30 mg/kg intravenski u testu gubitka refleksa uspravljanja). S druge strane, farmakološka i farmakokinetička karakterizacija PQ liganada uključivala je peroralne i intraperitonealne puteve primene, što su uobičajeni putevi primene u fazi otkrića lekova i pretkliničkim istraživanjima (Neervannan 2006), kao i određene varijacije u dozama i testiranim ligandima.

Poznato je da primena PQ liganada parenteralnim putem obezbeđuje nešto bržu i veću sistemsku izloženost u poređenju sa klinički poželjnim peroralnim putem primene. Stoga, umerena prilagođavanja doza ovih supstanci u različitim eksperimentalnim paradigmama urađena su sa ciljem dostizanja koncentracija u mozgu dovoljnih za ispoljavanje potencijalnih interakcija sa odgovarajućim bihevioralnim efektima diazepama (Sieghart i Savić, 2018; Burkat, 2022). Istovremeno, i uprkos očiglednom smanjenju metodološke potpunosti, etička ograničenja u istraživanju na životinjama, potreba za racionalnim i uravnoteženim skriningom novih jedinjenja, uz izbegavanje generisanja suvišnih podataka (Chalmers i sar., 2014), uticali su na sužen obim istraživanja (u smislu da svih 15 liganda koji su bili predmet ovog istraživanja nisu ispitani u svim testovima, već je pravljen određena selekcija).

U studijama interakcije, neki, ali ne svi, PQ ligandi su prevenirali ataksične efekte benzodiazepina, što je pokazano u rotarod testu i tokom praćenja životinja u testu spontane lokomotorne aktivnosti neposredno nakon oporavka od gubitka refleksa uspravljanja izazvanog intravenskom primenom diazepama. S tim u vezi, diskusija koja sledi ima za cilj da razjasni mehanizam anti-ataksičnog dejstva PZ-II-029 i njegovih deuterisanih analoga (DK-I, -56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3), kao i razloge zbog kojih nijedan od testiranih PQ liganada nije uticao na druge ispitivane farmakološke efekte diazepama na Sprague-Dawley pacovima.

Zanimljivo je da CGS 9895, jedan od PQ liganada deklarisan kao neutralni modulator visokog afiniteta za benzodiazepinsko mesto vezivanja i, pri višim koncentracijama, neselektivni pozitivni modulator na PQ mestu (Varagić i sar., 2013a; Varagić i sar., 2013b), različito antagonizuje efekte diazepama kod pacova, pri čemu je najefikasniji u antagonizmu ataksičnih efekata diazepama (Katzman i Shannon, 1985). Dakle, fenomen koji je utvrđen u ovoj studiji nije pomenut prvi put, već je poznat od ranije, a njegovo tumačenje bi povećalo razumevanje složene modulacione uloge GABA_AR kod pacova.

Kako su GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu neosetljivi na dejstvo diazepama, supstrat bilo kog bihejvioralnog efekta benzodiazepina povezan je sa pozitivnom modulacijom GABA_AR koji sadrže $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ili $\alpha 5$ podjedinicu u receptorskom kompleksu sa $\gamma 2$ podjedinicom. Jedino su GABA_AR takvog sastava osetljivi na dejstvo diazepama. Među njima, očekuje se da GABA_AR u čiji sastav ulazi $\alpha 1$ podjedinica daju najveći doprinos u ostvarivanju prethodno navedenih bihejvioralnih efekata diazepama, uz varijabilno učešće drugih podtipova receptora (Sieghart i Savić, 2018). S druge strane, poznato je da svih devet PQ liganda (PZ-II-029, DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3, DK-I-86-1, LAU463, DK-I-58-1, DK-II-58-1 i DK-I-87-1) čije su interakcije sa diazepamom ispitivane kroz bihejvioralne testove, poseduje visok do umereni afinitet za benzodiazepinsko mesto na svim GABA_AR koji sadrže α podjedinicu, a sve osim jednog (DK-I-87-1) karakteriše i selektivna pozitivna modulacija GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ posredstvom PQ mesta (Knutson i sar., 2018; Sieghart i sar., 2022).

Prema literaturnim podacima, između GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, koji su pretežno eksprimirani u malom mozgu, i motoričke koordinacije postoji prividno paradoksalan odnos. U rotarod testu, $\alpha 6$ *knock-out* miševi su bili značajno više motorno inkapacitirani dejstvom diazepama u poređenju sa miševima kod kojih je bio očuvan gen i eksperimentirana $\alpha 6$ podjedinica (*wild type* miševi), dok je efekat etanola bio sličan u obe kohorte miševa (Korpi i sar., 1999). To upućuje da neurotransmisija posredovana GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu ima tendenciju ispoljavanja protektivnog, anti-ataksičnog uticaja. S tim u vezi pretpostavlja se da je uočeni antagonizam ataksičnog efekta diazepama prvenstveno posledica agonističkog dejstva PQ liganda na GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, a ne antagonizma na benzodiazepinskom mestu određenih podtipova GABA_AR.

Farmakokinetički rezultati sugerišu da su slobodne koncentracije PQ liganada u mozgu koje se mogu dobiti u dozama koje su korišćene u prethodno opisanim esperimentima do 300 nM. Svih osam jedinjenja, iz dve strukturne grupe: PZ-II-029 i analozi i LAU463 i analozi, pozitivno modulišu $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptore pri koncentracijama ispod 1 μ M (Slike 5a, 6a, 7a, 8a i 9). Međutim, samo PZ-II-029 (Slika 5b) i DK-I-56-1 (Slika 8a) se mogu posmatrati kao pozitivni modulatori $\alpha 6\beta \delta$ receptora pri koncentracijama nižim od 1 μ M, dok su DK-I-86-1 (Slika 7b), DK-I-87-1 (Slika 8b) i LAU463 (Slika 6b) bili praktično neutralni na ovom receptorskom kompleksu pri takvim koncentracijama (podaci za druga PQ jedinjenja nedostaju). Analiza rezultata ponašanja dobijenih u eksperimentima sa PQ ligandima izvršena je u svetlu ovih, naizgled suptilnih, razlika u odgovarajućim primarnim farmakološkim profilima (Slika 11). Prema strukturnoj homologiji sa PZ-II-029 i DK-I-56-1, očekuje se da su RV-I-029 i DK-I-60-3, takođe, aktivni na $\alpha 6\beta \delta$ GABA_AR pored $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptora. Zaista, ova četiri liganda su pokazala izražen anti-ataksični efekat u rotarod testu, a takođe, sličan efekat primećen je kod PZ-II-029 i DK-I-60-3 tokom praćenja lokomotorne aktivnosti pacova nakon oporavka od gubitka refleksa ispravljanja. Postoje genetski dokazi za specifičnu vezu između $\alpha 6$ i δ podjedinica u granularnim ćelijama malog mozga, sa post-translacijskim gubitkom δ podjedinice kod $\alpha 6$ *knock-out* miševa (Jones i sar., 1997). Kao što je diskutovano u Sieghart i sar. (2022), $\alpha 6\beta \delta$ i $\alpha 1\alpha 6\beta \delta$ receptori su lokalizovani ekstrasinaptički, posreduju u toničkoj inhibiciji, a GABA ih aktivira sa izuzetno velikom potentnošću. Imajući u vidu tako složenu vezu između dve podjedinice, čak i niska do umerena pozitivna modulacija izazvana PZ-II-029 i njegovim deuterisanim analogima na GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ i δ podjedinice,

kao što je ilustrovano na Slici 11, može presudno doprineti prevenciji ataksičnog dejstva diazepama kod pacova.

Dostupni podaci o afinitetu i efikasnosti sugerišu da su svi testirani PQ ligandi neutralni modulatori, odnosno antagonisti na benzodiazepinskom mestu GABA_AR-a (Knutson i sar., 2018). U *in vitro* eksperimentima je pokazano da su tri PQ liganda (označavaju se kao supstanca 3 (CGS 9895), supstanca 11 i supstanca 30), koji deluju kao niskoafinitetni, neselektivni pozitivni alosterični modulatori na PQ mestu, u stanju da potpuno inhibiraju efekte rastućih koncentracija diazepama na $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ receptorima, kada se primene u niskoj koncentraciji (50 nM) koja je dovoljna da potpuno zasiti mesto vezivanja benzodiazepina, ali nedovoljna da stimuliše GABA-indukovanu struju posredstvom PQ mesta (Ramerstorfer i sar., 2011; Varagić i sar., 2013b). Tek pri većim koncentracijama uspevaju da ostvare potencijaciju GABA_AR posredstvom $\alpha 1+\beta 3$ - vezivnog mesta.

Stoga se postavlja pitanje zašto PQ ligandi nisu ostvarili antagonistički efekat svih diazepamskih efekata ispitivanih kroz *in vivo* testove (sedativni efekat na Sprague-Dawley pacovima u SLA testu; hipnotički/anestetički efekat u testu gubitka refleksa uspravljanja i antikonvulzivni efekat u pentilentetrazolskom testu). Postoje dva moguća objašnjenja, koja se međusobno ne isključuju. Prvo, antagonističko dejstvo na benzodiazepinskom mestu vezivanja u bihejvioralnim testovima može biti maskirano istovremenim agonističkim dejstvom na GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu. Međutim, nisu otkriveni nikakvi direktni bihejvioralni efekti koji se mogu pripisati GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu (osim onih koji su vezani za kontrolu ataksije), barem ne u prezentovanim eksperimentima sprovedenim na pacovima. Kao što je već napomenuto, treba imati na umu i mogućnost da je relativna uloga GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u regulaciji motoričkih funkcija sveobuhvatnija i istaknutija kod miševa nego kod pacova, ali u tom smeru su potrebna dodatna istraživanja. Druga mogućnost je da antagonističko dejstvo PQ liganada na benzodiazepinskom mestu GABA_AR ometa istovremeno vezivanje liganda i za PQ mesto koje je prisutno na istom receptorskom agregatu, i obrnuto. Pretpostavili smo da bi se to moglo dogoditi pri slobodnim koncentracijama PQ liganada u mozgu koje mogu biti dostignute dozama koje su primenjene u našim ogleđima. Te koncentracije su verovatno 5-6 puta veće od onih koje su korišćene u *in vitro* studijama interakcije tri PQ liganda sa diazepamom (Ramerstorfer i sar., 2011; Varagić i sar., 2013b). Vezivanje PQ liganda za PQ mesto ($\alpha+\beta$ -međupovršina) verovatno uzrokuje neku vrstu konformacione promene i/ili sterne smetnje što može sprečiti efikasno vezivanje drugog PQ molekula za susedno benzodiazepinsko mesto ($\alpha+\gamma 2$ - međupovršina), a što je neophodno da bi se sprečili (antagonizovali) bihejvioralni efekti diazepama.

Važno je napomenuti da, osim što ne može da se meri afinitet (zbog nedostatka liganada sa specifičnim vezivanjem), ne može se proceniti ni potentnost PQ liganada za PQ mesto GABA_AR koji ne sadrže $\alpha 6$ (zbog nedostatka aktivnosti na tim receptorima). Stoga bi eksperimentalna verifikacija predloženih interakcija između dva liganda na dva mesta vezivanja unutar istog receptora bila praktično nemoguća, čak i ako se ne uzimaju u obzir složenosti ćelijske i regionalne lokacije receptora (Sieghart i sar., 2022). Osim toga, elektrofiziološki profil flumazenila uključuje značajnu pozitivnu modulaciju $\alpha 2\beta 3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$, $\alpha 4\beta 3\gamma 2$ i $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABA_AR već pri koncentraciji od 100 nM (Ramerstorfer i sar., 2010) tako da se ovaj klinički korišćen antagonist na benzodiazepinskom mestu ne može koristiti za eksperimentalnu potvrdu predloženih interakcija na GABA_AR.

Svaki pokušaj modelovanja molekularne interakcije na nivou GABA_AR postaje još složeniji ako se uzme u obzir da u svakom trenutku GABA može da zauzima nijedno, jedno ili dva mesta vezivanja na svom receptoru. Kao što je diskutovano u Sieghart i Savić (2018), interakcija bilo kog liganda sa receptorom na kome su zauzeta oba vezna mesta za GABA-u može izazvati konformacionu promenu različitu od one sa samo jednim zauzetim mestom, što otvara mogućnost da obim i smer alosterne modulacije dodatno mogu da zavise od prisutne koncentracije GABA-e. Na kraju, dobro je podsetiti se da ligandi koji deluju posredstvom benzodiazepinskog mesta ne utiču samo na struju hlorida. Njihova modulacija GABA-ergičke signalizacije takođe uključuje sporije procese, kao što su promene difuzije i grupisanja GABA_AR-a. Naime, pun agonista benzodiazepinskog mesta, diazepam, u stanju niske neuronske aktivnosti ostvaruje mali efekat na pomenute sporije procese, međutim, nakon kontinuirane neuronske aktivnosti, smanjuje bočnu difuziju i povećava sinaptičku stabilnost i grupisanje GABA_AR, što za posledicu ima povećanu snagu inhibitorskih sinapsi (Lévi i sar., 2015). Svi navedeni aspekti predstavljaju značajne prepreke za molekularno razjašnjavanje *in vivo* otkrivene interakcije između diazepama, PQ liganda i GABA_AR.

Prikazana analiza dobijenih rezultata navodi na zaključak da bihejvioralni efekti različitih PQ liganada u interakciji sa diazepamom zavise od njihove pozitivne modulacije GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu. Pošto selektivni i sistemski aktivni antagonisti na ovim populacijama receptora još uvek nisu poznati (Sieghart i Savić, 2018), ova hipoteza bi se mogla dalje razjasniti kroz eksperimente smanjenja ekspresije posredstvom male interferirajuće RNK (eng. *small interfering* RNK, siRNK) $\alpha 6$ podjedinice na pacovima. Takođe, dodatne studije koje procenjuju druge domene ponašanja, kao što su nivo anksioznosti i kognitivne performanse, dopunile bi ukupan profil interakcija ispitivanih PQ liganada i benzodiazepina. Konačno, testiranje većih doza i detaljna procena bihejvioralne aktivnosti otkrivenih metabolita (Knutson i sar., 2018) doprineli bi daljem razjašnjavanju farmakoloških i toksikoloških svojstva PQ liganada.

Naši rezultati pokazuju da su odabrani PQ ligandi u stanju da spreče ataksične efekte diazepama, a da nemaju uticaja na druge, istaknute psihomotorne ili antikonvulzivne efekte ovog benzodiazepina. To znači da su PZ-II-029 i njegovi deuterisani analozi (DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3), kao potencijalni budući lekovi za brojne neuropsihijatrijske bolesti, lišeni bilo kakvog potencijala za akutne neželjene interakcije sa istovremeno primenjenim benzodiazepinima. S druge strane, mogu u potpunosti da spreče njihovo ataksično dejstvo, uočeno u terapijskim, a posebno toksičnim koncentracijama (Friedman, 2020). S tim u vezi, literatura navodi primere lekova koji takođe deluju na noviu CNS-a i GABA_AR, a ne stupaju u neželjene interakcije sa benzodiazepinima. Antikonvulziv stiripentol predstavlja dodatni lek kod teškog oblika mioklonične epilepsije kod dece, i uobičajeo se koristi zajedno sa benzodiazepinima. Stiripentol ima više mehanizama dejstva, a između ostalog, potencira funkciju GABA_AR i usporava aktivnost enzima iz grupe citohroma P450 čime smanjuje razgradnju drugog leka sa kojim se u kombinaciji primenjuje (Fisher, 2011). Slično se može sagledati odnosu između PQ liganada i benzodiazepina. Neželjena reakcija kao posledica konkomitantne primene nije utvrđena, a interakcija koja za posledicu ima prevenciju ataksije, itekako može biti terapijski poželjna. Ipak, priroda i intenzitet interakcija između PQ liganada i benzodiazepina u uslovima dugotrajne primene nisu jasni, i ostaju da budu rasvetljeni.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati prikazane doktorske disertacije su pružili značajan doprinos u dobijanju podataka vezanih za bazičnu farmakološku (farmakokinetičku i farmakodinamsku) karakterizaciju PQ jedinjenja kao pozitivnih alosternih modulatora GABA_AR koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, a koji su identifikovani kao „hit” jedinjenja u prvoj fazi u otkriću novih lekova. Nakon bazične karakterizacije, sprovedena su bihevioralna istraživanja u kojima je analizirana interakcija odabranih PQ liganada sa diazepamom, široko korišćenim benzodiazepinskim modulatorom $\alpha 1/\alpha 2/\alpha 3/\alpha 5$ i $\gamma 2$ -sadržućih GABA_AR. U finalno sprovedenom eksperimentu, ispitano je profilaktičko antinociceptivno dejstvo DK-I-56-1, supstance koja je identifikovana kao „lead” jedinjenje, u animalnom modelu trigeminalne neuropatije.

U skladu sa prethodno istaknutim, rezultati eksperimenata navode na sledeće zaključke:

1. Analiza farmakokinetičkih profila i parametara nakon intraperitonealne, intravenske ili peroralne primene deuterisanih, fluorovanih i/ili nitrogenovanih analoga polaznih jedinjenja (PZ-II-029 i LAU463) ukazuje da se deuteracijom dobijaju ligandi sa značajno unapređenim farmakokinetikim ponašanjem u plazmi i mozgu nakon sva tri puta primene, pri čemu izloženost organa za izlučivanje (jetra i bubreg) ostaje približno ista onoj koju ostvaruju polazni ligandi. Nitrogenovanje D prstena doprinosi promeni lipofilnosti strukture, pa je uticaj na farmakokinetiku malo složeniji u slučaju DK-I-86-1, dok je kod DK-II-58-1 rezultovalo dodatnim unapređenjem farmakokinetičkih parametara u poređenju sa sličnim jedinjenjem bez atoma azota u D prstenu (DK-I-58-1). Fluorovani analozi pokazuju izrazito povećanje nivoa u organima za izlučivanje, a s obzirom da imaju izvestan potencijal citotoksičnosti, gube bilo kakvu prednost nad deuterisanim supstancama. Što se tiče uticaja formulacije (suspenzija, rastvor i nanoemulzija) na farmakokinetiku PQ liganada koji su inače vrlo ograničene rastvorljivosti, pokazano je da su suspenzija i nanoemulzija kao biokompatibilni sistemi sasvim prihvatljive i bez jasnih nedostataka u odnosu na rastvor kao homogen sistem.
2. U testovima bazične bihevioralne karakterizacije pokazano je da PQ ligandi potencijacijom $\alpha 6$ GABA_A receptora ne izazivaju farmakološke efekte karakteristične za klasične benzodiazepine (sedacija, hipnotičko/anestetičko dejstvo, motorna inkoordinacija, miorelaksacija, anksiolitičko, antikonvulzivno i anterogradno-amnezijsko dejstvo).
3. U eksperimentima ispitivanja interakcije sa predstavnikom referentnih benzodiazepina, odabrani PQ ligandi bili su u stanju da spreče ataksične efekte diazepama, bez uticaja na druge istaknute psihomotorne ili antikonvulzivne efekte ovog benzodiazepina. To znači da su PZ-II-029 i njegovi deuterisani analozi (DK-I-56-1, RV-I-029 i DK-I-60-3), kao potencijalni lekovi za brojne neuropsihijatrijske bolesti, lišeni bilo kakvog potencijala za akutne neželjene interakcije sa istovremeno primenjenim benzodiazepinima. S druge strane, mogu u potpunosti da spreče njihovo ataksično dejstvo. Ipak, priroda i intenzitet interakcija između PQ liganada i benzodiazepina u uslovima dugotrajne primene tek treba da budu rasvetljeni.
4. Odabrana kao „lead” jedinjenje, supstanca DK-I-56-1 je u modelu hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca ostvarila profilaktičko antinociceptivno dejstvo nakon ponavljane primene koja je trajala 14 dana počev od prvog dana nakon operacije. Pretpostavljeni mehanizam je pozitivna alosterna modulacija $\alpha 6$ -sadržućih GABA_AR, verovatno smeštenih na

sinaptičkim terminalima neurona trigeminalnog gangliona u trigeminalnom *nucleus caudalis*-u.

Rezultati ove disertacije su umnogome doprineli da supstanca DK-I-56-1 stigne do prekliničkih ispitivanja, i na taj način započne svoj razvoj kroz regulatorne studije. Do sada, toksikološke studije su pokazale negativne rezultate u Ames-ovom testu koji ispituje mutageni potencijal i mikronukleusnom testu genotoksičnosti. Ovo je važna propusnica za dalji razvoj ovog prospektivnog leka.

7. LITERATURA

Agrawal J, Dwivedi Y. GABAA Receptor Subunit Transcriptional Regulation, Expression Organization, and Mediated Calmodulin Signaling in Prefrontal Cortex of Rats Showing Testosterone-Mediated Impulsive Behavior. *Front Neurosci.* 2020 Nov 6;14:600099. 10.3389/fnins.2020.600099

Akinci MK, Schofield PR. Widespread expression of GABA(A) receptor subunits in peripheral tissues. *Neurosci Res.* 1999 Nov;35(2):145-53. 10.1016/s0168-0102(99)00078-4

Andronis C, Silva JP, Lekka E, Virvilis V, Carmo H, Bampali K, Ernst M, Hu Y, Loryan I, Richard J, Carvalho F, Savić MM. Molecular basis of mood and cognitive adverse events elucidated via a combination of pharmacovigilance data mining and functional enrichment analysis. *Arch Toxicol.* 2020 Aug;94(8):2829-2845. doi: 10.1007/s00204-020-02788-1.

Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol.* 2009 Jun 12;9 Suppl 1(Suppl 1):S3. doi: 10.1186/1471-2377-9-S1-S3. 10.1186/1471-2377-9-S1-S3

Baumann SW, Baur R, Sigel E. Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABAA receptors. Insight into the absolute arrangement. *J Biol Chem.* 2002 Nov 29;277(48):46020-5. doi: 10.1074/jbc.M207663200.

Belzung C. Measuring rodent exploratory behavior. In: Crusio WE, Gerlai RT, editors. *Handbook of molecular-genetic techniques for brain and behavior research.* Elsevier Science BV, Amsterdam, 1999. pp. 738–49.

Bereiter DA, Hirata H, Hu JW. Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn. *Pain.* 2000 Dec 1;88(3):221-224. doi: 10.1016/S0304-3959(00)00434-6.

Bewernick BH, Urbach AS, Bröder A, Kayser S, Schlaepfer TE. Walking away from depression-motor activity increases ratings of mood and incentive drive in patients with major depression. *Psychiatry Res.* 2017 Jan;247:68-72. doi: 10.1016/j.psychres.2016.09.009.

Blanksby SJ, Ellison GB. Bond dissociation energies of organic molecules. *Acc Chem Res.* 2003 Apr;36(4):255-63. doi: 10.1021/ar020230d.

Blass, B. E. (2015). *Basic principles of drug discovery and development.* Elsevier.

Braat S, Kooy RF. The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron.* 2015 Jun 3;86(5):1119-30. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.042.

Burkat PM. Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling of Diazepam: Unbound Interstitial Brain Concentrations Correspond to Clinical End Points. *J Clin Pharmacol.* 2022 May 9. doi: 10.1002/jcph.2071.

Burt DR. Reducing GABA receptors. *Life Sci.* 2003 Aug 22;73(14):1741-58. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00505-8.

Buteau K.C. (2009) Deuterated drugs: Unexpectedly nonobvious? *J. High Tech. L.* 22.

Campos ML, de Cabo C, Wisden W, Juiz JM, Merlo D. Expression of GABA(A) receptor subunits in rat brainstem auditory pathways: cochlear nuclei, superior olivary complex and nucleus of the lateral lemniscus. *Neuroscience.* 2001;102(3):625-38. 10.1016/s0306-4522(00)00525-x

Chalmers I, Bracken MB, Djulbegovic B, Garattini S, Grant J, Gülmezoglu AM, Howells DW, Ioannidis JP, Oliver S. How to increase value and reduce waste when research priorities are set. *Lancet.* 2014 Jan 11;383(9912):156-65. doi: 10.1016/S0140-6 6736(13)62229-1.

Chiou LC, Lee HJ, Ernst M, Huang WJ, Chou JF, Chen HL, Mouri A, Chen LC, Treven M, Mamiya T, Fan PC, Knutson DE, Witzigmann C, Cook J, Sieghart W, Nabeshima T. Cerebellar $\alpha 6$ -subunit-containing GABAA receptors: a novel therapeutic target for disrupted prepulse inhibition in neuropsychiatric disorders. *Br J Pharmacol.* 2018 Jun;175(12):2414-2427. doi: 10.1111/bph.14198.

Chua HC, Chebib M. Chapter One – GABAA Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. *Adv. Pharmacol.* 2017;79:1–34. doi: 10.1016/bs.apha.2017.03.003.

Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994 Sep;49(1):171-6. doi: 10.1016/0091-3057(94)90472-3.

Czarnik AW. Deuterium-enriched bupropion. US8524780; 2013. Czarnik AW. Deuterium-enriched bupropion. US8524780; 2013.

D'Angelo E, Solinas S, Mapelli J, Gandolfi D, Mapelli L, Prestori F. The cerebellar Golgi cell and spatiotemporal organization of granular layer activity. *Front Neural Circuits.* 2013 May 17;7:93. doi: 10.3389/fncir.2013.00093.

Deseure K, Hans GH. Chronic Constriction Injury of the Rat's Infraorbital Nerve (IoN-CCI) to Study Trigeminal Neuropathic Pain. *J Vis Exp.* 2015 Sep 21;(103):53167. doi: 10.3791/53167.

Deseure K, Koek W, Adriaensen H, Colpaert FC. Continuous administration of the 5-hydroxytryptamine_{1A} agonist (3-Chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[(5-methyl-pyridin-2-ylmethyl) -amino]-methyl]piperidin-1-yl]-methadone (F 13640) attenuates allodynia-like behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Aug;306(2):505-14. doi: 10.1124/jpet.103.050286.

D'Mello AM, Crocetti D, Mostofsky SH, Stoodley CJ. Cerebellar gray matter and lobular volumes correlate with core autism symptoms. *Neuroimage Clin.* 2015 Feb 20;7:631-9. doi: 10.1016/j.nicl.2015.02.007.

Dorđević SM, Cekić ND, Savić MM, Isailović TM, Randelović DV, Marković BD, Savić SR, Timić Stamenić T, Daniels R, Savić SD. Parenteral nanoemulsions as promising carriers for brain delivery of risperidone: Design, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation. *Int J Pharm.* 2015 Sep 30;493(1-2):40-54. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.07.007.

Dorđević, S. M., Cekić, N. D. C., Isailović, T. M., Milić, J. R., Vuleta, G. M., Lazić, M. L., & Savić, S. D. (2013). Nanoemulzije dobijene variranjem ti pa emulgatora i udela masne faze: Uticaj formulacije i procesnih parametara na karakteristike i fizičku stabilnost. *Chemical Industry/Hemijaska Industrija*, 67(5).

DUNHAM NW, MIYA TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* 1957 Mar;46(3):208-9. doi: 10.1002/jps.3030460322.

Eftekhari S, Salvatore CA, Johansson S, Chen TB, Zeng Z, Edvinsson L. Localization of CGRP, CGRP receptor, PACAP and glutamate in trigeminal ganglion. Relation to the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2015 Mar 10;1600:93-109. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.031.

Ettrup A, Hansen M, Santini MA, Paine J, Gillings N, Palner M, Lehel S, Herth MM, Madsen J, Kristensen J, Begtrup M, Knudsen GM. Radiosynthesis and in vivo evaluation of a series of substituted ¹¹C-phenethylamines as 5-HT (2A) agonist PET tracers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011 Apr;38(4):681-93. doi: 10.1007/s00259-010-1686-8.

Fisher JL. Interactions between modulators of the GABA(A) receptor: Stiripentol and benzodiazepines. *Eur J Pharmacol.* 2011 Mar 5;654(2):160-5. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.12.037.

Foster, A.B. 1985. Deuterium isotope effects in the metabolism of drugs and xenobiotics: implications for drug design. *Adv. Drug Res.* 14: 1–40.

Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci.* 2008 May;9(5):370-86. doi: 10.1038/nrn2372.

Friedman JH. Movement disorders induced by psychiatric drugs that do not block dopamine receptors. *Parkinsonism Relat Disord.* 2020 Oct;79:60-64. doi: 10.1002/1531-8257(199905)14:3<484::aid-mds1016>3.0.co;2-b.

Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer.* 2001 Sep;37(13):1590-8. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00171-x.

Gillis EP, Eastman KJ, Hill MD, Donnelly DJ, Meanwell NA. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J Med Chem.* 2015 Nov 12;58(21):8315-59. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00258.

Gilron I, Bailey JM, Tu D, Holden RR, Weaver DF, Houlden RL. Morphine, gabapentin, or their combination for neuropathic pain. *N Engl J Med*. 2005 Mar 31;352(13):1324-34. doi: 10.1056/NEJMoa042580.

Gutiérrez A, Khan ZU, De Blas AL. Immunocytochemical localization of the alpha 6 subunit of the gamma-aminobutyric acidA receptor in the rat nervous system. *J Comp Neurol*. 1996 Feb 12;365(3):504-10. 10.1002/(SICI)1096-9861(19960212)365:3<504::AID-CNE12>3.0.CO;2-Q.

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 Aug;12(6):804-13. doi: 10.1016/j.ejpain.2007.12.010.

Hansson P, Bouhassira D. Failures of translational pain research: can they be due to misinterpretation of pain-related nomenclature? *Eur J Pain*. 2015 Feb;19(2):147-9. doi: 10.1002/ejp.643.

Harbeson, S. L., & Tung, R. D. (2014). Deuterium medicinal chemistry: a new approach to drug discovery and development. *MedChem News*, 24(2), 8-22. 10.14894/medchem.24.2_8

Haviv Y, Zadik Y, Sharav Y, Benoliel R. Painful traumatic trigeminal neuropathy: an open study on the pharmacotherapeutic response to stepped treatment. *J Oral Facial Pain Headache*. 2014 Winter;28(1):52-60. doi: 10.11607/jop.1154.

Hayasaki H, Sohma Y, Kanbara K, Maemura K, Kubota T, Watanabe M. A local GABAergic system within rat trigeminal ganglion cells. *Eur J Neurosci*. 2006 Feb;23(3):745-57. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04602.x.

Henry BL, Minassian A, Young JW, Paulus MP, Geyer MA, Perry W. Cross-species assessments of motor and exploratory behavior related to bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Jul;34(8):1296-306. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.04.002.

Iwata K, Imamura Y, Honda K, Shinoda M. Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. *Int Rev Neurobiol*. 2011;97:227-50. doi: 10.1016/B978-0-12-385198-7.00009-6.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Da Silva WC, Medina JH, Cammarota M. The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. *Neurotox Res*. 2006 Oct;10(2):113-21. doi: 10.1007/BF03033240.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*. 1999 Aug;103(1):1-11. doi: 10.1016/s0166-4328(99)00036-4.

Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci*. 2008 May;9(5):331-43. doi: 10.1038/nrn2370.

Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol*. 2011 Feb;25(1):1-28. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x.

Jechlinger M, Pelz R, Tretter V, Klausberger T, Sieghart W. Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABAA receptors containing alpha6 subunits. *J Neurosci*. 1998 Apr 1;18(7):2449-57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-07-02449.1998.

Jin Y, Korol SV, Jin Z, Barg S, Birnir B. In intact islets interstitial GABA activates GABA(A) receptors that generate tonic currents in α -cells. *PLoS One*. 2013 Jun 24;8(6):e67228. 10.1371/journal.pone.0067228

Johannessen SI, Landmark CJ. Antiepileptic drug interactions - principles and clinical implications. *Curr Neuropharmacol*. 2010 Sep;8(3):254-67. doi: 10.2174/157015910792246254.

Johnson BM, Shu YZ, Zhuo X, Meanwell NA. Metabolic and Pharmaceutical Aspects of Fluorinated Compounds. *J Med Chem*. 2020 Jun 25;63(12):6315-6386. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01877.

Jones A, Korpi ER, McKernan RM, Pelz R, Nusser Z, Mäkelä R, Mellor JR, Pollard S, Bahn S, Stephenson FA, Randall AD, Sieghart W, Somogyi P, Smith AJ, Wisden W. Ligand-gated ion channel subunit partnerships: GABAA receptor alpha6 subunit gene inactivation inhibits delta subunit expression. *J Neurosci*. 1997 Feb 15;17(4):1350-62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-04-01350.1997.

Kalvass JC, Maurer TS. Influence of nonspecific brain and plasma binding on CNS exposure: implications for rational drug discovery. *Biopharm Drug Dispos*. 2002 Nov;23(8):327-38. doi: 10.1002/bdd.325.

Karim N, Wellendorph P, Absalom N, Johnston GA, Hanrahan JR, Chebib M. Potency of GABA at human recombinant GABA(A) receptors expressed in *Xenopus* oocytes: a mini review. *Amino Acids*. 2013 Apr;44(4):1139-49. doi: 10.1007/s00726-012-1456-y.

Katz, J.J. 1965. Chemical and biological studies with deuterium. 9th Annual Priestly Lecture, Pennsylvania State University, University Park, Pa. pp. 1-110.

Katzman NJ, Shannon HE. Differential diazepam-antagonist effects of the benzodiazepine receptor ligand CGS 9895 in rodents. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985 Dec;235(3):589-95. PMID: 3001268

Klang V, Matsko NB, Valenta C, Hofer F. Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron*. 2012 Feb;43(2-3):85-103. doi: 10.1016/j.micron.2011.07.014.

Knutson DE, Kodali R, Divović B, Treven M, Stephen MR, Zahn NM, Dobričić V, Huber AT, Meirelles MA, Verma RS, Wimmer L, Witzigmann C, Arnold LA, Chiou LC, Ernst M,

Mihovilovic MD, Savić MM, Sieghart W, Cook JM. Design and Synthesis of Novel Deuterated Ligands Functionally Selective for the γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor (GABAAR) $\alpha 6$ Subtype with Improved Metabolic Stability and Enhanced Bioavailability. *J Med Chem.* 2018 Mar 22;61(6):2422-2446. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01664.

Korpi ER, Gründer G, Lüddens H. Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol.* 2002 Jun;67(2):113-59. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00013-8.

Korpi ER, Koikkalainen P, Vekovischeva OY, Mäkelä R, Kleinz R, Uusi-Oukari M, Wisden W. Cerebellar granule-cell-specific GABAA receptors attenuate benzodiazepine-induced ataxia: evidence from alpha 6-subunit-deficient mice. *Eur J Neurosci.* 1999 Jan;11(1):233-40. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00421.x.

Kovačević J, Timić T, Tiruveedhula VV, Batinić B, Namjoshi OA, Milić M, Joksimović S, Cook JM, Savić MM. Duration of treatment and activation of $\alpha 1$ -containing GABAA receptors variably affect the level of anxiety and seizure susceptibility after diazepam withdrawal in rats. *Brain Res Bull.* 2014 May;104:1-6. doi: 10.1016/j.brainresbull.2014.03.002.

Kramer PR, Bellinger LL. Reduced GABAA receptor $\alpha 6$ expression in the trigeminal ganglion enhanced myofascial nociceptive response. *Neuroscience.* 2013 Aug 15;245:1-11. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.003

Leggio GM, Torrisi SA, Castorina A, Platania CB, Impellizzeri AA, Fidilio A, Caraci F, Bucolo C, Drago F, Salomone S. Dopamine D3 receptor-dependent changes in alpha6 GABAA subunit expression in striatum modulate anxiety-like behaviour: Responsiveness and tolerance to diazepam. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015 Sep;25(9):1427-36. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.11.004

Lévi S, Le Roux N, Eugène E, Poncer JC. Benzodiazepine ligands rapidly influence GABAA receptor diffusion and clustering at hippocampal inhibitory synapses. *Neuropharmacology.* 2015 Jan;88:199-208. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.002.

Licata SC, Platt DM, Cook JM, Van Linn ML, Rowlett JK. Contribution of alpha1 subunit-containing gamma-aminobutyric acidA (GABAA) receptors to motor-impairing effects of benzodiazepines in squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl).* 2009 Apr;203(3):539-46. doi: 10.1007/s00213-008-1401-7.

Liu H, Chen Y, Huang L, Sun X, Fu T, Wu S, Zhu X, Zhen W, Liu J, Lu G, Cai W, Yang T, Zhang W, Yu X, Wan Z, Wang J, Summerfield SG, Dong K, Terstappen GC. Drug Distribution into Peripheral Nerve. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018 May;365(2):336-345. doi: 10.1124/jpet.117.245613.

Löscher W, Schmidt D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res.* 1988 May-Jun;2(3):145-81. doi: 10.1016/0920-1211(88)90054-x.

Löscher W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *Eur J Pharmacol.* 2009 May 21;610(1-3):1-11. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.03.025.

Maconochie DJ, Zempel JM, Steinbach JH. How quickly can GABAA receptors open? *Neuron.* 1994 Jan;12(1):61-71. doi: 10.1016/0896-6273(94)90152-x.

Mandhane SN, Aavula K, Rajamannar T. Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure.* 2007 Oct;16(7):636-44. doi: 10.1016/j.seizure.2007.05.005.

Mapelli L, Pagani M, Garrido JA, D'Angelo E. Integrated plasticity at inhibitory and excitatory synapses in the cerebellar circuit. *Front Cell Neurosci.* 2015 May 5;9:169. doi: 10.3389/fncel.2015.00169.

Mapelli L, Solinas S, D'Angelo E. Integration and regulation of glomerular inhibition in the cerebellar granular layer circuit. *Front Cell Neurosci.* 2014 Feb 25;8:55. doi: 10.3389/fncel.2014.00055.

Matougui N, Boge L, Groo AC, Umerska A, Ringstad L, Bysell H, Saulnier P. Lipid-based nanoformulations for peptide delivery. *Int J Pharm.* 2016 Apr 11;502(1-2):80-97. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.019

Maurissen JP, Marable BR, Andrus AK, Stebbins KE. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicol Teratol.* 2003 Sep-Oct;25(5):543-53. doi: 10.1016/s0892-0362(03)00073-4.

McCarren HS, Moore JT, Kelz MB. Assessing changes in volatile general anesthetic sensitivity of mice after local or systemic pharmacological intervention. *J Vis Exp.* 2013 Oct 16;(80):e51079. doi: 10.3791/51079.

McClements, David Julian. "Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities." *Soft matter* 8.6 (2012): 1719-1729.

Meanwell NA. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *J Med Chem.* 2018 Jul 26;61(14):5822-5880. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01788.

Mendu SK, Akesson L, Jin Z, Edlund A, Cilio C, Lernmark A, Birnir B. Increased GABA(A) channel subunits expression in CD8(+) but not in CD4(+) T cells in BB rats developing diabetes compared to their congenic littermates. *Mol Immunol.* 2011 Jan;48(4):399-407. doi: 10.1016/j.molimm.2010.08.005

Merenick, D., Jessel, A., Ganshorn, H. & Pang, D. S. J. (2022). Consistency in Applying the Loss of Righting Reflex to Assess Unconsciousness during Induction of General Anesthesia in Rats and Mice: A Systematic Review Protocol.

Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT. A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol.* 1979 Fall;1(3):233-6. PMID: 551317

Milić M, Divljaković J, Rallapalli S, van Linn ML, Timić T, Cook JM, Savić MM. The role of $\alpha 1$ and $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rats. *Behav Pharmacol.* 2012 Apr;23(2):191-7. doi: 10.1097/FBP.0b013e3283512c85.

Mortensen M, Patel B, Smart TG. GABA Potency at GABA(A) Receptors Found in Synaptic and Extrasynaptic Zones. *Front Cell Neurosci.* 2012 Jan 20;6:1. doi: 10.3389/fncel.2012.00001.

Mottu F, Laurent A, Rufenacht DA, Doelker E. Organic solvents for pharmaceutical parenterals and embolic liquids: a review of toxicity data. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2000 Nov-Dec;54(6):456-69. PMID: 11107838

Nagilla R, Nord M, McAtee JJ, Jolivet LJ. Cassette dosing for pharmacokinetic screening in drug discovery: comparison of clearance, volume of distribution, half-life, mean residence time, and oral bioavailability obtained by cassette and discrete dosing in rats. *J Pharm Sci.* 2011 Sep;100(9):3862-74. doi: 10.1002/jps.22525.

Narahashi T, Moriguchi S, Zhao X, Marszalec W, Yeh JZ. Mechanisms of action of cognitive enhancers on neuroreceptors. *Biol Pharm Bull.* 2004 Nov;27(11):1701-6. doi: 10.1248/bpb.27.1701.

Neervannan S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical 30 challenges. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006 Oct;2(5):715-31. doi: 10.1517/17425255.2.5.715.

Nishitani N, Sasamori H, Ohmura Y, Yoshida T, Yoshioka M. Blonanserin suppresses impulsive action in rats. *J Pharmacol Sci.* 2019 Nov;141(3):127-130. doi: 10.1016/j.jphs.2019.09.013.

Nitzan-Luques A, Devor M, Tal M. Genotype-selective phenotypic switch in primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Pain.* 2011 Oct;152(10):2413-2426. doi: 10.1016/j.pain.2011.07.012.

Nurmikko TJ, Eldridge PR. Trigeminal neuralgia--pathophysiology, diagnosis and current treatment. *Br J Anaesth.* 2001 Jul;87(1):117-32. doi: 10.1093/bja/87.1.117.

Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P. Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci.* 1998 Mar 1;18(5):1693-703. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-05-01693.1998.

Nutt DJ, Malizia AL. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br J Psychiatry.* 2001 Nov;179:390-6. doi: 10.1192/bjp.179.5.390.

Obradović ALj, Joksimović S, Poe MM, Ramerstorfer J, Varagic Z, Namjoshi O, Batinić B, Radulović T, Marković B, Roth BL, Sieghart W, Cook JM, Savić MM. Sh-I-048A, an in vitro non-selective super-agonist at the benzodiazepine site of GABAA receptors: the approximated activation of receptor subtypes may explain behavioral effects. *Brain Res.* 2014 Mar 20;1554:36-48. doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.036.

O'Hagan D. Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond. *Chem Soc Rev.* 2008 Feb;37(2):308-19. doi: 10.1039/b711844a.

Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev.* 2008 Sep;60(3):243-60. doi: 10.1124/pr.108.00505.

Ortells MO, Lunt GG. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* 1995 Mar;18(3):121-7. doi: 10.1016/0166-2236(95)93887-4.

Pal D, Walton ME, Lipinski WJ, Koch LG, Lydic R, Britton SL, Mashour GA. Determination of minimum alveolar concentration for isoflurane and sevoflurane in a rodent model of human metabolic syndrome. *Anesth Analg.* 2012 Feb;114(2):297-302. doi: 10.1213/ANE.0b013e31823ede22.

Park BK, Kitteringham NR, O'Neill PM. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:443-70. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.443.

Pestel S, Martin HJ, Maier GM, Guth B. Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2006 Sep-Oct;54(2):200-14. doi: 10.1016/j.vascn.2006.02.006.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* 2000;101(4):815-50. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00442-5

Prevot TD, Li G, Vidojevic A, Misquitta KA, Fee C, Santrac A, Knutson DE, Stephen MR, Kodali R, Zahn NM, Arnold LA, Scholze P, Fisher JL, Marković BD, Banasr M, Cook JM, Savić M, Sibille E. Novel Benzodiazepine-Like Ligands with Various Anxiolytic, Antidepressant, or Pro-Cognitive Profiles. *Mol Neuropsychiatry.* 2019 Apr;5(2):84-97. doi: 10.1159/000496086

Pugh JR, Raman IM. Nothing can be coincidence: synaptic inhibition and plasticity in the cerebellar nuclei. *Trends Neurosci.* 2009 Mar;32(3):170-7. doi: 10.1016/j.tins.2008.12.001.

Puri J, Bellinger LL, Kramer PR. Estrogen in cycling rats alters gene expression in the temporomandibular joint, trigeminal ganglia and trigeminal subnucleus caudalis/upper cervical cord junction. *J Cell Physiol.* 2011 Dec;226(12):3169-80. doi: 10.1002/jcp.22671.

- Puri J, Vinothini P, Reuben J, Bellinger LL, Ailing L, Peng YB, Kramer PR. Reduced GABA(A) receptor $\alpha 6$ expression in the trigeminal ganglion alters inflammatory TMJ hypersensitivity. *Neuroscience*. 2012 Jun 28;213:179-90. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.03.059
- Ramerstorfer J, Furtmüller R, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Sieghart W, Ernst M. The GABAA receptor alpha+beta- interface: a novel target for subtype selective drugs. *J Neurosci*. 2011 Jan 19;31(3):870-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5012-10.2011.
- Ramerstorfer J, Furtmüller R, Vogel E, Huck S, Sieghart W. The point mutation gamma 2F77I changes the potency and efficacy of benzodiazepine site ligands in different GABAA receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*. 2010 Jun 25;636(1-3):18-27. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.03.015.
- ROBERTS E, FRANKEL S. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem*. 1950 Nov;187(1):55-63. PMID: 14794689.
- Rodgers RJ, Johnson NJ. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995 Oct;52(2):297-303. doi: 10.1016/0091-3057(95)00138-m.
- Rudolph S, Guo C, Pashkovski SL, Osorno T, Gillis WF, Krauss JM, Nyitrai H, Flaquer I, El-Rifai M, Datta SR, Regehr WG. Cerebellum-Specific Deletion of the GABAA Receptor δ Subunit Leads to Sex-Specific Disruption of Behavior. *Cell Rep*. 2020 Nov 3;33(5):108338. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108338.
- Rudolph U, Möhler H. GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Feb;6(1):18-23. doi: 10.1016/j.coph.2005.10.003.
- Savić MM, Milinković MM, Rallapalli S, Clayton T Sr, Joksimović S, Van Linn M, Cook JM. The differential role of alpha1- and alpha5-containing GABA(A) receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 Oct;12(9):1179-93. doi: 10.1017/S1461145709000108.
- Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain*. 1998 Apr;121 (Pt 4):561-79. doi: 10.1093/brain/121.4.561.
- Schmidt, C., First deuterated drug approved, *Nature Biotechnology* 2017 35 p 493-4. Schmidt, C., First deuterated drug approved, *Nature Biotechnology* 2017 35 p 493-4.
- Sessle BJ. Neural mechanisms and pathways in craniofacial pain. *Can J Neurol Sci*. 1999 Nov;26 Suppl 3:S7-11. doi: 10.1017/s0317167100000135.
- Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol*. 2011;97:179-206. doi: 10.1016/B978-0-12-385198-7.00007-2

Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol.* 2005 Apr;71(4):117-36. PMID: 15756153

Shibuta K, Suzuki I, Shinoda M, Tsuboi Y, Honda K, Shimizu N, Sessle BJ, Iwata K. Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. *Brain Res.* 2012 Apr 27;1451:74-86. doi: 10.1016/j.brainres.2012.02.023.

Sieghart W, Chiou LC, Ernst M, Fabjan J, M Savić M, Lee MT. $\alpha 6$ -Containing GABAA Receptors: Functional Roles and Therapeutic Potentials. *Pharmacol Rev.* 2022 Jan;74(1):238-270. doi: 10.1124/pharmrev.121.000293.

Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M. A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the $\alpha(+)$ $\beta(-)$ interface. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(2):476-85. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01779.x.

Smith W. Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. *Lab Anim.* 1993 Jan;27(1):30-9. doi: 10.1258/002367793781082377.

Steimer T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clin Neurosci.* 2011;13(4):495-506. doi: 10.31887/DCNS.2011.13.4/tsteimer.

Stewart T, Beyak MJ, Vanner S. Ileititis modulates potassium and sodium currents in guinea pig dorsal root ganglia sensory neurons. *J Physiol.* 2003 Nov 1;552(Pt 3):797-807. doi: 10.1113/jphysiol.2003.046409.

Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol Pharm.* 2006 Nov-Dec;3(6):631-43. doi: 10.1021/mp0600182.

Takeda M, Matsumoto S, Sessle BJ, Shinoda M, Iwata K. Peripheral and Central Mechanisms of Trigeminal Neuropathic and Inflammatory Pain. *J. Oral Biosci.* 2011;53(4):318-329. doi: 10.1016/S1349-0079(11)80025-3.

Thompson AJ, Lester HA, Lummis SC. The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Q Rev Biophys.* 2010 Nov;43(4):449-99. doi: 10.1017/S0033583510000168.

Timmins GS. Deuterated drugs: where are we now? *Expert Opin Ther Pat.* 2014 oct;24(10):1067-75. 10.1517/13543776.2014.943184

Treven M, Siebert DCB, Holzinger R, Bampali K, Fabjan J, Varagic Z, Wimmer L, Steudle F, Scholze P, Schnürch M, Mihovilovic MD, Ernst M. Towards functional selectivity for $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABAA receptors: a series of novel pyrazoloquinolinones. *Br J Pharmacol.* 2018 Feb;175(3):419-428. doi: 10.1111/bph.14087.

Tzeng HR, Lee MT, Fan PC, Knutson DE, Lai TH, Sieghart W, Cook J, Chiou LC. $\alpha 6$ GABAA Receptor Positive Modulators Alleviate Migraine-like Grimaces in Mice via Compensating GABAergic Deficits in Trigeminal Ganglia. *Neurotherapeutics*. 2021 Jan;18(1):569-585. doi: 10.1007/s13311-020-00951-1.

U.S. Food and Drug Administration, Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products; pristupljeno 22. septembra 2022. godine.

Urey, H.C., Brickwedde, F.G., and Murphy, G.M. 1932. A hydrogen isotope of mass 2. *Phys. Rev.* 39: 164 Urey, H.C., Brickwedde, F.G., and Murphy, G.M. 1932. A hydrogen isotope of mass 2. *Phys. Rev.* 39: 164

Varagic Z, Ramerstorfer J, Huang S, Rallapalli S, Sarto-Jackson I, Cook J, Sieghart W, Ernst M. Subtype selectivity of $\alpha + \beta$ - site ligands of GABAA receptors: identification of the first highly specific positive modulators at $\alpha 6 \beta 2 / 3 \gamma 2$ receptors. *Br J Pharmacol*. 2013b May;169(2):384-99. doi: 10.1111/bph.12153.

Varagic Z, Wimmer L, Schnürch M, Mihovilovic MD, Huang S, Rallapalli S, Cook JM, Mirheydari P, Ecker GF, Sieghart W, Ernst M. Identification of novel positive allosteric modulators and null modulators at the GABAA receptor $\alpha + \beta$ - interface. *Br J Pharmacol*. 2013a May;169(2):371-83. doi: 10.1111/bph.12151.

Vasović D, Divović B, Treven M, Knutson DE, Steudle F, Scholze P, Obradović A, Fabjan J, Brković B, Sieghart W, Ernst M, Cook JM, Savić MM. Trigeminal neuropathic pain development and maintenance in rats are suppressed by a positive modulator of $\alpha 6$ GABAA receptors. *Eur J Pain*. 2019 May;23(5):973-984. doi: 10.1002/ejp.1365.

Vitez TS, White PF, Eger EI 2nd. Effects of hypothermia on halothane MAC and isoflurane MAC in the rat. *Anesthesiology*. 1974 Jul;41(1):80-1. doi: 10.1097/00000542-197407000-00020.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;1(2):848-58. doi: 10.1038/nprot.2006.116.

Votey SR, Bosse GM, Bayer MJ, Hoffman JR. Flumazenil: a new benzodiazepine antagonist. *Ann Emerg Med*. 1991 Feb;20(2):181-8. doi: 10.1016/s0196-0644(05)81219-3.

Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci*. 1994 May;14(5 Pt 1):2708-23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-05-02708.1994.

Watanabe T, Schulz D, Morisseau C, Hammock BD. High-throughput pharmacokinetic method: cassette dosing in mice associated with minuscule serial bleedings and LC/MS/MS analysis. *Anal Chim Acta*. 2006 Feb 10;559(1):37-44. doi: 10.1016/j.aca.2005.11.049.

Waterhouse RN. Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Mol Imaging Biol.* 2003 Nov-Dec;5(6):376-89. doi: 10.1016/j.mibio.2003.09.014.

Wick JY. The history of benzodiazepines. *Consult Pharm.* 2013 Sep;28(9):538-48. doi: 10.4140/TCP.n.2013.538.

Wilcox SL, Gustin SM, Eykman EN, Fowler G, Peck CC, Murray GM, Henderson LA. Trigeminal nerve anatomy in neuropathic and non-neuropathic orofacial pain patients. *J Pain.* 2013 Aug;14(8):865-72. doi: 10.1016/j.jpain.2013.02.014.

Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, Porter CJ. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev.* 2013 Jan;65(1):315-499. doi: 10.1124/pr.112.005660.

Wong, G.; Gu, Z. Q.; Fryer, R. I.; Skolnick, P. Pyrazolo(4,3-c)quinolines with High Affinities for “ Diazepam- Insensitive ” (DI)-GABAA/Benzodiazepine Receptors. *Med. Chem. Res.* 1992, 2, 217 –224.

Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 2000 Jun 9;288(5472):1765-9. doi: 10.1126/science.288.5472.1765.

Yang L, Xu T, Zhang K, Wei Z, Li X, Huang M, Rose GM, Cai X. The essential role of hippocampal alpha6 subunit-containing GABAA receptors in maternal separation stress-induced adolescent depressive behaviors. *Behav Brain Res.* 2016 Oct 15;313:135-143. doi: 10.1016/j.bbr.2016.07.002

Yoshimura N, de Groat WC. Increased excitability of afferent neurons innervating rat urinary bladder after chronic bladder inflammation. *J Neurosci.* 1999 Jun 1;19(11):4644-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-11-04644.1999.

Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh RM Jr, Kim JJ, Hibbs RE. Structure of a human synaptic GABAA receptor. *Nature.* 2018 Jul;559(7712):67-72. doi: 10.1038/s41586-018-0255-3.

8. BIOGRAFIJA

Branka Divović Matović je rođena 05.01.1989. godine u Novoj Varoši. U istom mestu je završila Osnovnu školu i Gimnaziju „Pivo Karamatijević“ kao nosilac diplome "Vuk Karadžić". Na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,78. U toku studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, zadužbine Dragoljuba Marinkovića i Preduzeća za spoljnu i unutrašnju trgovinu „NELT CO“ d.d.o. Dobitnica je nagrade Regionalne privredne komore Užice za postignute izuzetne rezultate tokom studija. 2020. godine završila je akademsku specijalizaciju Farmakoterapija u farmaceutskoj praksi (10,00) i stekla zvanje specijalista farmacije. Doktorske akademske studije iz farmakologije upisala je školske 2013/14. na Farmaceutskom fakultetu pod mentorstvom prof. dr Miroslava Savića.

Od aprila 2014. godine radila je kao istraživač-pripravnik na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a od januara 2022. godine član je projektnog tima programa IDEJE Fonda za nauku Republike Srbije pod rukovodstvom prof. dr Miroslava Savića. Osnovna oblast istraživanja je bihejvioralna farmakologija.

U prolećnom semestru školske 2013/2014. bila je angažovana u realizaciji praktične nastave iz predmeta Toksikologija s analitikom u okviru integrisanih akademskih studija (Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu).

Od oktobra 2014. godine zaposlena je na Katedri za farmakologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, najpre kao saradnik u nastavi, potom kao asistent (od februara 2016. godine). Učestvuje u izvođenju praktične nastave iz obaveznih i izbornih predmeta koji se izvode na Katedri na integrisanim i specijalističkim akademskim studijama.

Od 2013 do 2019. godine pohađala je edukativne radionice, seminare, kongrese, škole: seminari „Uvod u preduzetništvo“ i „Menadžment“ u sklopu projekta Promocija nauke kroz preduzetništvo (2013); *Federation of European Neuroscience Societies Featured Regional Meeting* (Solun, 2015); moduli za obuku naučno-nastavnog osoblja u okviru programa „TRAIN“ (*Training & Research for Academic Newcomers-TRAIN*) (2017); letnja škola *Clinical Skills in the Treatment of Anxiety and Depression: Hands-on Practice and Heads-on Theory*, na Radboud univerzitetu, u Nijmegenu, Holandija (2019); 32nd *European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Kongres* (Kopenhagen, 2019). Dobitnica je granta ECNP CDE (country with a developing economy) za 2019. godinu.

Do sada je bila ko-autor 10 radova u međunarodnim časopisima i 14 saopštenja sa međunarodnih skupova.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Бранка Дивовић Матовић

Број индекса 4/13

Изјављујем

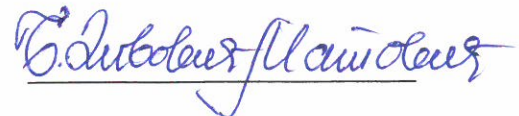
да је докторска дисертација под насловом

Фармаколошка карактеризација утицаја деутерације изабраних
пиразолохинолинона као модулятора ГАБАА рецептора

- 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, 14.10.2022. године



Образац 6.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бранка Дивовић Матовић

Број индекса 4/13

Студијски програм Докторске академске студије, модул Фармакологија

Фармаколошка карактеризација утицаја деутерације изабраних

Наслов рада пиразолохинолинона као модулатора ГАБА_A рецептора

Ментор проф. др Мирослав Савић

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, 14.10.2022. године

Бранка Дивовић Матовић

Изјава о коришћењу

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

Фармаколошка карактеризација утицаја деутерације одабраних
пиразолохинолинона као модулятора ГАБА_A рецептора

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, 14.10.2022. године



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.