

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET**

**Ana M. Micov**

**ANTINOCICEPTIVNI EFEKAT,  
MEHANIZAM DEJSTVA I INTERAKCIJE  
LEVETIRACETAMA U MODELIMA  
SOMATSKOG, VISCERALNOG I  
NEUROPATSKOG BOLA**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2013. god.**

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET**



**Ana M. Micov**

**ANTINOCICEPTIVNI EFEKAT,  
MEHANIZAM DEJSTVA I INTERAKCIJE  
LEVETIRACETAMA U MODELIMA  
SOMATSKOG, VISCERALNOG I  
NEUROPATSKOG BOLA**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2013. god.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY**

**Ana M. Micov**

**ANTINOCICEPTIVE EFFECT, MECHANISM  
OF ACTION AND INTERACTIONS OF  
LEVETIRACETAM IN SOMATIC, VISCERAL  
AND NEUROPATHIC PAIN MODELS**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2013**

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

**MENTOR:**

---

Prof. dr Radica Stepanović-Petrović  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

Doc. dr Maja Tomić  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

---

Prof. dr Nenad Ugrešić  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

---

Prof. dr Sonja Vučković  
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

---

Doc. dr Mirjana Milovanović  
Univerzitet u Beogradu – Fakultet veterinarske medicine

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

# **Antinociceptivni efekat, mehanizam dejstva i interakcije levetiracetama u modelima somatskog, visceralnog i neuropatskog bola**

## **REZIME**

**Svrha studije:** Levetiracetam, antiepileptik novije generacije, ostvaruje antinociceptivno dejstvo u nekim animalnim modelima bola. Cilj našeg rada bio je da se ispita: **1)** antinociceptivni efekat levetiracetama u somatskom (inflamatornom), visceralnom i neuropatskom modelu bola, **2)** mehanizam antinociceptivnog efekta levetiracetama u inflamatornom modelu bola, **3)** efekat kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u inflamatornom, visceralnom i neuropatskom modelu bola i **4)** uticaj antinociceptivnih doza levetiracetama na motornu spretnost eksperimentalnih životinja.

**Metode:** Kao *model inflamatornog bola* korišćen je model inflamatorne hiperalgezije izazvane karageninom u pacova. Hiperalgezija i efekti lekova/kombinacija lekova mereni su u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova. U ovom modelu bola ispitan je i mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama, ispitivanjem uticaja levetiracetama na GABA<sub>A</sub>-ergičke, opioidergičke,  $\alpha_2$ -adrenergičke, serotonergičke i adenzinske receptore, nakon sistemske i lokalne periferne primene levetiracetama i odgovarajućih antagonista. U testu grčeva u miševa izazvanih sirćetnom kiselinom, *model visceralnog bola*, ispitivani su efekti lekova/kombinacija lekova. Kao *model neuropatskog bola* korišćen je model dijabetesne neuropatije u miševa. Dijabetes je izazivan streptozotocinom, a hiperalgezija i efekti lekova/kombinacija lekova mereni su u testu izmicanja repa pod uticajem toplote. Rotarod test korišćen je za procenu uticaja antinociceptivnih doza levetiracetama na motornu spretnost miševa i pacova.

**Rezultati:** U *inflamatornom modelu bola u pacova*: **1)** levetiracetam je ostvario dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo nakon sistemske i lokalne periferne primene, **2)** antagonisti GABA<sub>A</sub>, opioidergičkih,  $\alpha_2$ -adrenergičkih, serotonergičkih i adenzinskih receptora inhibirali su antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama, **3)** levetiracetama primenjen u kombinaciji sa ibuprofenom/celekoksibom/paracetamolom/ceftriaksonom/kofeinom ostvario je sinergističku interakciju. U *visceralnom modelu bola u miševa*, levetiracetam je ostvario dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo i sinergističku interakciju sa paracetamolom i ceftriaksonom. U *modelu dijabetesne neuropatije u miševa* levetiracetam je ispoljio antinociceptivno dejstvo na dozno-

zavisan način i sinergizam sa ibuprofenom, paracetamolom, gabapentinom, duloksetinom i alfa-lipoinskom kiselinom. Antinoceptivne doze levetiracetama nisu uticale na motornu spretnost ekperimentalnih životinja u rotarod testu.

**Zaključak:** Levetiracetam je ispoljio antinociceptivni efekat u inflamatornom, visceralnom i neuropatskom modelu bola u dozama u kojima ne narušava motoriku eksperimentalnih životinja. Antinociceptivni efekat levetiracetama u inflamatornom modelu bola posredovan je, barem delimično, centralnim GABA<sub>A</sub>, centralnim i perifernim opioidergičkim,  $\alpha_2$ -adrenergičkim, serotonergičkim i adenozijskim A<sub>1</sub> receptorima. Levetiracetam ostvaruje sinergizam u antinociceptivnom dejstvu sa standardnim/alternativnim analgeticima. Prikazani rezultati ukazuju na potencijalnu efikasnost levetiracetama i ispitivanih kombinacija u tretmanu inflamatornog, visceralnog i neuropatskog bola u ljudi.

**Ključne reči:** levetiracetam, mehanizam dejstva, modulacija bola, alternativni/standardni analgetici, sinergizam, inflamatorni bol, visceralni bol, neuropatski bol

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmakologija

**UDK broj:** 615.213 : 616-092.9 (043.3)

615.015.152 (043.3)

# **Antinociceptive effect, mechanism of action and interactions of levetiracetam in somatic, visceral and neuropathic pain models**

## **ABSTRACT**

**Background and aim:** Levetiracetam, a novel antiepileptic drug, exerts antinociceptive effects in some animal pain models. The aim of our study was to investigate: **1)** the antinociceptive effects of levetiracetam in the somatic (inflammatory), visceral and neuropathic pain models, **2)** the mechanism of levetiracetam's antinociceptive effect in the inflammatory pain model, **3)** the effects of two-drug combinations of levetiracetam with standard/alternative analgesics in the inflammatory, visceral and neuropathic pain models, and **4)** the influence of levetiracetam's antinociceptive doses on motor performance in experimental animals.

**Methods:** The inflammatory hyperalgesia induced by carrageenan in rats was used as a *model of inflammatory pain*. Hyperalgesia and drug/drug combinations effects were examined by a modified paw pressure test. In this pain model, levetiracetam's mechanism of action was evaluated by examining the influence of levetiracetam on GABA<sub>A</sub>-ergic, opioidergic,  $\alpha_2$ -adrenergic, serotonergic and adenosine receptors, after systemic and local peripheral administration of levetiracetam and corresponding antagonists. In the acetic acid-induced writhing test in mice, *model of visceral pain*, drug/drug combinations effects were examined. The model of diabetic neuropathy in mice was used as a *model of neuropathic pain*. The diabetes was induced by streptozotocine and the hyperalgesia and drug/drug combinations effects were assessed by the radiant heat tail flick test. Rotarod test was used to evaluate the influence of antinociceptive doses of levetiracetam on motor performance in both rats and mice.

**Results:** *In the inflammatory pain model in rats:* **1)** levetiracetam exerted dose-dependent antihyperalgesic effects after systemic and local peripheral administration, **2)** the antagonists of GABA<sub>A</sub>-ergic, opioidergic,  $\alpha_2$ -adrenergic, serotonergic and adenosine receptors inhibited the antihyperalgesic effects of levetiracetam, **3)** levetiracetam exerted synergistic interactions with ibuprofen/celecoxib/paracetamol/ceftriaxone/caffeine. *In the visceral pain model in mice,* levetiracetam exerted dose-dependent antinociceptive effects and synergistic interactions with paracetamol and ceftriaxone. *In the model of diabetic neuropathy in mice,* levetiracetam exerted antinociceptive effects, in a dose-dependent manner, and synergistic interactions with ibuprofen,

paracetamol, gabapentin, duloxetine and alfa-lipoic acid. Levetiracetam did not influence the rotarod performance in both rats and mice in its antinociceptive doses.

**Conclusions:** Levetiracetam exerted antinociceptive effects in inflammatory, visceral and neuropathic pain models at doses that did not impair motor performance in both rats and mice. The antinociceptive effect of levetiracetam in the inflammatory pain model is, at least in part, mediated by central GABA<sub>A</sub>, and both central and peripheral opioidergic,  $\alpha_2$ -adrenergic, serotonergic and adenosine A<sub>1</sub> receptors. Levetiracetam interacted synergistically with standard/alternative analgesics in producing antinociceptive effects. These results suggest that levetiracetam and two-drug combinations of levetiracetam and analgesics could be useful in a treatment of inflammatory, visceral and neuropathic pain conditions in humans.

**Key words:** levetiracetam, mechanism of action, pain modulation, standard/alternative analgesics, synergism, inflammatory pain, visceral pain, neuropathic pain

**Academic expertise: Pharmacy**

**Major in: Pharmacology**

**UDC N°:** 615.213 : 616-092.9 (043.3)

615.015.152 (043.3)



# SADRŽAJ

<b>I UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Bol – definicija, klasifikacija i terapijski pristup</b> .....	<b>1</b>
1.1. Neuralni putevi i medijatori u transmisiji bola.....	3
1.2. Modulacija bola.....	7
1.2.1. Uloga GABA-ergičkog sistema u modulaciji bola.....	8
1.2.2. Uloga opioidergičkog sistema u modulaciji bola .....	10
1.2.3. Uloga noradrenergičkog sistema u modulaciji bola .....	12
1.2.4. Uloga serotonergičkog sistema u modulaciji bola.....	13
1.2.5. Uloga adenozienskog sistema u modulaciji bola .....	15
<b>2. Uloga antiepileptika u terapiji bola</b> .....	<b>17</b>
2.1. Levetiracetam .....	20
2.1.1. Efekti levetiracetama u eksperimentalnim modelima bola .....	21
2.1.2. Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama .....	22
2.1.3. Efikasnost i bezbednost levetiracetama u terapiji bola – kliničke studije .....	23
<b>3. Kombinovana primena analgetika u terapiji bola</b> .....	<b>27</b>
<b>II CILJEVI RADA</b> .....	<b>29</b>
<b>III MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>31</b>
<b>1. Čuvanje eksperimentalnih životinja</b> .....	<b>31</b>
<b>2. Supstance korišćene u eksperimentima</b> .....	<b>32</b>
<b>3. Eksperimentalni modeli bola</b> .....	<b>34</b>
3.1. Model somatskog bola – inflamatorni bol u pacova .....	34
3.1.1. Izazivanje inflamacije.....	34
3.1.2. Testiranje inflamatorne hiperalgezije .....	35
3.1.3. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta levetiracetama nakon sistemske i lokalne periferne primene.....	36
3.1.4. Ispitivanje efekata sistemski i lokalno periferno primenjenih antagonista GABA-ergičkih, opioidergičkih, adrenergičkih, serotonergičkih i adenozijskih receptora na antihiperalgezijski efekat sistemski i lokalno periferno primenjenog levetiracetama.....	37
3.1.5. Ispitivanje efekata kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika .....	40
3.2. Model visceralnog bola u miševa.....	42
3.2.1. Test abdominalnih grčeva.....	42
3.2.2. Ispitivanje antinociceptivnog efekta levetiracetama i efekata kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika .....	42

3.3. Model neuropatskog bola - dijabetesna neuropatija u miševa .....	44
3.3.1. Indukcija dijabetesa i testiranje glikemije .....	44
3.3.2. Testiranje hiperalgezije .....	44
3.3.3. Ispitivanje antinociceptivnog efekta levetiracetama i efekata kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika .....	45
<b>4. Test za procenu motorne spretnosti pacova i miševa .....</b>	<b>48</b>
<b>5. Eksperimentalni dizajn i analiza podataka za utvrđivanje tipa interakcije između levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika .....</b>	<b>49</b>
4.1. Izoblografska analiza.....	49
4.2. Analiza tipa interakcije leka sa visokom i leka sa niskom analgetičkom efikasnošću	51
<b>5. Analiza dužine trajanja dejstva lekova i kombinacija lekova .....</b>	<b>52</b>
<b>6. Statistička obrada rezultata .....</b>	<b>54</b>
 <b>IV REZULTATI.....</b>	 <b>55</b>
 <b>1. Efekti levetiracetama u eksperimentalnim modelima bola u pacova i miševa.....</b>	 <b>55</b>
1.1. Efekat levetiracetama u modelu inflamatornog bola u pacova nakon sistemske i lokalne periferne primene .....	55
1.2. Efekat levetiracetama u modelu visceralnog bola u miševa.....	58
1.3. Efekat levetiracetama u modelu dijabetesne neuropatije u miševa.....	59
<b>2. Mehanizam antihiperalgezijskog efekta levetiracetama u modelu inflamatornog bola u pacova .....</b>	<b>60</b>
2.1. Uticaj antagonista GABA-ergičkih receptora na antihiperalgezijski efekat levetiracetama .....	60
2.2. Uticaj antagonista opioidergičkih receptora na antihiperalgezijski efekat levetiracetama .....	62
2.3. Uticaj antagonista adrenergičkih receptora na antihiperalgezijski efekat levetiracetama.....	64
2.4. Uticaj antagonista serotonergičkih receptora na antihiperalgezijski efekat levetiracetama .....	67
2.5. Uticaj antagonista adenozijskih receptora na antihiperalgezijski efekat levetiracetama.....	69
<b>3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u eksperimentalnim modelima bola .....</b>	<b>72</b>
3.1. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelu inflamatornog bola u pacova .....	72
3.1.1. Efekti ibuprofena, celekoksiba, paracetamola, ceftriaksona i kofeina .....	72
3.1.2. Efekti kombinovane primene levetiracetama i ibuprofena.....	75
3.1.3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i celekoksiba .....	79
3.1.4. Efekti kombinovane primene levetiracetama i paracetamola.....	81
3.1.5. Efekti kombinovane primene levetiracetama i ceftriaksona.....	84

3.1.6. Efekti kombinovane primene levetiracetama i kofeina .....	86
3.1.7. Rangiranje kombinacija levetiracetama sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom i ceftriaksonom prema stepenu sinergizma.....	88
3.2. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelu visceralnog bola u miševa .....	89
3.2.1. Efekti paracetamola i ceftriaksona .....	89
3.2.2. Efekti kombinovane primene levetiracetama i paracetamola.....	90
3.2.3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i ceftriaksona.....	92
3.2.4. Rangiranje kombinacija levetiracetama sa paracetamolom i ceftriaksonom prema stepenu sinergizma .....	94
3.3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i ibuprofena, paracetamola, gabapentina, duloksetina i alfa-liponske kiseline u modelu dijabetesne neuropatije u miševa.....	95
3.3.1. Procena dijabetesa i dijabetesne neuropatije .....	95
3.3.2. Efekti ibuprofena, paracetamola, gabapentina, duloksetina i alfa-liponske kiseline.....	96
3.3.3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i ibuprofena.....	99
3.3.4. Efekti kombinovane primene levetiracetama i paracetamola.....	101
3.3.5. Efekti kombinovane primene levetiracetama i gabapentina.....	104
3.3.6. Efekti kombinovane primene levetiracetama i duloksetina.....	106
3.3.7. Efekti kombinovane primene levetiracetama i alfa-liponske kiseline.....	109
3.3.8. Rangiranje kombinacija levetiracetama sa ibuprofenom, paracetamolom, gabapentinom, duloksetinom i alfa-liponskom kiselinom prema stepenu sinergizma	111
<b>4. Uticaj levetiracetama na motornu sposobnost pacova i miševa.....</b>	<b>112</b>
<b>V DISKUSIJA .....</b>	<b>113</b>
<b>1. Antinociceptivni efekti levetiracetama u modelima inflamatornog, visceralnog i neuropatskog bola u pacova i miševa.....</b>	<b>113</b>
1.1. Antinociceptivni efekat levetiracetama u modelu inflamatornog bola u pacova .....	113
1.2. Antinociceptivni efekat levetiracetama u modelu visceralnog bola u miševa .....	115
1.3. Antinociceptivni efekat levetiracetama u modelu dijabetesne neuropatije u miševa.	115
<b>2. Mehanizam antihiperalgezijskog efekta levetiracetama u modelu inflamatornog bola u pacova .....</b>	<b>117</b>
2.1. Inhibitorno dejstvo antagoniste GABA-ergičkih receptora.....	117
2.2. Inhibitorno dejstvo antagonista opioidergičkih receptora.....	118
2.3. Inhibitorno dejstvo antagonista adrenergičkih receptora.....	120
2.4. Inhibitorno dejstvo antagonista serotonergičkih receptora.....	121
2.5. Inhibitorno dejstvo antagonista adenozijskih receptora.....	123
<b>3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelima inflamatornog, visceralnog i neuropatskog bola u pacova i miševa .....</b>	<b>125</b>
3.1. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih	

analgetika u modelu inflamatornog bola u pacova.....	125
3.1.1. Sinergizam između levetiracetama i ibuprofena .....	125
3.1.2. Sinergizam između levetiracetama i celekoksiba.....	127
3.1.3. Sinergizam između levetiracetama i paracetamola .....	129
3.1.4. Sinergizam između levetiracetama i ceftriaksona .....	130
3.1.5. Potencijacija antihiperalgezijskog efekta levetiracetama kofeinom.....	132
3.1.6. Poređenje kombinacija levetiracetama sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom, ceftriaksonom i kofeinom .....	134
3.2. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelu visceralnog bola u miševa .....	135
3.2.1. Sinergizam između levetiracetama i paracetamola .....	135
3.2.2. Sinergizam između levetiracetama i ceftriaksona .....	137
3.2.3. Poređenje kombinacija levetiracetama sa paracetamolom i ceftriaksonom .....	138
3.3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelu dijabetesne neuropatije u miševa.....	139
3.3.1. Sinergizam između levetiracetama i ibuprofena .....	139
3.3.2. Sinergizam između levetiracetama i paracetamola .....	142
3.3.3. Sinergizam između levetiracetama i gabapentina .....	143
3.3.4. Sinergizam između levetiracetama i duloksetina .....	146
3.3.5. Sinergizam između levetiracetama i alfa-lipoiinske kiseline .....	148
3.3.6. Poređenje kombinacija levetiracetama sa ibuprofenom, paracetamolom, gabapentinom, duloksetinom i alfa-lipoiinskom kiselinom.....	150
<b>4. Bezbednost primene levetiracetama.....</b>	<b>151</b>
<b>VI ZAKLJUČCI.....</b>	<b>152</b>
<b>VII LITERATURA .....</b>	<b>155</b>

## I UVOD

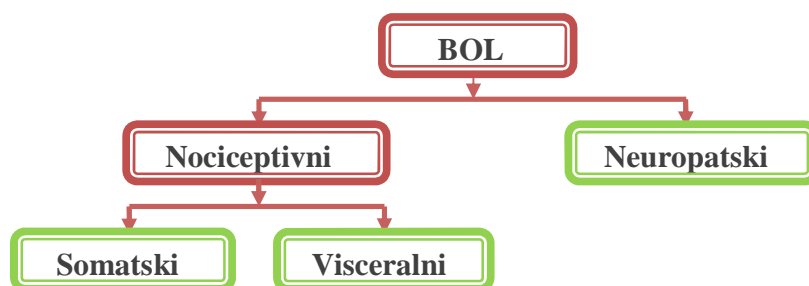
*“Sreća je odsustvo bola.”*

**Artur Šopehnauer**

Iako je otklanjanje uzroka bola jedan je od osnovnih ciljeva savremene medicine, u praksi se najčešće sprovodi simptomatska terapija bola. Osnovni lekovi u simptomatskoj terapiji bola su tzv. standardni analgetici (opioidi i nesteroidni antiinflamatorni lekovi). Međutim, standardni analgetici pokazuju ograničenu efikasnost u terapiji izvesnih hroničnih bolnih stanja. Osim toga, njihova hronična primena može biti praćena značajnim neželjenim efektima. Zato bi *alternativni analgetici* i/ili *kombinovana primena analgetika* mogli da budu terapijsko rešenje za izvesna bolna stanja.

### 1. Bol – definicija, klasifikacija i terapijski pristup

Bol se definiše kao neprijatan osećaj i emocionalno iskustvo izazvano stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (IASP – International Association for Study od Pain). Najčešći je simptom koji pacijenta dovodi do lekara. Prema mehanizmu nastanka bol može biti nociceptivni i neuropatski (Tomić i Stepanović-Petrović, 2011) (Slika 1).



**Slika 1.** Klasifikacija bola prema mehanizmu nastanka.

**Nociceptivni bol** je posledica aktivnosti nervnog sistema kojom se mozak upozorava da na organizam deluje ugrožavajući bolni stimulus (noksa). Nokse mogu biti mehaničke, termičke i hemijske, a sa aspekta terapije bola najznačajnije su hemijske nokse, koje se oslobađaju iz ishemičnog ili povređenog tkiva (u procesu zapaljenja). Nokse deluju na specifične receptore za bol (nociceptore), ogoljene nervne završetke primarnih senzornih neurona, i prouzrokuju

stvaranje bolnih impulsa. Nociceptivni bol može biti somatski i visceralni (Tomić i Stepanović-Petrović, 2011).

**Somatski bol** nastaje kao posledica aktivacije somatskih senzornih nervnih vlakana, koja inervišu površinska tkiva (kožu, potkožno tkivo), ekstremitete (mišiće, zglobove, kosti i ligamente) i glavu. Obično je jasne lokalizacije. Prema dužini trajanja može biti akutni (npr. zubobolja, tenziona glavobolja, opekotine, frakture) i hronični (npr. migrena i artritis) somatski nociceptivni bol. Akutni somatski bol uglavnom dobro reaguje na standardne analgetike, nesteroidne antiinflamatorne lekove (NSAIL) i opioide, dok hronični neretko zahteva primenu i alternativnih analgetika (antidepresivi, antiepileptici) (Tomić i Stepanović-Petrović, 2011).

**Visceralni bol** nastaje zbog povrede/ishemije unutrašnjih organa (npr. srca, pluća, jetre, bubrega) ili spazma glatkih mišića cevastih organa (npr. žučnih i bubrežnih puteva). Visceralni nociceptori su za razliku od somatskih difuzno raspoređeni (ima ih manje), zato je rezultat njihove aktivacije nejasno lokalizovan bol, koji se često reflektuje na druga tkiva i organe. Visceralna senzorna vlakna se obično nalaze u sklopu autonomnih nerava, te je visceralni bol često praćen simptomima koji su posledica aktivacije autonomnog nervnog sistema – mučnina, povraćanje, hipotenzija, znojenje i dr. Visceralni bol prema dužini trajanja može biti akutni (npr. bol kod akutnog infarkta miokarda, bubrežne i žučne kolike) i hronični (npr. kancer jetre, ovarijuma i dr.) visceralni nociceptivni bol. Akutni visceralni bol uglavnom dobro reaguje na standardne analgetike, a u zavisnosti od intenziteta bola, koriste se NSAIL-i i/ili opiodi. Hronični visceralni bol zahteva primenu standardnih i/ili alternativnih analgetika (antiepileptici, antidepresivi) (Tomić i Stepanović-Petrović, 2011; Sikandar i sar., 2012).

**Neuropatski bol** nastaje usled promena u strukturi i/ili funkciji nervnih vlakana bolnog puta. Ovu vrstu bola karakteriše hiperekscitabilnost u nervnom sistemu za bol, što se manifestuje kao *hiperalgezija* (prekomerna bolna reakcija na dejstvo blagih bolnih stimulusa), *alodinija* (bol izazvan nebolnim stimulusima, npr. dodirrom) i *spontani bol* (bol nastao bez prethodnog stimulusa). Neuropatski bol prema lokalizaciji može biti centralni i periferni. Centralni neuropatski bol nastaje kao posledica lezije unutar centralnog nervnog sistema (npr. bol nakon moždanog udara), a periferni kao posledica lezije u perifernom nervnom sistemu (npr. postherpetička neuralgija, bolna dijabetesna neuropatija) (Schaible, 2007; Tomić i Stepanović-Petrović, 2011). Prema toku neuropatski bol je uvek hroničan, a njegova terapija često je izazov za kliničare. U terapiji neuropatskog bola najveću efikasnost ostvaruju alternativni analgetici,

antidepresivi i antiepileptici, te predstavljaju terapiju izbora. Neuropatski bol može da odreaguje i na opioidne analgetike (npr. morfin, tramadol). Topikalni kapsaicin, takođe može biti efikasan kod izvesnih perifernih neuropatskih bolova (Tomić i Stepanović-Petrović, 2011; BNF 66, 2013).

### ***1.1. Neuralni putevi i medijatori u transmisiji bola***

Pre percepcije bola, nociceptivni signal prolazi kroz procese transdukcije, transmisije i modulacije. *Transdukcija* podrazumeva proces kojim energija bolnog stimulusa (mehanička, termička ili hemijska) dovodi do generisanja akcionog potencijala (bolnog impulsa) u primarnom senzornom nervnom završetku. *Transmisija* podrazumeva prenos bolnih impulsa najpre do kičmene moždine, a potom do viših nervnih centara. *Modulacija* bola je neuralna aktivnost koja kontroliše proces transmisije bolnih impulsa. *Percepcija bola* je proces integracije prispelih bolnih impulsa u kortikalnim strukturama odgovornim za senzornu i afektivnu komponentu obrade bola (Marchand, 2010).

Proces **transdukcije** bolnih impulsa je delimično razjašnjen. Nociceptivni bol nastaje stimulacijom receptora za bol - nociceptora. Nociceptori nisu receptori u pravom smislu te reči, već predstavljaju razgranate, ogoljene nervne završetke primarnih senzornih aferentnih nervnih vlakana. Karakteriše ih visok "prag za okidanje", jer se aktiviraju pod dejstvom stimulusa koji mogu izazvati oštećenje (Rang i sar., 2005). Nociceptori eksprimiraju jonske kanale i receptore za inflamatorne i druge medijatore, koji učestvuju u transdukciji bolnih impulsa. S druge strane, periferni nervni završeci eksprimiraju i različite inhibitorne receptore ( $\mu$ -opioidergičke,  $\alpha_2$ -adrenergičke, adenozijske  $A_1$ , 5-HT<sub>1B/1D</sub> i GABA<sub>A</sub> receptore), koji kočje transdukciju i transmisiju bolnih signala (Millan, 2002; Marchand, 2010). Iako do nastanka bola mogu dovesti intenzivni mehanički i termički stimulusi, najčešći stimulatori nociceptora su hemijski medijatori koji se oslobađaju iz tkiva nakon oštećenja, tokom inflamatornih i ishemičnih procesa. U periferne medijatore bola ubrajaju se bradikinin, prostaglandini, histamin, serotonin, adenozintrifosfat (ATP) (oslobađaju ih mastociti, polimorfonuklearne ćelije, trombociti), kao i interleukini, interferoni, TNF (tumor necrosis factor) (oslobađaju ih imune ćelije) (Marchand, 2010; Ossipov, 2012). Oslobođeni medijatori mogu direktno da aktiviraju nociceptore (ATP, bradikinin, serotonin, histamin, H<sup>+</sup> joni) ili indirektno, povećavajući osetljivost nociceptora na druge medijatore (prostaglandini, citokini, TNF) (Millan, 2002). Postoje podaci da se i glutamat

---

oslobađa na periferiji i direktno ekscitira periferne nervne završetke (Carlton i sar., 1995). Sa perifernih terminala primarnog senzornog neurona oslobađaju se i supstanca P i CGRP (peptid sličan kalcitoninu). Periferno oslobođeni medijatori, indukuju vazodilataciju, plazma ekstravazaciju, privlačenje makrofaga i degranulaciju mast ćelija, doprinoseći nastanku neurogene inflamacije (Shaible, 2007; Marchand, 2010).

Primarna senzorna aferentna vlakna koja učestvuju u transdukciji i transmisiji nociceptivnih signala dele se na (Shaible, 2007; Marchand, 2010):

- *A $\delta$  nervna vlakna* – tanka, mijelinizovana nervna vlakna, prečnika 1-5  $\mu$ m, brzine sprovođenja 5-30 m/s. Postoje 2 tipa A $\delta$  vlakana: 1) mehanoreceptori visokog praga koji registruju intenzivne i potencijalno opasne mehaničke, a izuzetno i termičke stimuluse i 2) polimodalna A $\delta$  vlakna koja odgovaraju na mehaničke, termičke i hemijske stimuluse. Njihovom aktivacijom, nastaje oštar, dobro lokalizovan, kratkotrajan bol (“primarni – brzi bol”).
- *C-polimodalna nervna vlakna* – tanka, nemijelinizovana nervna vlakna, prečnika 0,2-1,5  $\mu$ m, brzine sprovođenja 0,5-2 m/s. Najbrojnija su nociceptivna vlakna, koja registruju mehaničke, termičke i hemijske stimuluse. Aktivacijom ovih vlakana nastaje difuzan i dugotrajan bol koji traje i po prestanku dejstva stimulusa (“sekundarni – spori bol”).

Nakon oštećenja nerava i A $\beta$  nervna vlakna, koja u normalnim uslovima sprovode nebolne stimuluse (vibracija, dodir), mogu učestvovati u transmisiji i modulaciji bola. To su velika, mijelinizovana vlakna, prečnika 6-12  $\mu$ m, brzine sprovođenja 35-75 m/s (Marchand, 2010).

Tela primarnih senzornih neurona smeštena su u dorzalnim spinalnim ganglijama, a njihovi centralni terminali ulaze u kičmenu moždinu gde ostvaruju sinaptičke veze sa sekundarnim senzornim neuronima (prevažodno lokalizovani u laminama I, II i V zadnjih rogova kičmene moždine) (Marchand, 2010). Informacije sa primarnog na sekundarni neuron bolnog puta prenose brojni peptidni medijatori: supstanca P, neurokinin A, vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), CGRP, kao i nepeptidni medijatori: glutamat, aspartat, ATP, NO, prostaglandini (Millan, 2002). Primarni senzorni neuron stupa u interakciju i sa brojnim inhibitornim i ekscitatornim spinalnim interneuronima koji modulišu nociceptivne signale pre nego sekundarni neuron pošalje informaciju u više nervne centre (Marchand, 2010).

Sekundarni senzorni neuroni formiraju nekoliko ascendentnih puteva kojim se bolni signali prenose u više nervne centre, među kojima su najznačajniji spinothalamički i



spinoretikulotalamički trakt (Slika 2). Neuronu spinotalamičkog puta daju projekcije u lateralna jedra talamusa, a spinoretikulotalamičkog puta u medijalna jedra talamusa i jedra srednjeg mozga (periakveduktalna siva masa - PAG i nucleus raphe magnus – NRM; strukture uključene u endogenu modulaciju bola) (Schaible, 2007; Marchand, 2010).

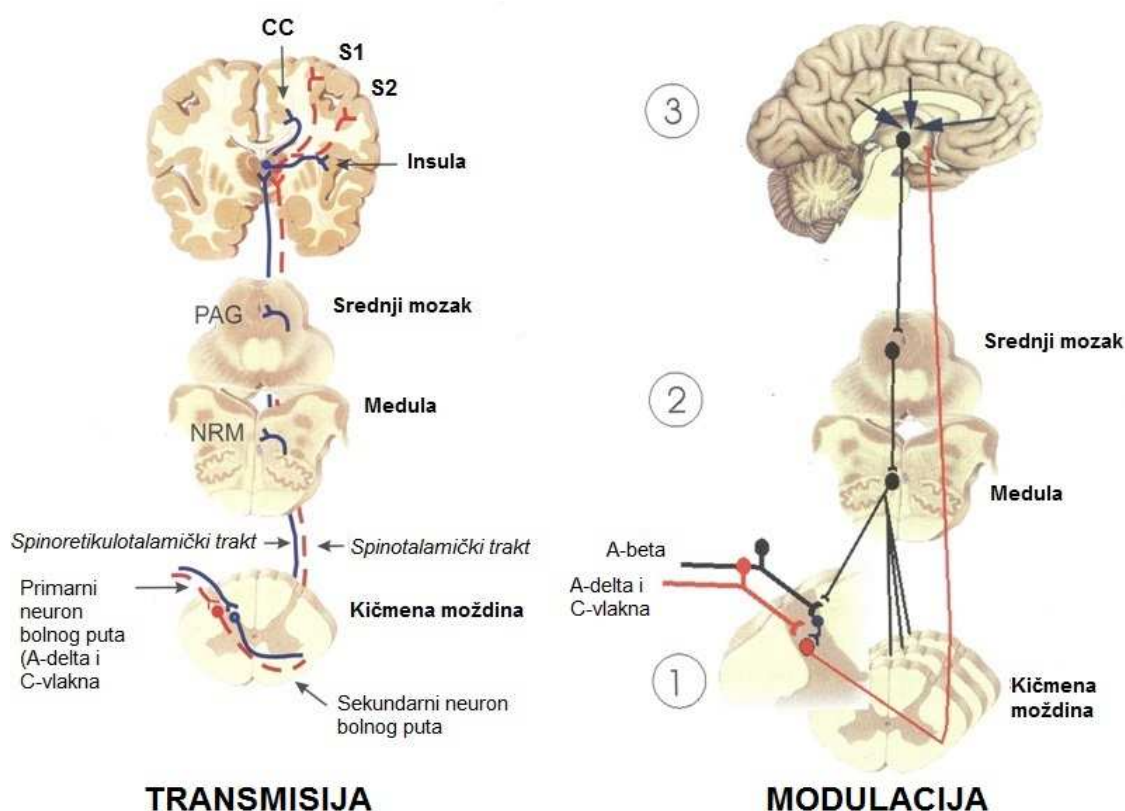
Sekundarni neuroni lateralnih i medijalnih jedara talamusa prenose bolne impulse na tercijarne neurone bolnog puta. Tercijarni neuroni bolnog puta iz lateralnog talamusa šalju aferentne signale do primarnog (S1) i sekundarnog (S2) somatosenzornog korteksa. Ove strukture odgovorne su za svesno doživljavanje i karakterizaciju bola (lokalizacija, intenzitet i dužina trajanja bola). Tercijarni neuroni medijalnih jedara talamusa daju projekcije u limbičke strukture (anterior cingulated cortex i insula - *gyrus cingulatus*), koje su uključene u emocionalno-afektivnu obradu bola (Schaible, 2007; Marchand, 2010) (Slika 2).

**Promene u transdukciji i transmisiji bolnih impulsa u inflamaciji.** Na periferiji može doći do promene broja/aktivnosti jonskih kanala [TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1) - kanali; voltažno-zavisni Na<sup>+</sup>-kanali; voltažno-zavisni Ca<sup>2+</sup>-kanali N-tipa; voltažno-zavisni K<sup>+</sup>-kanali; ASICs (acid-sensing ion channels) - kanali osetljivi na nizak pH] i receptora za inflamatorne medijatore koji učestvuju u transdukciji bolnih impulsa. Oslobodeni medijatori zapaljenja snižavaju prag okidanja nociceptora i dovode do *periferne senzitivacije* nociceptora. Na spinalnom nivou: 1) povećava se oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera (glutamata, supstance P, neurokinina A i CGRP) sa centralnih terminala primarnog senzornog neurona; 2) povećava se oslobađanje prostaglandina i citokina iz neurona i glija ćelija; 3) dolazi do ushodne regulacije određenih subjedinica receptora za glutamat (NR1 i GluR1) i povećane osetljivosti sekundarnog neurona bolnog puta, što doprinosi nastanku *centralne senzitivacije* (Saegusa i sar., 2001; Schaible, 2007; Takeda i sar., 2011).

**Promene u transdukciji i transmisiji bolnih impulsa nakon oštećenja nerava.** Oštećena nervna vlakna pokazuju osobinu ektopičnog pražnjenja na mestu povrede i u telu neurona u dorzalnom spinalnom ganglionu. Ektopičko pražnjenje može da se javi u A $\delta$  i C-vlaknima, ali i A $\beta$ -vlaknima. Različiti mehanizmi mogu doprineti nastanku spontanog električnog pražnjenja u oštećenim nervima: 1) promena broja jonskih kanala odgovornih za transdukciju bolnih impulsa (povećava se ekspresija Ca<sup>2+</sup>-kanala N-tipa; povećava se ekspresija tetrodotoksin (TTX)-osetljivih Na<sup>+</sup>-kanala, a smanjuje ekspresija TTX-rezistentnih Na<sup>+</sup>-kanala); 2) inflamatorni medijatori (npr. bradikinin, NO i citokini) mogu da ekscitiraju oštećene neurone i

3) povećana osetljivost na simpatikusnu stimulaciju (Saegusa i sar., 2001; Yaksh, 2006; Shaible, 2007). Spinalna hiperekscitabilnost se u neuropatskim bolnim stanjima, barem delimično, može objasniti: 1) povećanom osetljivošću i spontanom električnim pražnjenjem spinalnih neurona, što je praćeno razvojem hiperalgezije i alodinije i širenjem receptivnog polja; 2) gubitkom inhibitornih interneurona procesom apoptoze ili usled ekscitotoksičnosti oslobođenih neurotransmitera (Shaible, 2007; Ossipov, 2012). Dokumentovana je i uloga glija ćelija (astrocita i mikroglia) u razvoju i održavanju neuropatskog bola, koje nakon povrede, postaju reaktivne i počinju da oslobađaju faktore koji deluju pronociceptivno (Marchand, 2010).

Neuralni putevi za transmisiju i modulaciju bola prikazani su na Slici 2.



**Slika 2. Levo: Sistem za transmisiju bolnih impulsa.** Bolni impulsi se sa primarnog (A $\delta$  i C-vlakna) prenose na sekundarni neuron bolnog puta u zadnjim rogovima kičmene moždine. Sekundarni senzorni neuroni ulaze u sastav dva glavna ushodna puta, spinotalamički i spinoretikulotalamički, kojim se bolni signali prenose u više nervne centre. U talamusu se informacija sa sekundarnog prenosi na tercijarni neuron bolnog puta, koji daje projekcije u somatosenzorni korteks (S1 i S2) i limbičke strukture (ACC, anterior cingulate cortex i insulu). PAG – periakveduktalna siva masa; NRM – nucleus raphe magnus. **Desno: Sistem za modulaciju bolnih impulsa.** 1) spinalni modulatorni mehanizmi; 2) descendentni modulatorni mehanizmi iz srednjeg mozga i 3) descendentni modulatorni mehanizmi iz viših nervnih centara (Preuzeto i prilagođeno prema referenci Marchand, 2010).

## 1.2. Modulacija bola

Modulacija bola je neuralna aktivnost koja kontroliše proces transmisije bolnih impulsa, a može biti facilitatorna ili inhibitorna. Odvija se na svim nivoima bolnog puta, perifernom, spinalnom i supraspinalnom (Shaible, 2007; Marchand, 2010).

Na **periferiji**, modulacija bola je uglavnom facilitatorna. Iz oštećenog tkiva, kao i iz samih senzornih neurona, oslobodaju se različite pronociceptivne supstance (prostaglandini, bradikinini,  $K^+$  i dr.) koje direktno ili indirektno snižavaju prag osetljivosti nociceptora na i oko mesta povrede, indukujući *primarnu hiperalgeziju*. Primarna hiperalgezija se može objasniti povećanom senzitivacijom nociceptora na različite bolne stimulse, širenjem receptivnog polja i gubitkom centralne inhibicije na mestu povrede (Millan, 2002; Marchand, 2010).

Na **spinalnom nivou** odvija se jedan od najznačajnijih i najkompleksnijih modulatornih uticaja na transmisiju bolnih impulsa. Lokalni interneuroni dorzalnih rogova kičmene moždine mogu biti ekscitatorni i inhibitorni. Većina inhibitornih interneurona ima GABA-ergičku i/ili glicinergičku aktivnost. Uloga inhibitornih interneurona je da spreči nekontrolisano širenje ekscitacije (Millan, 1999; Shaible, 2007; Pan i sar., 2008). Prema “teoriji kapije” u *substantia gelatinosa*-i (SG) zadnjih rogova kičmene moždine susiču se facilitirajući ushodni (ascendentni) uticaji sa periferije i uglavnom inhibitorni nishodni (descendentni) uticaji viših nervnih centara. U zavisnosti od preovladavajuće komponente, konačan uticaj može biti facilitacija ili inhibicija transmisije bolnih impulsa (Millan, 2002; Marchand, 2010).

Iz **supraspinalnih centara** polaze descendentni modulatorni putevi koji kontrolišu transmisiju bolnih impulsa na nivou kičmene moždine (Marchand, 2010). Verovatno najznačajni modulatorni uticaji polaze iz moždanog stabla. Strukture moždanog stabla uključene u endogenu modulaciju bola su periakveduktalna siva masa (PAG) i jedra rostroventralne medule (RVM): *nucleus raphe magnus* (NRM), *nucleus reticularis gigantocellularis pars alpha* i *nucleus reticularis paragigantocellularis lateralis*. PAG prima informacije iz hipotalamusa, talamusa, limbičkih struktura i korteksa i predstavlja relejnu stanicu preko koje viši nervni centri kontrolišu nociceptivnu “kapiju” u zadnjim rogovima kičmene moždine. Descendentni putevi iz PAG se uglavnom projektuju do jedara RVM, a manjim delom direktno do spinalnih neurona (Millan, 2002; Shaible, 2007). Jedra RVM daju projekcije do kičmene moždine, gde ostvaruju sinapsu sa inhibitornim interneuronima u SG ili sekundarnim neuronima bolnog puta. Glavni

neurotransmiteri na ovim sinapsama su serotonin, enkefalin i noradrenalin, a njihov uticaj na transmisiju bola je inhibitoran (Shaible, 2007; Ossipov, 2012). Još jedan važan descendentni inhibitorni put polazi iz *locus coeruleus*-a (LC), koji posredstvom noradrenalina dovodi do inhibicije transmisije na nivou kičmene moždine (Rang i sar., 2005). Opisani inhibitorni putevi koji polaze iz PAG, RVM i LC učestvuju u **descendentnoj inhibitornoj kontroli bola**.

Kod perzistentnih bolnih stanja (npr. nakon inflamacije i oštećenja nerava), dolazi do promena u opisanim modulatornim mehanizmima i razvoja *neuroplastičnosti* bolnog puta. Smatra se da ponavljana stimulacija C-vlakana pospešuje transmisiju kroz zadnje robove kičmene moždine (tzv. “*wind-up*” fenomen) mehanizmima koji uključuju produženo oslobađanje glutamata i posledičnu aktivaciju N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora. Time se povećava osetljivost nociceptora i smanjuje prag okidanja sekundarnih neurona bolnog puta, što može rezultirati razvojem hiperalgezije i alodinije. Ovaj fenomen je obično tranzitoran, ali takođe može doprineti nastanku hroničnog bola (Marchand, 2010; Ossipov, 2012).

### **1.2.1. Uloga GABA-ergičkog sistema u modulaciji bola**

Gama-amino-buterna kiselina (GABA) je glavni inhibitorni neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu (CNS). GABA utiče na transmisiju bolnih impulsa posredstvom GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>B</sub> receptora. Podaci ukazuju na prisustvo GABA-ergičkih receptora na aksonima nemijelinizovanih aferentnih vlakana (Carlton i sar., 1999). Iako su GABA-ergički neuroni distribuirani širom CNS-a, najznačajniji modulatorni uticaj imaju GABA-ergički interneuroni lokalizovani u zadnjim rogovima kičmene moždine (tzv. “čuvari kapije”), gde koče transmisiju nociceptivne informacije ka višim nervnim centrima (Millan, 2002; Sawynok, 2003).

Na **periferiji**, GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>B</sub> receptori lokalizovani su na aksonima perifernih aferentnih nervnih vlakana. Izvori periferne GABA-e su najverovatnije sami primarni aferentni neuroni koji sadrže glutamat, koji se procesom dekarboksilacije može konvertovati do GABA-e (Carlton i sar., 1999; Sawynok, 2003; Gangadharan i sar., 2009). Pokazano je da lokalna periferna primena GABA<sub>A</sub> agoniste, muscimola, ostvaruje kontradiktorne efekte u formalinskom testu (inicijalno antinociceptivne, potom pronociceptivne efekte) (Carlton i sar., 1999). Lokalna periferna primena GABA<sub>B</sub> agoniste, baklofena, smanjuje razvoj mehaničke hiperalgezije

izazvane PGE<sub>2</sub> (Reis i Duarte, 2006). S druge strane, izostala je efikasnost lokalno primenjenih GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>B</sub> agonista u tretmanu bola nakon hirurškog reza u pacova (Reichl i sar., 2012).

GABA-ergički inhibitorni neuroni lokalizovani su širom **kičmene moždine**. U dorzalnim rogovima, GABA-ergički interneuroni formiraju akso-aksonske sinapse sa centralnim terminalima primarnih aferentnih neurona (presinaptička inhibicija) i akso-dendritske i akso-somatske sinapse sa sekundarnim neuronima bolnog puta (postsinaptička inhibicija). Postsinaptičku inhibiciju, GABA-ergički neuroni rade u sadejstvu sa glicineričkim inhibitornim neuronima. GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>B</sub> receptori lokalizovani su presinaptički (na primarnom neuronu bolnog puta) i postsinaptički (na sekundarnom neuronu bolnog puta) (Shaible, 2007; Pan i sar., 2008; Zeilhofer i sar., 2009). Aktivacijom ovih receptora, GABA i GABA agonisti inhibiraju transmisiju bolne informacije ka supraspinalnim centrima, mehanizmima koji uključuju inhibiciju oslobađanja glutamata i neuropeptida iz primarnog neurona bolnog puta i hiperpolarizaciju membrane postsinaptičkog neurona (Pan i sar.; 2008; Ren i Dubner, 2010). Pokazano je da intratekalna primena GABA<sub>A</sub> agoniste, izoguvacina, sprečava razvoj taktilne alodinije i termičke hiperalgezije u neuropatskom bolu u pacova (Ren i Dubner, 2010). GABA<sub>B</sub> agonista, baklofen, primenjen intratekalno, ostvaruje antinociceptivno dejstvo u akutnim i hroničnim animalnim modelima bola (Pan i sar., 2008). Gubitak spinalne GABA-ergičke inhibitorne kontrole smatra se glavnim uzročnikom nastanka hroničnog bola (Zeilhofer i sar., 2009).

Na **supraspinalnom nivou** GABA-ergički neuroni ostvaruju kompleksan uticaj na modulaciju bola (inhibicija i facilitacija). Inhibitoran uticaj GABA-ergičkih neurona na transmisiju bola zabeležen je na nivou: 1) RVM-e - facilitacijom descendente serotonergičke inhibitorne struje, čime se potencira descendenta inhibitorna kontrola bola; 2) LC-a - potencijacijom descendente noradrenergičke inhibitorne struje; i 3) cerebralnog korteksa - povećanjem praga osetljivosti prema bolnim dražima i stimulacijom descendente inhibitorne kontrole bola (Millan, 2002; Jasmin i sar., 2003). Opisana su i facilitatorna dejstva GABA-e i GABA agonista na nivou: 1) PAG-a, gde mikroinjekcija GABA<sub>A</sub> antagoniste ostvaruje analgetičko dejstvo, blokadom inhibitornog dejstva GABA-e na descendente inhibitorne puteve; 2) RVM-e i LC-a – direktnom i indirektnom inhibicijom descendentnih serotonergičkih i noradrenergičkih inhibitornih puteva; i 3) cerebralnog korteksa - smanjenjem praga osetljivosti prema bolnim dražima (Millan, 2002; Jasmin i sar., 2003). Na bazi navedenog, može se

zaključiti da je uloga GABA-ergičkih mehanizama u supraspinalnoj modulaciji bola veoma kompleksna i još uvek nedovoljno razjašnjena.

Zbog kompleksnog uticaja na modulaciju bola, kao i široke rasprostranjenosti GABA-e u CNS-u i potencijalnih neželjenih efekata (sedacija, motorna inkoordinacija), klinička primena GABA agonista kao analgetika nije zaživela. Međutim, mnogi analgetici i anestetici koji se već koriste u kliničkoj praksi ili se ispituju kao potencijalni analgetici, deluju između ostalog i na taj način što aktiviraju GABA-ergičke inhibitorne mehanizme (direktno ili indirektno). Korišćenjem animalnih modela bola pokazano je da na ovaj način deluju: morfin (Jia i sar., 2004), baklofen (Pan i sar., 2008); midazolam (Shih i sar., 2008), karbamazepin i okskarbazepin (Stepanović-Petrović i sar., 2008a), topiramat (Paranos i sar., 2013) i dr.

### ***1.2.2. Uloga opioidergičkog sistema u modulaciji bola***

Opioidergički sistem je centralna karika endogenog sistema za modulaciju bola. Opioidergički neuroni i/ili opioidergički receptori uključeni su u modulaciju bola na perifernom, spinalnom i supraspinalnom nivou. Endogeni opiodi i opiodni analgetici utiču na modulaciju bola posredstvom široko rasprostranjenih  $\mu$ -,  $\kappa$ - i  $\delta$ -opioidergičkih receptora ( $\mu$ -receptori posreduju klinički relevantne efekte) (Sawynok, 2003; Marvizon i sar., 2010).

Na **periferiji**, opioidergički receptori prisutni su na perifernim terminalima mijelinizovanih i nemijelinizovanih senzornih neurona, simpatičkim postganglijskim neuronima i imunim ćelijama (Sawynok, 2003; Marvizon i sar., 2010). Periferni opioidergički mehanizmi su posebno značajni za modulaciju bola u inflamaciji (Sawynok, 2003). Inflamacija povećava dostupnost (dolazi do prekida perineuralne barijere) i ekspresiju opioidergičkih receptora na perifernom senzornom neuronu, kao i oslobađanje endogenih opioda iz imunih ćelija (limfocita, makrofaga i mast ćelija) (Marvizon i sar., 2010). Aktivacija perifernih opioidergičkih receptora na senzornim neuronima smanjuje njihovu ekscitabilnost, koči propagaciju akcionih potencijala i oslobađanje neuropeptida (Sawynok, 2003). Postoje brojni eksperimentalni dokazi da periferno primenjeni agonisti opioidergičkih receptora ostvaruju antinociceptivno dejstvo u modelima inflamatornog bola, pri čemu  $\mu$ -agonisti uglavnom ostvaruju veću efikasnost u odnosu na  $\kappa$ - i  $\delta$ -agoniste, mada efekat zavisi od prirode bolnog stimulusa i korišćenog proinflamatornog sredstva.

Pokazano je da periferno primenjen morfin ostvaruje efikasnost i u kliničkim uslovima (operacija kolena, dentalna hirurgija, artritis) (Sawynok, 2003).

Glavni izvor endogenih opioda (enkefalina, dinorfina) na **spinalnom nivou** su interneuroni, a verovatno udela imaju i aksoni supraspinalnih neurona. Endogeni opiodi i opiodni analgetici kontrolišu proces transmisije bolnih impulsa putem opiodergičkih receptora eksprimiranih na neuronima superficijalnih lamina (I i II) zadnjih rogova kičmene moždine i dorzalnog ganglionu (Pan i sar., 2008; Marvizon i sar., 2010). Intratekalno primenjeni opiodi smanjuju oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera (pre svega glutamata) iz primarnog aferentnog neurona blokadom N-tipa  $Ca^{2+}$ -kanala (presinaptička inhibicija) i inhibiraju aktivnost sekundarnih aferentnih neurona otvaranjem  $K^{+}$ -kanala i posledičnom hiperpolarizacijom (postsinaptička inhibicija) (Shaible, 2007; Khalefa i sar., 2012). Ekspresija opiodergičkih receptora se menja u zavisnosti od bolnog stanja, npr. oštećenje nerava smanjuje ekspresiju  $\mu$ -receptora u kičmenoj moždini, zato su antinociceptivni efekti  $\mu$ -agonista smanjeni u neuropatskim bolnim stanjima. Nasuprot,  $\kappa$ -receptori su ushodno regulisani u neuropatskim, a  $\delta$ -receptori u hroničnim inflamatornim bolnim stanjima (Pan i sar., 2008).

Na **supraspinalnom nivou**, brojne strukture uključene u obradu bolnih impulsa (talamus, hipotalamus, PAG i RVM) eksprimiraju  $\mu$ -opiodergičke receptore (Khalefa i sar., 2012), ali se smatra da je RVM ključni region opiodne analgezije (Finnegan i sar., 2004; Pan i sar., 2008). Pokazano je da stimulacija PAG-a ili NRM-a dovodi do povećanog spinalnog oslobađanja opioda i potenciranja descendente serotonergičke i noradrenergičke inhibitorne kontrole nociceptivne transmisije u kičmenoj moždini (Marvizon i sar., 2010). Opiodergički mehanizmi uključeni su u antinociceptivno dejstvo opiodnih analgetika, ali i mnogih drugih supstanci. U eksperimentalnim modelima bola, pokazano je da posredstvom opiodergičkih receptora (direktno ili indirektno), antinociceptivno dejstvo ostvaruju paracetamol (Sandrini i sar., 2007), ketorolak (Uphouse i sar., 1993), amitriptilin (Gray i sar., 1998) i topiramata (Lopes i sar., 2009). Imajući u vidu visoku efikasnost opiodnih analgetika, ali i neželjena dejstva (sedacija, respiratorna depresija i konstipacija) koja ograničavaju njihovu primenu u hroničnim bolnim stanjima, jasno je da postoji potreba za lekovima koji bi aktivirali opiodergičke inhibitorne mehanizme, ali uz povoljniji profil neželjenih dejstava.

### 1.2.3. Uloga noradrenergičkog sistema u modulaciji bola

Noradrenalin (NA) ima značajno mesto u endogenoj modulaciji bola. Glavni izvor NA su postganglijska simpatička nervna vlakna na periferiji i noradrenergička jedra moždanog stabla u CNS-u (Petrovaara, 2006). Za modulatorno dejstvo NA značajni su  $\alpha_2$ -adrenergički receptori (klonirana su 3 podtipa  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2C}$ ), široko distribuirani u perifernom i centralnom nervnom sistemu (Pan i sar., 2008). Aktivacijom različitih podtipova  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora na različitim nivoima bolnog puta, mogu se objasniti suprotna modulatorna dejstva NA (facilitacija i inhibicija).

Noradrenalin nema značajan uticaj na **perifernu modulaciju bola** u fiziološkim uslovima, već u neuropatskim i inflamatornim bolnim stanjima, gde ostvaruje i pronociceptivne i antinociceptivne efekte. Literaturni podaci ukazuju da nakon oštećenja perifernog nerva/tkiva dolazi do interakcije (tzv. kuplovanja) između simpatičkog i primarnog senzornog neurona, koja je praćena pupljenjem simpatičkog vlakna, promenom u ekspresiji i/ili osetljivosti određenih podtipova  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora i povećanim oslobađanjem NA i drugih medijatora (npr. prostaglandina) koji modulišu aktivnost oba tipa vlakana (Jänig i sar., 1996; Petrovaara, 2006). Još uvek je predmet polemike koji podtip perifernih  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora posreduje pronociceptivne, a koji antinociceptivne efekte NA, imajući u vidu kontradiktorne podatke bihejvioralnih i elektrofizioloških studija. Pretpostavlja se da je pronociceptivno dejstvo NA i  $\alpha_2$ -adrenergičkih agonista posredovano  $\alpha_{2B}$ -adrenergičkim receptorima lokalizovanim na simpatičkom postganglijskom neuronu, a antinociceptivno dejstvo  $\alpha_{2C}$ -adrenergičkim receptorima na primarnom aferentnom neuronu, dok  $\alpha_{2A}$ -adrenergički receptori mogu posredovati oba efekta (Sawynok, 2003; Petrovaara, 2006). Antinociceptivno dejstvo NA na periferiji dodatno se može objasniti povećanim oslobađanjem opioida iz imunih ćelija i smanjenom ekspresijom citokina u stanjima nakon oštećenja tkiva/nerava. Ovi efekti su takođe posredovani  $\alpha_2$ -adrenergičkim receptorima (Petrovaara, 2006).

Na **spinalnom nivou**, NA oslobađaju aksoni descendentnih neurona koji polaze iz moždanog stabla. Oslobođeni NA suprimira spinalnu transmisiju bola: 1) aktivacijom  $\alpha_{2A}$ -adrenergičkih receptora na centralnim terminalima primarnog aferentnog neurona čime se inhibira oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera (presinaptička inhibicija); 2) aktivacijom  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora na sekundarnom neuronu bolnog puta i posledičnom hiperpolarizacijom



(postsinaptička inhibicija); 3)  $\alpha_{2C}$ -receptor posredovanom inhibicijom ekscitatornih spinalnih interneurona; i 4)  $\alpha_1$ -receptor posredovanom aktivacijom GABA-ergičkih i glicineričkih inhibitornih interneurona (Petrovaara, 2006; Ossipov, 2012). Pokazano je da intratekhalno primenjeni klonidin, agonist  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora, ostvaruje antinociceptivno dejstvo u akutnim i hroničnim animalnim modelima bola, ali i u kliničkoj praksi (Pan i sar., 2008).

Na **supraspinalnom nivou**, uloga NA u modulaciji bola može biti facilitatorna ili inhibitorna u zavisnosti od supraspinalnog mesta oslobađanja, tipa aktiviranih adrenergičkih receptora i intenziteta i dužine trajanja bolnog stimulusa. Pretpostavlja se da supraspinalni  $\alpha_2$ -adrenergički receptori na noradrenergičkim neuronima (autoreceptori) posreduju pronociceptivne efekte NA i  $\alpha_2$ -agonista, dok supraspinalni  $\alpha_2$ -adrenergički receptori na ne-noradrenergičkim neuronima (heteroreceptori) posreduju antinociceptivne efekte. Najveća i najznačajnija grupa noradrenergičkih neurona u mozgu je *locus coeruleus* (LC). LC je prevashodno uključen u inhibitornu modulaciju perzistentnog bola (Petrovaara i sar., 2006).

U animalnim modelima bola pokazano je da posredstvom  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora, antinociceptivno dejstvo ostvaruju diklofenak, ketoprofen i piroksikam (Pinardi i sar., 2002), tramadol (Kimura i sar., 2012), lidokain (Saadé i sar., 2012), venlafaksin (Berrocoso i Mico, 2007), karbamazepin i okskarbazepin (Vučković i sar., 2006a) i gabapentin (Tanabe i sar., 2005). Sistemska terapijska primena  $\alpha_2$ -agonista kao što su klonidin i deksmedetomidin, ograničavaju neželjena dejstva (sedacija, hipotenzija). Dalje farmakološke manipulacije idu u smeru pronalazjenja selektivnih za određeni podtip  $\alpha_2$ -adrenergičkih agonista uz povoljniji profil neželjenih dejstava.

#### ***1.2.4. Uloga serotonergičkog sistema u modulaciji bola***

Uloga serotonergičkog sistema u modulaciji bola je veoma kompleksna. Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) ima dvostruku ulogu (inhibicija i facilitacija) u procesu nastanka i transmisije bolnih impulsa. Različiti 5-HT receptori distribuirani širom centralnog i perifernog nervnog sistema posreduju ove efekte (Kayser i sar., 2010).

Pokazano je da 5-HT **na periferiji** aktivira nociceptore i povećava njihovu osetljivost na druge algogene medijatore, doprinoseći na taj način perifernoj senzitivaciji i hiperalgeziji nakon inflamacije i oštećenja nerava (Kayser i sar., 2010). Izvor 5-HT na periferiji su trombociti,

mastociti i endotelne ćelije nakon oštećenja tkiva (Lin i sar., 2011a). Lokalno periferno primenjeni 5-HT, sam ili u kombinaciji sa drugim medijatorima zapaljenja ( $\text{PGE}_2$ , bradikinin, NA i histamin), izaziva u glodara spontano bolno ponašanje i bolnu preosetljivost. Periferna dejstva 5-HT su uglavnom posledica aktivacije jonotropnih 5-HT<sub>3</sub> i metabotropnih 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> i 5-HT<sub>4</sub> receptora (Sawynok, 2003). Iako postoje kontradiktorni literaturni podaci, preovladavaju oni koji ukazuju da aktivacija perifernih 5-HT<sub>2A/2B</sub>, 5-HT<sub>3</sub> i 5-HT<sub>4</sub> posreduje pronociceptivne efekte. S druge strane, periferno primenjeni agonisti 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora (triptani) ostvaruju antinociceptivno dejstvo (Sawynok, 2003; Kayser i sar., 2010; Lin i sar., 2011a).

I na **spinalnom nivou**, različiti podtipovi 5-HT receptora posreduju različite (antinociceptivne i pronociceptivne) efekte 5-HT i 5-HT agonista. Agonisti spinalnih 5-HT<sub>1A</sub> receptora, eksprimiranih na izvesnim interneuronima i spinotalamičkim neuronima, ostvaruju antinociceptivne efekte u različitim animalnim modelima bola (Kayser i sar., 2010). Aktivacija 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora na centralnim terminalima primarnog senzornog neurona, smanjuje oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera (supstance P, CGRP), inhibirajući nociceptivnu transmisiju (Kayser i sar., 2010). Antinociceptivne efekte posreduju i 5-HT<sub>2A/2C</sub> i 5-HT<sub>3</sub> receptori, čija aktivacija pospešuje spinalnu inhibitornu GABAergičku i glicinergičku neurotransmisiju (Xie i sar., 2012). U vezi sa spinalnim 5-HT<sub>3</sub> receptorima, pokazano je da mogu biti uključeni i u facilitaciju nociceptivne transmisije, s obzirom da 5-HT<sub>3</sub> antagonisti inhibiraju oslobađanje supstance P i CGRP iz centralnih terminala primarnog aferentnog neurona (Kayser i sar., 2010).

Tela serotonergičkih neurona nalaze se u jedrima moždanog stabla, pre svega u NRM-u. Odatle polaze descendenti serotonergički putevi koji modulišu transmisiju bolnih impulsa na nivou kičmene moždine. Pokazano je da primena selektivnog 5-HT<sub>1A</sub> antagoniste u RVM smanjuje neuropatsku hiperosetljivost. Ovaj podatak bi mogao da ukaže da endogeno oslobođeni 5-HT putem supraspinalnih 5-HT<sub>1A</sub> receptora (autoinhibitorni receptori) tonično suprimira descendente inhibitorne mehanizme u neuropatskim stanjima. Antagonisti ovih receptora potenciraju antinociceptivno dejstvo antidepresiva u animalnim modelima neuropatskog bola. Brojne supraspinalne strukture (retikularna formacija, NRM, talamus, cerebralni korteks i limbičke strukture) eksprimiraju 5-HT<sub>2A</sub> receptore, a antagonisti ovih receptora mogu biti efikasni u tretmanu različitih bolnih stanja. Pokazano je da 5-HT<sub>3</sub> antagonisti (npr. granisetron, koristi se kao antiemetik), mogu biti efikasni u tretmanu hroničnog neuropatskog bola u ljudi. Na

bazi navedenog, može se zaključiti da 5-HT na **supraspinalnom nivou** prevashodno facilituje nociceptivnu transmisiju, a da antagonisti odgovarajućih 5-HT receptora mogu imati potencijalnu terapijsku primenu (Kayser i sar., 2010).

Posredstvom serotonergičkih mehanizama antinociceptivno dejstvo u animalnim modelima bola ostvaruju paracetamol (Bonfont i sar., 2003), morfin (Dogrul i Seyrek, 2006), paroksetin (Kesim i sar., 2005), venlafaksin (Berrocoso i Mico, 2007) i pregabalin (Rahman i sar., 2009).

### ***1.2.5. Uloga adenozienskog sistema u modulaciji bola***

Adenozin, neuromodulator i lokalni hormon, ostvaruje višestruke uticaje na transmisiju bolnih signala na perifernom, spinalnom i supraspinalnom nivou, tj. na svim mestima značajnim za nastanak i prenos bola. Modulatorno dejstvo adenzina posredovano je adenzinskim receptorima ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) (Sawynok, 2007).

Adenozin ostvaruje kompleksan uticaj na modulaciju bola **na periferiji** (inhibicija i facilitacija) što zavisi od tipa receptora koji se aktiviraju, njihove lokalizacije, kao i od stanja tkiva (inflamacija, oštećenje nerava i sl.). Adenzinski receptori su na periferiji eksprimirani na perifernim terminalima primarnog senzornog neurona ( $A_1$  i  $A_{2A}$ ), kao i na imunim i inflamatornim ćelijama ( $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  i  $A_3$ ) (Burnstock i Sawynok, 2010). Pretpostavlja se da adenzinski  $A_1$  receptori zapravo na primarnom senzornom neuronu postoje kao kompleks od tri receptora, zajedno sa  $\mu$ -opioidergičkim i  $\alpha_{2C}$ -adrenergičkim receptorima (Aley i Levine, 1997). Lokalna periferna primena  $A_1$  agonista u zadnju šapu pacova ostvaruje antinociceptivno, a  $A_{2A}$  agonista pronociceptivno dejstvo u animalnim modelima bola. Pronociceptivne efekte posreduju i  $A_{2B}$  i  $A_3$  receptori prisutni na mast ćelijama, putem oslobađanja histamina i 5-HT, koji dalje stimulišu nociceptore (Sawynok, 2007).

Na **spinalnom nivou**, adenzinski  $A_1$  receptori imaju značajnu inhibitornu ulogu na proces transmisije bolnih signala, a lokalizovani su u laminama I i II. Agonisti spinalnih  $A_1$  receptora ostvaruju antinociceptivno dejstvo u različitim eksperimentalnim modelima bola, što je potvrđeno izostankom dejstva nakon primene selektivnih  $A_1$  antagonista. Glavni mehanizmi uključeni u spinalnu antinocicepciju posredovanu  $A_1$  receptorima su: 1) povećanje propustljivosti postsinaptičkih neurona za  $K^+$  i njihova hiperpolarizacija i 2) presinaptička inhibicija

oslobađanja supstance P, CGRP i glutamata sa centralnih terminala primarnog senzornog neurona (Sawynok, 2007). Manje je poznata uloga spinalnih  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  i  $A_3$  receptora. Postoje izvesni dokazi da agonisti  $A_{2A}$  receptora takođe ostvaruju antinociceptivno dejstvo, ali slabijeg intenziteta u poređenju sa  $A_1$  agonistima (Sawynok, 2007). Vezano za spinalni adenoziński sistem, važno je napomenuti da opiodi (posredovano  $\mu$ -receptorima) i monoamini (posredovano  $5\text{-HT}_1$  i  $\alpha_2$ -adrenergičkim receptorima) ostvaruju antinociceptivno dejstvo delimično i povećanjem spinalnog oslobađanja adenzina (Sawynok i Liu, 2003).

Uloga **supraspinalnih adenzinskih receptora** u procesu prenosa i modulacije bola slabije je ispitana. Raspoloživi eksperimentalni podaci ukazuju da i na supraspinalnom nivou  $A_1$  receptori imaju inhibitornu modulatornu ulogu. Maione i sar. (2007) su pokazali da mikroinjekcija  $A_1$  agoniste u PAG ostvaruje antinociceptivno dejstvo u plantarnom (termička stimulacija) i formalinskom testu. Supraspinalni efekti doprinose ukupnom antinociceptivnom dejstvu sistemski primenjenih  $A_1$  agonista.

Adenzinski receptori (naročiti  $A_1$  podtipa), kao ciljno mesto vezivanja, mogu biti potencijalna meta za razvoj novih analgetika. Mnogi analgetici koji se već koriste u kliničkoj praksi delom ostvaruju analgetički efekat direktnom ili indirektnom interakcijom sa adenzinskim receptorima. U tom kontekstu možemo navesti standarne analgetike: opioide (Keil i Delander, 1995) i paracetamol (Liu i sar., 2013), ali i izvesne alternativne analgetike: amitriptilin (Sawynok i sar., 2008), karbamazepin i okskarbazepin (Tomić i sar., 2004).

## 2. Uloga antiepileptika u terapiji bola

Antiepileptici se primenjuju u terapiji bola od 60-ih godina prošloga veka i to prevashodno *neuropatskog bola* (Birše i sar., 2012). Ovo je delimično očekivano imajući u vidu da epilepsija i neuropatski bol dele sličnu etiopatogenetsku potku. Patofiziološki proces koji se nalazi u osnovi “wind up” fenomena na nivou zadnjih rogova kičmene moždine, koji se smatra osnovnim mehanizmom nastanka centralne senzitivacije kod neuropatskog bola, veoma je sličan “kindling” fenomenu u hipokampalnim neuronima u epilepsiji. U oba procesa dešavaju se neuroplastične promene, pre svega usled aktivacije NMDA receptora za glutamat, što za posledicu ima hiperekscitabilnost postsinaptičkih neurona. Pored toga, poznato je da nakon oštećenja senzornog nerva, dolazi do promena u ekspresiji gena za Na<sup>+</sup>- i Ca<sup>2+</sup>-kanale i njihove akumulacije na senzornim neuronima, snižavanja praga depolarizacije neurona i stvaranja ektopičkih žarišta. Opisana spontana elektrogeneza u neuropatskom bolu slična je električnom pražnjenju u epilepsiji (Backonja, 2002; Pappagallo, 2003; Rogawski i Löscher, 2004). Antiepileptici se primenjuju i *u profilaksi migrene* (BNF 66, 2013). Migrena i epilepsija, ne samo da dele sličan patofiziološki mehanizam nastanka, već i neke karakteristike kliničke interpretacije. Naime, obe bolesti se manifestuju epizodičnim i paroksizmalnim napadima. Što se tiče mehanizma nastanka, smatra se da u migreni postoji hiperekscitabilnost kortikalnih neurona, koja nastaje kao posledica aktivacije trigeminovaskularnog sistema i prekomernog oslobađanja ekscitatornih neurotransmitera (Rogawski i Löscher, 2004). Imajući u vidu patofiziološku sličnost između epilepsije i neuropatskog bola/migrene, ne iznenađuje činjenica da antiepileptici ostvaruju efikasnost u tretmanu neuropatskog bola i profilaksi migrene, jer se blokadom Na<sup>+</sup>- i Ca<sup>2+</sup>-kanala, pospešivanjem GABA-ergičke i inhibicijom glutamatergičke neurotransmisije postiže stabilizacija hiperekscitabilnih neuronskih membrana.

Pored svega navedenog, postoji tendencija da se šire indikacijska područja novih lekova, a jedno od očekivanih za antiepileptike je terapija bolova rezistentnih na standardne analgetike.

Uporedo sa empirijskom primenom antiepileptika kao analgetika, izvođene su brojne pretkliničke i kliničke studije sa ciljem da se utvrdi njihova efikasnost i bezbednost, kao i mehanizam dejstva u tretmanu određenog bolnog stanja. U pretkliničkom ispitivanju antiepileptika korišćeni su različiti animalni modeli bola. Pokazano je da antiepileptici ostvaruju

efikasnost pre svega u bolnim stanjima kod kojih postoji periferna i/ili centralna senzitivizacija bolnog puta, nezavisno od puta sistemske primene (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efekti antiepileptika u eksperimentalnim modelima inflamatornog, visceralnog i neuropatskog bola

Model bola	Eksperimentalni model, nociceptivni test vrsta eksp. životinje	Antiepileptik (način primene)	Efekat	Referenca
<b>Inflamatorni</b>	Konkanavalinom-izazvana inflamacija, modifikovani test pritiska na šapu, pacov	karbamazepin (i.p.)	+	Tomić i sar. (2004)
		okskarbazepin (i.p.)	+	
	Formalinski test, pacov	gabapentin (i.p.)	+	Munro i sar. (2007)
		lamotrigin (i.p.)	+	
etosuksimid (i.p.)		+		
fenitoin (i.p.)		-		
valproat (i.p.)		-		
Monoartritis izazvan Freund-ovim adjuvansom, test izmicanja šape pod uticajem toplote, pacov	gabapentin (i.p.)	+	Zhang i sar. (2009)	
<b>Visceralni</b>	Karageninom-izazvana inflamacija, modifikovani test pritiska na šapu, pacov	topiramet (p.o.)	+	Paranos i sar. (2013)
<b>Visceralni</b>	Test grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom, miš	karbamazepin (p.o.)	+	Stepanović-Petrović i sar. (2008b)
		okskarbazepin (p.o.)	+	
		gabapentin (p.o.)	+	
topiramet (p.o.)		+		
<b>Visceralni</b>	Test grčeva izazvanih 2,4,6-trinitrobenzen sulfonskom kiselinom, pacov	pregabalin (p.o.)	+	Ohashi-Doi i sar. (2010)
<b>Neuropatski</b>	Podvezivanje <i>n. ischiadicus-a</i> , test izmicanja šape pod pritiskom, pacov	gabapentin (p.o.)	+	Yasuda i sar. (2005)
	Dijabetesna neuropatija, test izmicanja repa pod uticajem toplote, miš	gabapentin (p.o.)	+	Tomić i sar. (2010b)
		okskarbazepin (p.o.)	+	
	Podvezivanje spinalnog L5 nerva, stimulacija von Frey filamentima, pacov	karbamazepin (p.o.)	+	Hahm i sar. (2012)
pregabalin (p.o.)		+		
<b>Neuropatski</b>	Oksaliplatinom-indukovan neuropatski bol, test potapanja repa u hladnu vodu, pacov	pregabalin (i.v.)	+	Ling i sar. (2008)

Kliničke studije su potvrdile efikasnost velikog broja antiepileptika u tretmanu različitih neuropatskih bolova, a posebno u dijabetesnoj neuropatiji, trigeminalnoj i postherpetičkoj neuralgiji (Johannessen Landmark, 2008). **Karbamazepin** je lek izbora u terapiji trigeminalne neuralgije (BNF 66, 2013), a ostvaruje efikasnost i u dijabetesnoj neuropatiji, ali ne i u centralnom bolu nakon moždanog udara (Campbell i sar., 1966; Rull i sar., 1969; Leijon i Boivie, 1989). **Fenitoin** se predlaže kao druga linija terapije trigeminalne neuralgije, u slučaju neefikasnosti i/ili nepodnošljivosti karbamazepina (BNF 66, 2013). Postoje izvesni klinički dokazi da je fenitoin efikasan i u kancerskom bolu (Yajnik i sar., 1992). **Valproat** je pokazao efikasnost u dijabetesnoj neuropatiji i postherpetičkoj neuralgiji, ali ne i u bolnim polineuropatijama (Otto i sar., 2004; Kochar i sar., 2005; Agrawal i sar., 2009). **Topiramata** ostvaruje izvesnu efikasnost u pacijenata sa dijabetesnom neuropatijom, mada rezultati kliničkih studija nisu konzistentni (Raskin i sar., 2004; Thienel i sar., 2004). **Lamotrigin** pokazuje efikasnost u refraktarnoj trigeminalnoj neuralgiji i dijabetesnoj neuropatiji (Zakrzewska i sar., 1997; Eisenberg i sar., 2001). **Gabapentin** je indikovano u terapiji perifernog neuropatskog bola (BNF 66, 2013). Efikasnost gabapentina potvrđena je u perifernoj dijabetesnoj neuropatiji, postherpetičkoj neuralgiji, u fantomskom i kancerskom bolu, neuropatiji koja je u vezi sa HIV infekcijom, ali ne i u hemoterapijom-indukovanoj neuropatiji (Rice i Maton, 2001; Bone i sar., 2002; Hahn i sar., 2004; Rao i sar., 2007; Sandercock i sar., 2009; Mishra i sar., 2012). Kliničke studije su potvrdile efikasnost **pregabalina**, derivata gabapentina, u tretmanu različitih oblika neuropatskog bola, centralnog i perifernog porekla, kao i u fibromijalgiji i kancerskom bolu (Lesser i sar., 2004; Crofford i sar., 2005; van Seventer i sar., 2006; Mishra i sar., 2012).

Kliničke studije potvrdile su efikasnost **topiramata** (BNF 66, 2013) i **valproata** u profilaksi migrene (Diener i sar., 2004; Ashrafi i sar., 2005). Izvesnu efikasnost u profilaksi migrenozne glavobolje pokazali su i **gabapentin** i **lamotrigin** (Mathew i sar., 2001; Lampl i sar., 2005).

Iako u izvesnim bolnim stanjima pokazuju veću efikasnost od standardnih analgetika, antiepileptici nisu lišeni neželjenih dejstava. Gotovo svi antiepileptici koji se najčešće koriste mogu da izazovu slična dozno-zavisna neželjena dejstva, kao što su: sedacija, ataksija i diplopija. Većina starih i neki noviji antiepileptici mogu izazvati i idiosinkratske neželjene efekte kao što su: raš, supresija koštane srži ili hepatotoksičnost (Stepanović-Petrović, 2011b). Pomak u

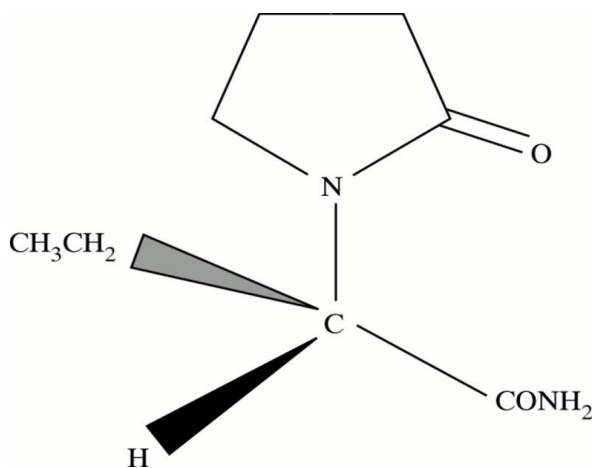
bezbednosnom profilu napravljen je sa gabapentinom, ali i dalje postoji potreba za novim antiepilepticima sa analgetičkim sposobnostima koji bi imali bolju podnošljivost.

### **2.1. Levetiracetam**

Levetiracetam pripada novijoj generaciji antiepileptika. Ovaj lek je uveden u terapiju epilepsije 1999. godine, a kod nas je registrovan/nalazi se u prometu od 2009. godine (Keppra®, Epilev®, Tinalvo®; Registar lekova, 2013). Strukturno je sličan piracetamu, nootropnom leku, a odnedavno je pokazano da i sam levetiracetam ima pozitivan uticaj na kogniciju (Cho i sar., 2012). Hemijska struktura levetiracetama prikazana je na Slici 3. Levetiracetam je indikovao kao monoterapija/pomoćna terapija parcijalnih epileptičnih napada sa ili bez sekundarne generalizacije i kao pomoćna terapija miokloničnih i primarno generalizovanih tonično-kloničnih napada (BNF 66, 2013). Kao što je bio slučaj i sa ostalim antiepilepticima, ubrzo nakon uvođenja u terapiju epilepsije počelo je da se razmatra da li levetiracetam poseduje i analgetička svojstva. Glavna prednost levetiracetama u odnosu na postojeće antiepileptike koji nalaze primenu kao alternativni analgetici bila bi bezbednost primene. Dosadašnji podaci svedoče da levetiracetam ima *neuobičajeno povoljne farmakokinetičke osobine*. Levetiracetam se nakon oralne primene resorbuje u visokom procentu, uz biološku raspoloživost od skoro 100%. Maksimalna koncentracija u plazmi se postiže najčešće za 1,3 h od primene leka, a ravnotežna koncentracija u krvi za 2 dana. Vezivanje leka za proteine plazme je manje od 10 %. Levetiracetam se ne metaboliše obilno; oko 25 % podleže hidrosilaciji do neaktivni metabolita. Enzimi CYP 450 najverovatnije nisu uključeni u biotransformaciju levetiracetama, što značajno smanjuje potencijal stupanja u interakcije sa istovremeno primenjenim lekovima. Oko 95% primenjene doze se ekskretuje urinom u nepromenjenom obliku ili putem metabolita (Patsalos, 2004; De Smedt i sar., 2007). Generalno, levetiracetam se dobro podnosi od strane pacijenata. Najčešća neželjena dejstva levetiracetama su pospanost, slabost i vrtoglavica. Ređe se javljaju anoreksija, dijareja, dispepsija, mučnina, promene u težini, mialgija, ataksija, depresija, emocionalna nestabilnost, insomnija, diplopija i raš (Martindale, 2011). Ostala neželjena dejstva uključuju parestezije, pankreatitis, insuficijenciju jetre i hepatitis. Veoma retko mogu se javiti krvne diskrazije. U postmarketinškom praćenju leka zapaženi su i slučajevi toksične epidermalne



nekrolize, Stivens-Džonsonovog sindroma, multiformnog eritema i alopecije. (Martindale, 2011; BNF 66, 2013; Registar lekova, 2013).



**Slika 3.** Hemisjska struktura levetiracetama [*(-)-(S)- $\alpha$ -etil-2-okso-1-pirolidin acetamid*].

### 2.1.1. Efekti levetiracetama u eksperimentalnim modelima bola

Poslednjih nekoliko godina pokazano je da levetiracetam ostvaruje efikasnost u različitim eksperimentalnim modelima bola (Tabela 2). Pretkliničko ispitivanje levetiracetama kao alternativnog analgetika započeli su Ardid i sar. (2003), ispitivanjem efikasnosti levetiracetama u dva akutna nociceptivna testa i dva hronična modela bola u pacova. Izostala je efikasnost levetiracetama u akutnim nociceptivnim testovima, kao i kod većine antiepileptika u akutnim bolnim stanjima. S druge strane, levetiracetam je ispoljio značajnu efikasnost u modelima neuropatskog bola izazvanog podvezivanjem *n. ischiadicus*-a, odnosno dijabetesom u pacova. Efikasnost levetiracetama u dijabetesnoj neuropatiji potvrđena je i u eksperimentalnom modelu na miševima (Ozcan i sar., 2008). Rezultati ovih eksperimenata ukazuju na potencijalnu efikasnost levetiracetama u neuropatskim bolnim stanjima kod ljudi. Davanje malih doza anestetika (barbiturata, propofola i midazolama) pacovima izaziva prolaznu bolnu preosetljivost. Archer i sar. (2007) su pokazali da profilaktički primenjen levetiracetam smanjuje razvoj bolne preosetljivosti izazvane malim dozama pentobarbitona i midazolama, ali ne i propofola. Levetiracetam je pokazao efikasnost u smanjivanju postoperativnog bola kada je primenjen 1 sat pre operacije zadnje šape pacova, ali je efikasnost izostala kada je levetiracetam primenjen

postoperativno (Sliva i sar., 2008). Rezultati ove studije ukazuju da preoperativno primenjen levetiracetam može biti efikasan u tretmanu postoperativnog bola. Efikasnost levetiracetama izostala je u formalinom izazvanom-inflamatornom bolu u pacova (Munro i sar., 2007), iako su drugi antiepileptici pokazali efikasnost u istom modelu bola (Tabela 1).

**Tabela 2.** *Efekti levetiracetama u eksperimentalnim modelima bola*

<b>Eksperimentalni model bola, nociceptivni test</b>	<b>Doza i put primene</b>	<b>Efekat</b>	<b>Referenca</b>
<b>Neuropatski bol izazvan podvezivanjem n. ischiadicus-a u pacova, „test pritiska na šapu pacova”</b>	540 mg/kg; i.p.	+	Ardid i sar. (2003)
<b>Dijabetesna neuropatija u pacova, „test pritiska na šapu pacova”</b>	17-120 mg/kg; i.p.	+	Ardid i sar. (2003)
<b>Anestetikom izazvana bolna preosetljivost u pacova, “test izmicanja šape pod uticajem toplote” i “test izmicanja repa pod pritiskom”</b>	200-500 mg/kg; i.p.	+	Archer i sar. (2007)
<b>Dijabetesna neuropatija u miševa, “test tople ploče”</b>	20-200 mg/kg; i.p.	+	Ozcan i sar. (2008)
<b>Postoperativni bol u pacova, “test izmicanja šape pod uticajem toplote”</b>	250-1000 mg/kg; i.p.	+	Sliva i sar. (2008)
<b>Akutni nociceptivni testovi – “test tople ploče” i “test izmicanja repa pod uticajem toplote”, pacovi</b>	54-950 mg/kg; i.p.	-	Ardid i sar. (2003)
<b>Inflamatorni model bola u pacova, formalinom-izazvana inflamacija</b>	100-600 mg/kg; i.p.	-	Munro i sar. (2007)

“+” – ima efekta

“-“ – nema efekta

### **2.1.2. Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama**

Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama nije u potpunosti razjašnjen. Još uvek se tačno ne zna ni kako levetiracetam deluje kao antiepileptik. *In vitro* istraživanja su pokazala da se levetiracetam ne vezuje za uobičajena ciljna mesta vezivanja antiepileptika (Noyer i sar., 1995). Antiepileptičko dejstvo levetiracetama dovodi se u vezu sa selektivnim vezivanjem ovog leka za sinaptički vezikularni SV2A protein (Kaminski i sar., 2012). Ovo vezujuće mesto je izgleda tipično za levetiracetam, imajući u vidu da ga ostali antiepileptici ne istiskuju sa mesta vezivanja (Noyer i sar., 1995). Mada fiziološka uloga SV2A proteina nije

sasvim razjašnjena, verovatno da levetiracetam posredstvom SV2A proteina modifikuje sinaptičko oslobađanje glutamata i GABA-e (Kaminski i sar., 2012). Da li je interakcija levetiracetama sa ovim proteinom odgovorna i za njegovo antinociceptivno dejstvo ne zna se, s obzirom da nije poznato kakvu ulogu SV2A protein ima u transmisiji i modulaciji bola.

Uticaj levetiracetama na GABA-ergičku i glutamatergičku neurotransmisiju ostvaruje se sledećim mehanizmima: 1) uticajem na metabolizam i obrt GABA-e u određenim regijama mozga (Löscher i sar., 1996); 2) smanjenjem osetljivosti GABA<sub>A</sub> receptora na dejstvo negativnih alosternih modulatora, cinka i β-karbolina (Rigo i sar., 2002); i 3) ushodnom regulacijom transportera za glutamat (Ueda i sar., 2007).

Ispitivana je interakcija levetiracetama sa jonskim kanalima. Elektrofiziološka ispitivanja su pokazala da levetiracetam selektivno inhibira voltažno-zavisne Ca<sup>2+</sup>-kanale N-tipa u hipokampusu (Niespodziany i sar., 2001; Lukyanetz i sar., 2002). Ovi kanali su značajni za razvoj neuropatskog bola, te bi se njihovom blokadom mogla objasniti efikasnost levetiracetama u neuropatskim bolnim stanjima (Saegusa i sar., 2001). Pored toga, levetiracetam bi mogao da ostvaruje antinociceptivni efekat smanjenjem ekscitabilnosti senzornih neurona putem aktivacije K<sup>+</sup>-kanala (čime se izaziva hiperpolarizacija ćelijske membrane) i inhibicije ulaska Ca<sup>2+</sup> u ćeliju (Ozcan i sar., 2012). Razumevanje mehanizma antinociceptivnog dejstva levetiracetama je tek načeto, te predstavlja svojevrsan izazov za istraživače.

### **2.1.3. Efikasnost i bezbednost levetiracetama u terapiji bola – kliničke studije**

Prvi dokaz o kliničkoj efikasnosti levetiracetama u tretmanu bola dali su Rowbotham i sar. (2003), koji su ispitivali efikasnost levetiracetama u terapiji *postherpetičke neuralgije* (PHN) refraktarne na lekove prvog izbora. U prospektivnoj otvorenoj pilot studiji je učestvovalo 10 pacijenata, od kojih su neki nastavili sa primenom opioida (3 pacijenta) ili antidepresiva (2 pacijenta). Levetiracetam je početno primenjivan u dozi od 500 mg/dan, a doza je postepeno povećavana do 1500 - 3000 mg/dan. Nakon 12 nedelja primene leka zabeleženo je smanjenje bola kod 6 od 10 pacijenata sa PHN uz dobru podnošljivost.

Zlatni standard u lečenju *trigeminalne neuralgije* još uvek je karbamazepin uprkos izvesnim neželjenim dejstvima i potencijalu da stupa u interakcije. Zato se traga za boljim terapijskim rešenjima. U prospektivnoj otvorenoj pilot studiji ispitivana je efikasnost i

podnošljivost levetiracetama u terapiji pacijenata sa trigeminalnom neuralgijom (Jorns i sar., 2009). Deset pacijenata sa intenzivnim bolom tretirano je levetiracetamom (1000 do 5000 mg/dan) u trajanju od 10 nedelja. Korišćene doze u studiji veće su od onih koje su odobrene za terapiju epilepsije (do 3000 mg/dan). Značajno smanjenje intenziteta bola zabeleženo je kod 4 pacijenta i to onih koji su primali levetiracetam u dozama većim od 3000 mg/dan. Važan je podatak da su pacijenti levetiracetam dobro podnosili u svim ispitivanim dozama.

U cilju ispitivanja efikasnosti levetiracetama u terapiji bola u **multiplej sklerozi** (MS), sprovedena je studija na 20 pacijenata sa hroničnim bolom, kod kojih je prethodna terapija (gabapentin, karbamazepin, pregabalin, baklofen, amitriptilin, duloksetin) obustavljena zbog neefikasnosti ili nepodnošljivosti (Rossi i sar., 2009). Po dizajnu studija je bila prospektivna, randomizirana, jednostruko slepa, placebo-kontrolisana i trajala je 3 meseca. Pokazano je da je levetiracetam bezbedan i efikasan lek u tretmanu bola u MS, u dozama od 2000-3000 mg/dan. Najveća efikasnost ostvarena je kod pacijenata sa intenzivnijim bolom, dok je kod onih sa blažim bolom bila samo diskretno veća efikasnost od placeba. Kasnije je urađena studija boljeg dizajna sa istim ciljem (Falah i sar., 2012). U studiji je učestvovalo 27 pacijenata, nasumice podeljenih u dve grupe, od kojih je jedna dobijala levetiracetam u dozi od 3000 mg/dan, a druga placebo. Studija je trajala 6 nedelja. Kod većine pacijenata nije bilo statistički značajne razlike u efikasnosti između levetiracetama i placeba. Međutim, kod pacijenata sa razdirućim bolom i bolom koji je prisutan i bez dodira, levetiracetam je ispoljio značajno smanjenje bola u poređenju sa placebo.

Efikasnost levetiracetama u **profilaksi migrene sa aurom** ispitivana je u otvorenoj kliničkoj studiji (Brighina i sar., 2006), koja je okupila 16 pacijenata sa čestim napadima migrene praćenih aurom. Pacijenti su tretirani 6 meseci levetiracetamom (1000 mg/dan). Broj napada migrenozne glavobolje značajno je smanjen već tokom prvog meseca, a dodatno smanjenje je zabeleženo i tokom drugog i trećeg meseca terapije. Postignuti efekat održao se i u naredna 3 meseca. Kod 7 pacijenata (44%) napadi su u potpunosti prestali nakon 3 meseca lečenja. Intenzitet i dužina trajanja migrene su značajno smanjeni u trećem i šestom mesecu lečenja. Pacijenti su dobro podnosili levetiracetam. Postoje podaci i o efikasnosti levetiracetama u **profilaksi migrene bez aure kod starijih pacijenata** (n=13), kod kojih je levetiracetam primenjivan u dozi od 1000 mg/dan, u trajanju od 6 meseci (Pizza i sar., 2011). Pokazano je da levetiracetam značajno smanjuje učestalost napada migrene, kao i potrebu za uzimanjem lekova

u akutnom napadu migrene. Levetiracetam je efikasan i u **profilaksi migrene u pedijatrijskoj populaciji** (n=20) (Pakalnis i sar., 2007). Ovaj lek je uz dobru podnošljivost primenjivan kod dece u dozi od 20-40 mg/kg/dan, u trajanju od 2-4 meseca. U čak 90% dece zabeleženo je smanjenje bola za 50% i više, u odnosu na bazalni nivo, a prosečan broj napada na mesečnom nivou smanjen je sa 6 na 2 napada.

**Bol nakon mastektomije** (odstranjenje dojke) karakteriše se kao hronični neuropatski bol u predelu hirurškog zahvata i/ili suprotne ruke, sa prevalencom između 20% i 68% (Vilholm i sar., 2008). Glavna linija lečenja bolne mastektomije su alternativni analgetici. U randomiziranoj, dvostruko-slepoj, placebo-kontrolisanoj i ukrštenoj studiji Vilholma i sar. (2008) u kojoj je učestvovalo 25 žena sa bolnom mastektomijom, ispitivana je efikasnost levetiracetama (3000 mg/dan), koji je primenjivan 4 nedelje. Nije bilo značajne razlike u efikasnosti između levetiracetama i placeba.

Efikasnost levetiracetama u **bolnoj polineuropatiji** ispitivana je od strane Holbech i sar. (2011) u randomiziranoj, dvostruko-slepoj, placebo-kontrolisanoj i ukrštenoj kliničkoj studiji. Levetiracetam (3000 mg/dan) je primenjivan kod 35 pacijenata sa dijagnostikovanom polineuropatijom i perzistentnim simptomima (duže od 6 meseci; bol najmanje 4 dana/nedeljno) u trajanju od 6 nedelja. U ovoj studiji nije zabeležena klinički relevantna efikasnost levetiracetama u bolnoj polineuropatiji.

**Bol nakon moždanog udara** se definiše kao centralni neuropatski bol. Terapija ovog bolnog stanja je kompleksna i uglavnom nezadovoljavajuća. U randomiziranoj, dvostruko slepoj, placebo-kontrolisanoj i ukrštenoj kliničkoj studiji kod 33 pacijenta sa perzistentnim bolom nakon moždanog udara, ispitivana je efikasnost i bezbednost primene levetiracetama (3000 mg/dan; 16 nedelja) u poređenju sa placebom (Jungehulsing i sar., 2013). Nije zabeleženo smanjenje intenziteta bola, niti poboljšanje kvaliteta života kod pacijenata tretiranih levetiracetamom.

U Tabeli 3 sumarno su prikazani rezultati kliničkih studija ispitivanja efikasnosti levetiracetama u terapiji bola.

**Tabela 3.** Efekti levetiracetama u terapiji bola – kliničke studije

Bolno stanje	Dizajn studije	Broj pacijenata*	Dnevna doza	Efekat	Referenca
<b>Postherpetička neuralgija</b>	Otvorena pilot studija	10	1500 – 3000 mg	+	Rowbotham i sar., 2003
<b>Trigeminalna neuralgija</b>	Otvorena pilot studija	10	3000 – 5000 mg	+	Jorns i sar., 2009
<b>Neuropatski bol u multiploj sklerozi</b>	Randomizirana, jednostruko-slepa, placebo-kontrolisana, pilot studija	20	2000 – 3000 mg	+	Rossi i sar., 2009
	Randomizirana, dvostruko-slepa, placebo-kontrolisana, ukrštena klinička studija	27	3000 mg	+/-	Falah i sar., 2012
<b>Profilaksa migrene</b>	Otvorena klinička studija	16	1000 mg	+	Brighina i sar., 2006
	Otvorena klinička studija	13	1000 mg	+	Pizza i sar., 2011
	Otvorena klinička studija	20	20-40 mg/kg	+	Pakalnis i sar., 2007
<b>Neuropatski bolni sindrom nakon mastektomije</b>	Randomizirana, dvostruko-slepa, placebo-kontrolisana, ukrštena klinička studija	25	3000 mg	-	Vilholm i sar., 2008
<b>Bolna polineuropatija</b>	Randomizirana, dvostruko-slepa, placebo-kontrolisana, ukrštena klinička studija	35	3000 mg	-	Holbech i sar., 2011
<b>Neuropatski bol nakon moždanog udara</b>	Randomizirana, dvostruko-slepa, placebo-kontrolisana, ukrštena klinička studija	33	3000 mg	-	Jungehulsing i sar., 2013

\* - ukupan broj pacijenata koji je učestvovao u studiji

”+” - potvrđena efikasnost kod većine pacijenata

“+/-“ - potvrđena efikasnost kod dela pacijenata

“-“ - nema efekta

### 3. Kombinovana primena analgetika u terapiji bola

Savremena farmakoterapija susreće se sa izvesnim problemima u oblasti terapije hroničnih bolnih stanja, s obzirom da standardni analgetici (opioidi i nesteroidni antiinflamatorni lekovi) pokazuju ograničenu efikasnost u terapiji ovih bolnih stanja. Pored toga, njihova hronična primena može biti praćena značajnim neželjenim efektima. Uvođenje alternativnih analgetika, pre svega antiepileptika i antidepresiva, značajno je unapredilo terapiju neuropatskog bola. U kliničkoj praksi se u situacijama kada jednim lekom nije moguće suprimirati bol ili se jave limitirajuća dozno-zavisna neželjena dejstva, poseže za kombinovanom primenom analgetika. Obično se kombinuju analgetici različitog mehanizma analgetičkog dejstva. Primenjeni u kombinaciji mogu da ispolje nezavisne efekte tj. da sumarni efekat bude jednak zbiru pojedinačnih efekata (*aditivna interakcija*) ili da stupe u interakciju tako da efekat kombinacije bude veći od sume efekata pojedinačnih lekova (*sinergistička interakcija*). Na ovaj način se postiže ista ili veća terapijska efikasnost uz smanjenje doza pojedinačnih lekova primenjenih u kombinaciji. Smanjenje doza za sobom povlači i smanjenje incidence i/ili intenziteta neželjenih dejstava lekova tj. *veću bezbednost primene* (Mao i sar., 2012).

Pored navedenog, izvesna bolna stanja imaju kompleksnu i često nedovoljno razjašnjenu etiopatogenezu. Kombinacijom analgetika različitog mehanizma dejstva može se postići bolja kontrola ovih bolnih stanja, što je preporučeno od strane Svetske zdravstvene organizacije i Američkog društva za bol (Raffa, 2001). U tom smislu, kombinovana terapija neuropatskog bola postala je pravilo, a ne izuzetak (Gilron i Max, 2005).

Efekti kombinovane primene analgetika ispitivani su u velikom broju eksperimentalnih modela bola. Neretko su predmet istraživanja bile kombinacije antiepileptika i standardnih analgetika ili drugih alternativnih analgetika (Tabela 4). Ispitivani su pre svega antiepileptici za koje je poznato da imaju nisku incidencu interakcija sa drugim lekovima, npr. gabapentin, pregabalin i okskarbazepin. Kako je jedna od glavnih povoljnih osobina levetiracetama niska incidenca (farmakokinetičkih) interakcija sa drugim lekovima, ovaj lek je pogodan za kombinovanu primenu. Do sada nisu ispitivane interakcije levetiracetama sa drugim analgeticima u animalnim modelima bola. Međutim, u animalnim modelima epilepsije pokazano je da levetiracetam primenjen u kombinaciji sa drugim antiepilepticima, ostvaruje sinergizam u antikonvulzivnom dejstvu (De Smedt i sar., 2007).

**Tabela 4.** Efekti kombinovane primene antiepileptika i standardnih/alternativnih analgetika u eksperimentalnim modelima inflamatornog, visceralnog i neuropatskog bola

Model bola	Ekperimentalni model, nociceptivni test, vrsta eksp. životinje	Kombinacija analgetika (način primene)	Efekat	Referenca
<b>Inflamatorni</b>	Formalinski test, pacov	gabapentin (i.pl.) + diklofenak (i.pl.)	sinergizam	Picazo i sar. (2006)
	Formalinski test, pacov	gabapentin (i.pl./i.t./p.o.) + metamizol (i.pl./i.t./p.o.)	sinergizam	Ortega-Varela i sar. (2007)
	Karageninom-izazvana inflamacija, modifikovani test pritiska na šapu, pacov	okskarbazepin (p.o.) + paracetamol (p.o.)	sinergizam	Tomić i sar. (2010a)
	Karageninom-izazvana inflamacija, modifikovani test pritiska na šapu, pacov	okskarbazepin (p.o.) + ibuprofen (p.o.)	sinergizam	Stepanović-Petrović i sar. (2011a)
<b>Visceralni</b>	Test grčeva izazvanih sirčetnom kiselinom, miš	okskarbazepin (p.o.) + etodolak (p.o.)	aditivnost	
	Test grčeva izazvanih sirčetnom kiselinom, miš	karbamazepin (i.p.)* + imipramin (i.p.) ili fluvoksamin (i.p.) ili milnacipram (i.p.)	potencijacija	Aoki i sar. (2006)
<b>Neuropatski</b>	Test grčeva izazvanih sirčetnom kiselinom, miš	okskarbazepin (p.o.) + paracetamol (p.o.)	sinergizam	Tomić i sar. (2010a)
	Dijabetesna neuropatija, test izmicanja repa pod uticajem toplote, miš	okskarbazepin (p.o.) + gabapentin (p.o.)	sinergizam	Tomić i sar. (2010b)
		okskarbazepin (p.o.) + amitriptilin (p.o.)*	sinergizam	
		gabapentin (p.o.) + amitriptilin (p.o.)*	aditivnost	
	Podvezivanje spinalnog L5 nerva, stimulacija von Frey filamentima, pacov	karbamazepin (p.o.) + pregabalin (p.o.)	sinergizam (samo u većim dozama)	Hahm i sar. (2012)

\* lek primenjen u subefektivnoj dozi



## II CILJEVI RADA

Naučni ciljevi ove doktorske disertacije su:

**1. Ispitati da li levetiracetam ostvaruje antinociceptivno dejstvo u eksperimentalnim modelima bola.**

**1.1.** Ispitati efekte sistemski primenjenog levetiracetama u somatskom, visceralnom i neuropatskom modelu bola u pacova i miševa. Kao model somatskog bola korišćen je model inflamatornog bola; kao model visceralnog bola korišćen je test grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom, a kao model neuropatskog bola korišćen je model dijabetesne neuropatije.

**1.2.** Ispitati efekte lokalno periferno primenjenog levetiracetama u somatskom (inflamatornom) modelu bola u pacova.

**2. Ispitati mesto i mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama u somatskom (inflamatornom) modelu bola u pacova.**

**2.1.** Ispitati uticaj levetiracetama na GABA-ergičke receptore nakon sistemske i lokalne periferne primene levetiracetama i odgovarajućih antagonista.

**2.2.** Ispitati uticaj levetiracetama na opioidergičke receptore nakon sistemske i lokalne periferne primene levetiracetama i odgovarajućih antagonista.

**2.3.** Ispitati uticaj levetiracetama na  $\alpha_2$ -adrenergičke receptore nakon sistemske i lokalne periferne primene levetiracetama i odgovarajućih antagonista.

**2.4.** Ispitati uticaj levetiracetama na serotonergičke receptore nakon sistemske i lokalne periferne primene levetiracetama i odgovarajućih antagonista.

**2.5.** Ispitati uticaj levetiracetama na adenozienske receptore nakon sistemske i lokalne periferne primene levetiracetama i odgovarajućih antagonista.

**3. Ispitati efekte kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u somatskom (inflamatornom), visceralnom i neuropatskom modelu bola u pacova i miševa i utvrditi tip interakcije između komponenti.**

**3.1.** Ispitati efekte kombinovane primene levetiracetama sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom, ceftriaksonom i kofeinom u somatskom (inflamatornom) modelu bola u

pacova. Utvrditi tip interakcije (sinergizam, aditivnost ili antagonizam) između levetiracetama i ispitivanih analgetika u somatskom (inflamatornom) modelu bola u pacova.

**3.2.** Ispitati efekte kombinovane primene levetiracetama sa paracetamolom i ceftriaksonom u modelu visceralnog bola u miševa. Utvrditi tip interakcije (sinergizam, aditivnost ili antagonizam) između levetiracetama i ispitivanih analgetika u modelu visceralnog bola u miševa.

**3.3.** Ispitati efekte kombinovane primene levetiracetama sa ibuprofenom, paracetamolom, gabapentinom, duloksetinom i alfa-lipoinskom kiselinom u modelu neuropatskog bola (dijabetesna neuropatija) u miševa. Utvrditi tip interakcije (sinergizam, aditivnost ili antagonizam) između levetiracetama i ispitivanih analgetika u modelu neuropatskog bola u miševa.

**4. Ispitati uticaj antinociceptivnih doza levetiracetama na motornu koordinaciju pacova i miševa i proceniti bezbednost primene leka.**

---

### III MATERIJAL I METODE

#### 1. Čuvanje eksperimentalnih životinja

Eksperimenti su izvedeni na mužjacima pacova *Wistar* soja telesne mase 180-220 g, kao i mužjacima miševa soja *Swiss Webster* (outbred) mase 20-30 g i C57BL/6 (inbred) mase 18-30 g. Životinje su čuvane u vivarijumu pod standardnim laboratorijskim uslovima: temperatura od 20-25°C sa prirodnim ciklusom dan i noć (12/12 h) i relativna vlažnost vazduha od 60 %. Životinje su bile smeštene u specijalnim kavezima od pleksiglasa dimenzija 42,5x27x19cm<sup>3</sup>, sa žičanom rešetkom postavljenom odozgo. Kao podloga u kavezima korišćena je strugotina od drveta. U jednom kavezu bilo je smešteno po 10 miševa ili 4-5 pacova. Hrana (specijalni briketi za ishranu eksperimentalnih životinja, Vetzavod, Subotica) i voda bili su dostupni 24 h dnevno, osim tokom trajanja eksperimenta. Kako bi se navikle na uslove vivarijuma, sve životinje su boravile najmanje 3 dana pre početka eksperimenta u prostorijama vivarijuma. Na dan eksperimenta, životinje su iz vivarijuma prenošene u laboratoriju najmanje 1 h pre početka eksperimenta. Svi eksperimenti su izvođeni uvek u isto doba dana (od 8 do 16 h), kako bi se izbegle cirkadijalne varijacije u bihejvioralnim testovima.

Eksperimentalnu grupu činilo je 6-10 životinja. Za svaku vrstu eksperimenata postojala je kontrolna grupa koja je u istoj zapremini dobijala vehikulum za rastvaranje ili suspendovanje ispitivanih supstanci i bila je podvrgnuta istoj eksperimentalnoj proceduri. Svaka životinja je korišćena u eksperimentu samo jednom. Nakon izvršenog testiranja, životinje su žrtvovane akutnom intraperitonealnom primenom velike doze anestetika (tiopenton-natrijuma).

Sve eksperimentalne procedure odobrene su od strane Etičke komisije za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (br. dozvole 2/11). Prilikom rada sa eksperimentalnim životinjama i izvođenju eksperimenata primenjivani su etički principi definisani Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i etički principi NIH Vodiča za čuvanje i upotrebu laboratorijskih životinja (NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

## 2. Supstance korišćene u eksperimentima

U eksperimentima ispitivanja antinociceptivnog dejstva levetiracetama, korišćene su sledeće supstance:

- *levetiracetam* (Keppra®, UCB Pharma AG, Brisel, Belgija)
- *levetiracetam* (čista supstanca; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *karagenin* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *sirćetna kiselina* (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)
- *streptozotocin* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka).

U eksperimentima ispitivanja mehanizma antinociceptivnog dejstva levetiracetama korišćene su sledeće supstance:

- *levetiracetam* (Keppra®, UCB Pharma AG, Brisel, Belgija)
- *levetiracetam* (čista supstanca; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *bikukulin* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *bikukulin metil-jodid* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *nalokson hidrohlorid* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *CTAP* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *johimbin hidrohlorid* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *BRL 44408 maleat* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *MK-912 hidrat* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *metizergid maleat* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *GR 127935 hidrohlorid hidrat* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *kofein* (Galenika, Beograd, Srbija)
- *DPCPX (1,3-dipropil-8-ciklopentilksantin)* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *karagenin* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka).

U eksperimentima ispitivanja interakcija levetiracetama sa standardnim/alternativnim analgeticima korišćene su sledeće supstance:

- *levetiracetam* (Keppra®, UCB Pharma AG, Brisel, Belgija)
- *ibuprofen* (Pharmagen GmbH, Frankfurt, Nemačka)
- *celekoksib* (Celebrex®, Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH, Illertissen, Nemačka)
- *paracetamol* (Panadol®, GSK Dungarvan Ltd., Dungarvan, Irska)
- *ceftriakson* (Longaceph®, Galenika, Beograd, Srbija)
- *kofein* (Galenika, Beograd, Srbija)
- *gabapentin* (Neurontin®, Pfizer H.C.P. Corporation, New York, USA)
- *duloksetin* (Cymbalta®, Eli Lilly S.A. Vernier/Ženeva, Švajcarska)
- ( $\pm$ ) *alfa-lipoinna kiselina* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *karagenin* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka)
- *sirćetna kiselina* (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)
- *streptozotocin* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Minhen, Nemačka).

**Sistemska primena.** Levetiracetam, ibuprofen, celekoksib, paracetamol, gabapentin i duloksetin suspendovani su u destilovanoj vodi uz dodatak 1 kapi Tween-a 80 i homogenizovani na vorteks-mešalici u trajanju od 15 min. Suspenzije lekova primenjivane su peroralnim putem (p.o.) pomoću intragastrične sonde. Alfa-lipoinna kiselina (p.o.) je rastvarana u destilovanoj vodi uz dodatak par kapi 1M NaOH na ultrazvučnom kupatilu. Ceftriakson je rastvaran u fiziološkom rastvoru i primenjivan je intraperitonealnim putem (i.p.). Suspenzije/rastvori lekova pripremani su svakodnevno. Svi antagonisti (bikukulin, nalokson, johimbin, metizergid i kofein) su rastvarani u fiziološkom rastvoru, osim DPCPX koji je rastvaran u smeši rastvarača (93,75% fiziološki rastvor, 5% dimetilsulfoksid i 1,25% NaOH 1M). Sve supstance (p.o./i.p.) primenjivane su u finalnoj zapremini od 2 ml/kg telesne mase pacova i/ili 10 ml/kg telesne mase miševa. Karagenin (1% m/v) je dispergovan u fiziološkom rastvoru 24 h pre planiranog eksperimenta, a primenjivan je intraplantarno (i.pl.) u zapremini od 0,1 ml po šapi pacova, koristeći 1ml špric i iglu od 26 G (0,45x12 mm). Streptozotocin je, neposredno pre primene, rastvaran u sterilizovanom 0,03 mol/l citratnom puferu (pH = 4,5). Streptozotocin je davan miševima u dozi od 150 mg/kg (i.p.), u zapremini od 10 ml/kg telesne mase miševa.

**Lokalna periferna primena.** Sve supstance (levetiracetam, karagenin, bikukulin metiljodid, nalokson hidrohlorid, CTAP, metizergid maleat, GR 127935 hidrohlorid hidrat, johimbin hidrohlorid, BRL 44408 maleat, MK-912 hidrat, kofein i DPCPX) su rastvarane ili suspendovane u fiziološkom rastvoru i primenjivane i.pl. u zadnju šapu pacova, u konačnoj zapremini od 0,1 ml po šapi pacova. U svim eksperimentima leva šapa je injektovana neposredno pre desne.

### 3. Eksperimentalni modeli bola

U pretkliničkom ispitivanju efikasnosti potencijalnih analgetika, koriste se životinjski modeli odgovarajućeg tipa bola. Izvesnim postupkom izazivaju se promene u bolnom putu koje su karakteristične za određeni tip bola kod ljudi. Potom se primenjuju tzv. nociceptivni testovi kojima je moguće utvrditi da li ispitivana supstanca može da umanja osetljivost eksperimentalne životinje prema dejstvu neke nokse (npr. test pritiska na šapu pacova, test izmicanja repa miša pod uticajem toplote i sl.). Antinociceptivno dejstvo levetiracetama ispitivano je u modelu somatskog (inflamatornog), visceralnog i neuropatskog bola.

#### 3.1. Model somatskog bola – inflamatorni bol u pacova

Koristili smo model somatske inflamatorne hiperalgezije prethodno opisan od strane Tomić i sar. (2004).

##### 3.1.1. Izazivanje inflamacije

Inflamacija je izazivana i.pl. injekcijom karagenina u zadnju desnu šapu pacova, što je praćeno razvojem bolne preosetljivosti (hiperalgezije). Karageninska inflamacija je akutna, neimunska i visoko reproducibilna. Posredovana je oslobađanjem medijatora zapaljenja: inicijalno histamina i serotonina (5-hidroksitriptamina, 5-HT), a potom tahikinina, bradikinina i prostaglandina (PGE<sub>2</sub>), koji aktiviraju nociceptore i/ili povećavaju njihovu osetljivost u inflamiranom tkivu šape (Morris i sar., 2003).

### **3.1.2. Testiranje inflamatorne hiperalgezije**

Hiperalghezija i uticaj različitih tretmana na hiperalgheziju mereni su modifikovanim testom pritiska na zadnje šape pacova ("paw pressure test"). Test je izveden kao modifikacija metode koju su predstavili Randall i Sellito (1957), pri čemu je korišćen aparat za merenje pritiska (g), aplikovanih na zadnje šape pacova u cilju određivanja razlika između leve (neinflamirane) i desne (inflamirane) šape (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus D-79232, March-Hugstetten, Nemačka). Pacov se pridržava tako da se zadnjim šapama osloni na dve platforme koje su preko transdjusera povezane sa kućištem aparata. Blagim pokretom ruke eksperimentatora, pacov se gura na dole, sve dok se ne dostigne granična vrednost sile ("trigger level") od 100 g na jednoj od šapa. U tom trenutku čuje se zvučni signal, merenje se prekida, a na kontrolnoj ploči se očitava vrednost sila (pritiska), sa tačnošću od 0,1 g, aplikovanih na levu i desnu šapu. Granična vrednost sile od 100 g odabrana je tako da predstavlja blagi nociceptivni stimulus dovoljan da se detektuje nociceptivna hipersenzitivnost (hiperalgezija). Životinje štede bolnu (inflamiranu) šapu i punom snagom se oslanjaju na zdravu (neinflamiranu) šapu. Aparatom se mere pritisci oslanjanja na zdravu i šapu sa hiperalghezijom, a potom se izračunava razlika u pritiscima oslanjanja  $df$  (g), kao mera bolne preosetljivosti (hiperalgezije) izazvane inflamacijom (Tomić i sar., 2004):

$$df \text{ (g)} = \text{pritisak (g) aplikovan na zdravu šapu} - \text{pritisak (g) aplikovan na šapu sa hiperalghezijom.}$$

Merenje se ponavlja 4 puta uzastopno u svakoj vremenskoj tački, a srednja vrednost  $df$  (g) izračunata iz 4 merenja za svaku životinju ponaosob korišćena je u daljim izračunavanjima. Za supstance koje smanjuju razliku u pritiscima oslanjanja između zdrave šape i šape sa hiperalghezijom, u poređenju sa kontrolnom grupom, može se reći da imaju antihiperalghezijско dejstvo.

U ovom modelu bola ispitivali smo:

- efekte levetiracetama nakon sistemske i lokalne periferne primene
- uticaj različitih sistemski i lokalno periferno primenjenih antagonista na antihiperlgezijski efekat sistemski i lokalno periferno primenjenog levetiracetama
- efekte kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika.

### ***3.1.3. Ispitivanje antihiperlgezijskog efekta levetiracetama nakon sistemske i lokalne periferne primene***

Za ispitivanje *sistemskih efekata levetiracetama*, lek je primenjivan (p.o.) 60 min nakon indukcije inflamacije karageninom (i.pl.) (Slika 4B). Kontrolna grupa životinja je umesto ispitivane supstance dobila rastvarač (destilovana voda; p.o.) u istoj zapremini i karagenin (i.pl.) (Slika 4A). Bazalna merenja df (g) vršena su pre indukcije inflamacije i primene levetiracetama. Test merenja vršena su 30, 60, 90, 120, 180 i 240 min nakon p.o. primene levetiracetama.

Za ispitivanje *lokalnog perifernog antihiperlgezijskog dejstva levetiracetama*, lek i karagenin su aplikovani (i.pl.) u sklopu iste injekcije, u zadnju šapu pacova, neposredno nakon merenja bazalnih vrednosti df (g) (Slika 5A). Kontrolna grupa dobila je karagenin (i.pl.) u istoj zapremini i istom rastvaraču (Slika 5B). Da bi se isključili eventualni sistemski efekti levetiracetama nakon i.pl. primene, najveća ispitivana doza je primenjena kontralateralno (u levu, neinflamiranu šapu; i.pl.) odvojenoj grupi pacova (Slika 5C). Test merenja razlika u pritiscima oslanjanja vršena su 60, 90, 120, 150, 180, 240 i 300 min nakon i.pl. injekcija.

Za svaku ispitivanu dozu (sistemski ili lokalno periferno primenjenog) levetiracetama formirane su grupe od 6-8 pacova. Za određivanje ED<sub>50</sub> vrednosti, antihiperlgezijska aktivnost levetiracetama za svaku životinju izražena je kao procenat antihiperlgezijskog dejstva (%AH) računatog po formuli (Tomić i sar., 2004):

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



Ukoliko je  $df$  pojedinačne životinje u test grupi veće od srednje vrednosti  $df$  kontrole, računato je da je efekat 0%AH. Krive odnosa doze i efekta analizirane su korišćenjem metode linearne regresije.  $ED_{50}$  vrednost (doza leka koja ostvaruje 50 %AH) sa 95%-nim intervalima poverenja utvrđena je regresionom analizom linearnog dela odgovarajuće krive odnosa doze i efekta u vreme postizanja maksimalnog efekta (Tallarida i Murray, 1986).

### ***3.1.4. Ispitivanje efekata sistemski i lokalno periferno primenjenih antagonista GABA-ergičkih, opioidergičkih, adrenergičkih, serotonergičkih i adenozijskih receptora na antihiperalgezijski efekat sistemski i lokalno periferno primenjenog levetiracetama***

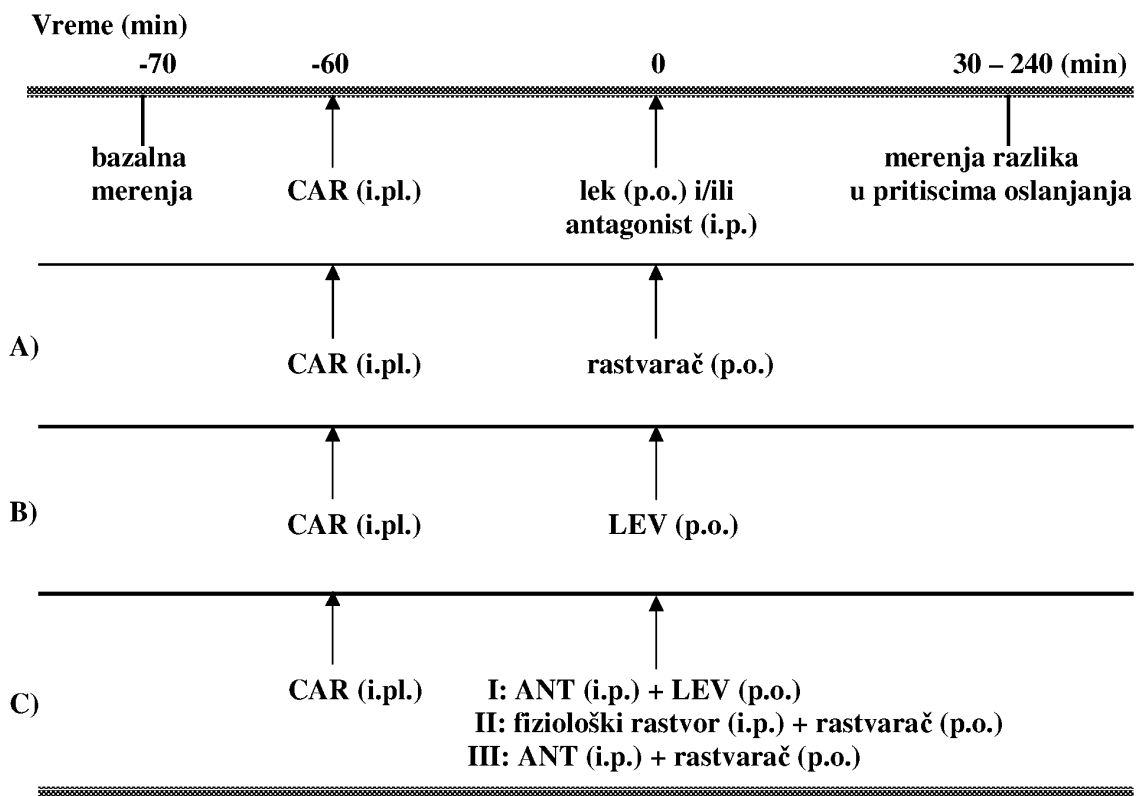
U cilju ispitivanja mehanizma antihiperalgezijskog dejstva levetiracetama, praćen je uticaj sledećih antagonista:

- **bikukulina**, selektivnog antagoniste  $GABA_A$  receptora
- **naloksona**, neselektivnog antagoniste opioidergičkih receptora
- **CTAP**, selektivnog antagoniste  $\mu$ -opioidergičkih receptora
- **johimbina**, selektivnog antagoniste  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora
- **BRL 44408**, selektivnog antagoniste  $\alpha_{2A}$ -adrenergičkih receptora
- **MK-912** selektivnog antagoniste  $\alpha_{2C}$ -adrenergičkih receptora
- **metizergida**, neselektivnog antagoniste serotonergičkih receptora
- **GR 127935**, selektivnog antagoniste 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora
- **kofeina**, neselektivnog antagoniste  $A_1$ ,  $A_{2A}$  i  $A_{2B}$  receptora
- **DPCPX**, selektivnog antagoniste  $A_1$  adenozijskih receptora.

Eksperimentalni protokoli za ispitivanje uticaja antagonista na antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama, kreirani su prema vremenskom toku karageninske hiperalgezije i antihiperalgezijskog dejstva levetiracetama, kao i farmakokinetičkim podacima za levetiracetam i antagoniste.

Za ispitivanje *sistemskog inhibitornog dejstva*, bikukulin, nalokson, metizergid i kofein (i.p.) primenjivani su neposredno pre primene p.o. levetiracetama, a johimbin i DPCPX (i.p.) 15 min pre leka (Slika 4C-I). Kontrolna grupa životinja, dobila je pored i.pl. injekcije karagenina i i.p. injekciju korišćenog rastvarača umesto rastvora antagonista, kao i rastvarač (p.o.) u istoj

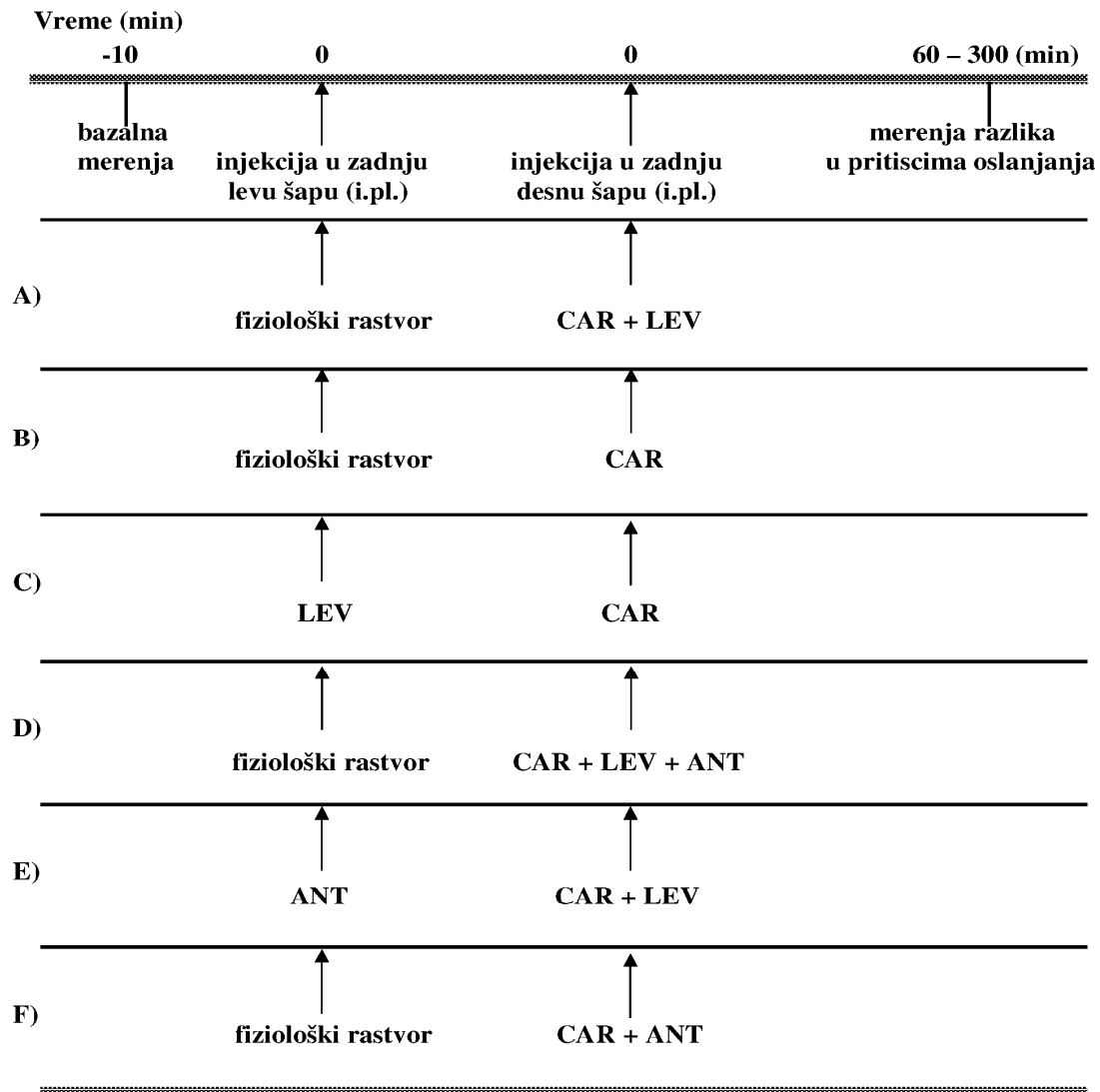
zapremeni umesto ispitivane supstance (Slika 4C-II). Takođe, da bi se utvrdilo da li ispitivani antagonisti imaju *per se* uticaj na mereni parametar  $df$  (g), ispitane su najveće korišćene doze antagonista, izostavljajući primenu levetiracetama (Slika 4C-III). Test merenja vršena su 30, 60, 90, 120, 180 i 240 min u odnosu na vreme primene levetiracetama.



**Slika 4.** Eksperimentalni protokol za ispitivanje hiperalgezije izazvane injekcijom karagenina (CAR) u zadnju šapu pacova (A), antihiperalgezijskog dejstva sistemski primenjenog levetiracetama (LEV)(B) i uticaja sistemski primenjenih antagonista (ANT) na sistemsko antihiperalgezijsko dejstvo LEV (C). ANT = antagonist: bikukulin, nalokson, johimbin, metizergid, kofein, DPCPX.

Za ispitivanje *inhibitornog* dejstva lokalno periferno primenjenih antagonista na lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama, u sastavu jedne injekcije (i.pl.) primenjivani su lek, karagenin i antagonisti (Slika 5D). Kontrolna grupa životinja dobila je samo i.pl. injekciju karagenina (Slika 5B), a poredbena grupa životinja i.pl. injekciju karagenina i levetiracetama u istoj zapremini i istom rastvaraču (Slika 5A). Da bi se isključili mogući sistemski efekti antagonista usled resorpcije sa mesta primene (i.pl.), posebne grupe životinja dobile su najveće ispitivane doze antagonista kontralateralno, tj. u levu šapu, neposredno pre injekcije karagenina i levetiracetama u desnu šapu (Figura 5E). Na kraju, ispitivano je da li antagonisti ostvaruju *per se*

dejstvo, na taj način što su najveće ispitivane doze antagonista primenjene istovremeno sa karageninom (i.pl.) bez levetiracetama (Slika 5F). Test merenja razlika u pritiscima oslanjanja vršena su 60, 90, 120, 150, 180, 240 i 300 min nakon i.pl. injekcija.



**Slika 5.** Eksperimentalni protokol za ispitivanje efekata lokalnog perifernog antihiperlgezijskog dejstva levetiracetama (**LEV**) (**A**), hiperlgezije izazvane injekcijom karagenina (**CAR**) u zadnju šapu pacova (**B**), efekata kontralateralno primenjenog **LEV** (**C**), uticaja lokalno periferno primenjenih antagonista (**ANT**) na lokalno periferno antihiperlgezijsko dejstvo **LEV** (**D**), uticaja kontralateralno primenjenih **ANT** na lokalno periferno antihiperlgezijsko dejstvo **LEV** (**E**) i uticaja **ANT** na hiperlgeziju izazvanu **CAR**. (**ANT** = antagonist: bikukulin metil-jodid; nalokson hidrohlorid, CTAP; metizergid maleat, GR 127935 hidrohlorid hidrat; johimbin hidrohlorid, BRL 44408 maleat, MK-912 hidrat; DPCPX i kofein).

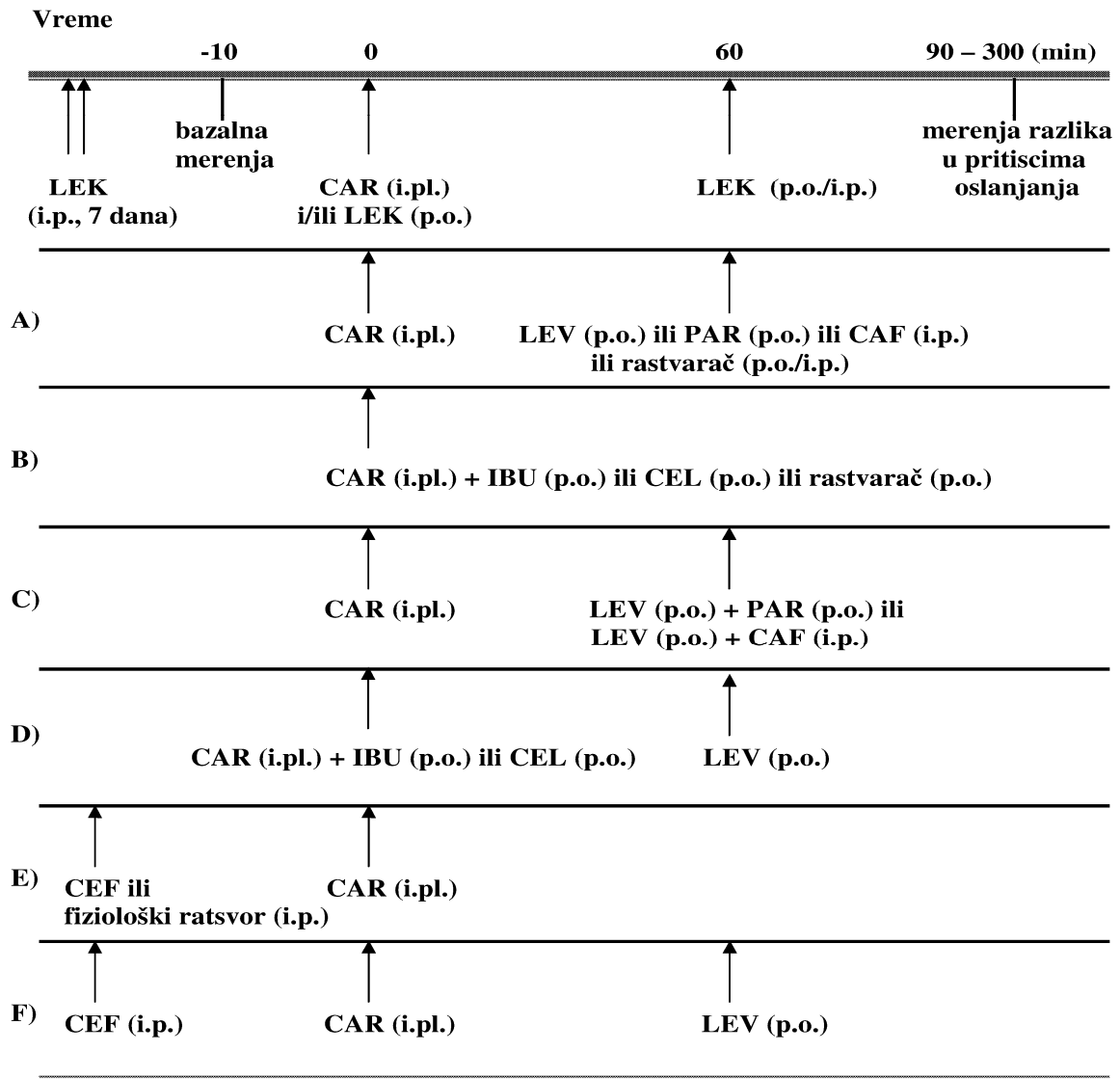
Ispitivane su po 3 doze svakog antagoniste (sistemske ili lokalno periferno primenjenog), a za svaku dozu antagoniste formirana je grupa od 6-8 životinja. Procenti inhibicije (%I) sistemske i lokalne perifernog antihiper-algezijskog dejstva levetiracetama od strane antagonista, računati su prema formuli (Tomić i sar., 2004):

$$\%I = 100 - (\%AH \text{ sa antagonistom} / \%AH \text{ bez antagoniste}) \times 100.$$

### ***3.1.5. Ispitivanje efekata kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika***

Za ispitivanje efekata kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u inflamatornom modelu bola u pacova korišćena je ista eksperimentalna procedura opisana kod ispitivanja antihiper-algezijskog dejstva levetiracetama nakon sistemske primene. Eksperimentalni protokol za ispitivanje interakcija postavljen je na bazi raspoloživih literaturnih podataka o vremenskom toku karageninske hiper-algezije (Morris, 2003) i vremenskom toku antihiper-algezijskog dejstva i/ili farmakokinetičkim karakteristikama ispitivanih lekova (Francischi i sar., 2002; Ardid i sar., 2003; Tomić i sar., 2004; Hu i sar., 2010; Tomić i sar., 2010a; Stepanović-Petrović i sar., 2011a). S tim u vezi, ibuprofen i celekoksib primenjivani su u isto vreme kada i karagenin (Slika 6B), dok su levetiracetam, paracetamol i kofein primenjivani jedan sat nakon karagenina (Slika 6A). Ceftriakson je primenjivan svakodnevno tokom 7 dana, a 8. dana je rađen eksperiment (Slika 6E). Najpre su ispitani efekti (4 doze) svakog leka ponaosob (Slika 6A, B i E), a potom i efekti dvokomponentnih kombinacija levetiracetama sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom, ceftriaksonom i kofeinom (Slika 6C, D i F). Svaka kombinacija ispitana je u 4 različite doze određene prema pravilima analize utvrđivanja tipa interakcije (videti poglavlje 5). Bazalna merenja df (g) izvršena su pre indukcije inflamacije, a test merenja 30, 60, 90, 120, 180 i 240 min nakon primene levetiracetama, paracetamola, kofeina i svih kombinacija lekova, dok su test merenja df (g) za ibuprofen i celekoksib, *per se*, vršena 90, 120, 150, 180, 240 i 300 min nakon njihove primene. Kontrolne grupe životinja testirane su tokom svih eksperimentalnih faza, a primile su odgovarajuće rastvarače (p.o./i.p.) umesto ispitivanih supstanci i karagenin (i.pl.) u istoj zapremini i istom rastvaraču. Za svaku dozu ispitivanog leka/kombinacije lekova formirane su grupe od 6-8 životinja.

Eksperimentalni protokol za ispitivanje efekata kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u inflamatornom modelu bola u pacova prikazan je na Slici 6.



**Slika 6.** Eksperimentalni protokol za ispitivanje antihiperalgezijskog dejstva: levetiracetama (*LEV*), paracetamola (*PAR*) i kofeina (*CAF*) (**A**), ibuprofena (*IBU*) i celekoksiba (*CEL*) (**B**), kombinacija *LEV* + *PAR* i *LEV* + *CAF* (**C**), kombinacije *LEV* + *IBU* i *LEV* + *CEL* (**D**), ceftriaksona (*CEF*) (**E**) i kombinacije *LEV* + *CEF* (**F**) u inflamatornom modelu bola u pacova.

### 3.2. Model visceralnog bola u miševa

#### 3.2.1. Test abdominalnih grčeva

Kao model visceralnog bola korišćen je test abdominalnih grčeva miševa ("writhing test"), izazvanih intraperitonealnom injekcijom rastvora sirćetne kiseline (0,75%, u zapremini od 10 ml/kg) (Tomić i sar., 2010a). Sirćetna kiselina izaziva stereotipno bolno ponašanje miševa (Swiss Webster, outbred) u vidu karakterističnih grčeva (izvijanje tela unazad sa opružanjem jedne ili obe zadnje šape) koji se mogu kvantifikovati (brojati) u određenom vremenskom intervalu. Brojanje grčeva (N) započinje 5 minuta nakon injiciranja sirćetne kiseline i traje narednih 15 minuta. Lek (ili kombinacija lekova) koji dovede do značajnog smanjenja broja grčeva, smatra se da je ostvario antinociceptivno dejstvo u testu abdominalnih grčeva u miševa.

U ovom modelu bola ispitivali smo:

- efekte levetiracetama nakon sistemske primene
- efekte kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika.

#### 3.2.2. Ispitivanje antinociceptivnog efekta levetiracetama i efekata kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika

Za ispitivanje antinociceptivnog efekta levetiracetama u testu abdominalnih grčeva u miševa, lek je primenjivan (p.o.) 55 minuta pre rastvora sirćetne kiseline, odnosno 60 min pre početka brojanja grčeva (Slika 7A). Kontrolna grupa životinja dobila je rastvarač (destilovanu vodu) (p.o.) umesto leka, pored rastvora sirćetne kiseline (i.p.). Da bismo izrazili smanjenje broja grčeva (N) u grupi životinja koje su dobile levetiracetam (ili neki drugi antinociceptivni tretman) u odnosu na kontrolnu grupu, procenat antinociceptivne aktivnosti (%AN) za svakog miša ponaosob računat je prema formuli (Tomić i sar., 2010a):

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

Ukoliko je N pojedinačne životinje u test grupi veći u odnosu na prosečnu vrednost grčeva u kontrolnoj grupi, smatrano je da ima 0% AN. Vrednosti ED<sub>50</sub> (doza ispitivane supstance koja daje 50% AN) sa 95%-nim intervalima poverenja računata su iz odgovarajućih krivih log doze-efekat pomoću kompjuterskog programa Pharm PCS (Tallarida i Murray, 1986) .

Za ispitivanje *interakcije levetiracetama sa paracetamolom i ceftriaksonom u testu abdominalnih grčeva u miševa*, najpre su ispitani efekti svakog leka ponaosob, pri čemu su levetiracetam (p.o.) i paracetamol (p.o.) primenjivani 55 minuta pre rastvora sirćetne kiseline (Slika 7A), dok je ceftriakson (i.p.) primenjivan svakodnevno tokom 7 dana, a 8. dana je rađen eksperiment (Slika 7B). Potom su ispitivani efekti kombinovane primene levetiracetama i paracetamola (Slika 7C) i levetiracetama i ceftriaksona (Slika 7D). Za svaki lek/kombinaciju lekova ispitane su 4 doze, a za svaku dozu ispitivanog leka/kombinacije lekova formirane su grupe od 6-10 životinja.

<b>A)</b>	<b>- 60</b>	<b>-5</b>	<b>0</b>	<b>15 (min)</b>
	↓	↓	<	<b>BROJANJE GRČEVA</b> >
	<b>LEV (p.o.) ili PAR (p.o.) ili rastvarač (p.o.)</b>	<b>sirćetna kiselina (i.p.)</b>		
<b>B)</b>		<b>-5</b>	<b>0</b>	<b>15 (min)</b>
↓		↓	<	<b>BROJANJE GRČEVA</b> >
<b>CEF ili rastvarač (i.p., 7 dana)</b>		<b>sirćetna kiselina (i.p.)</b>		
<b>C)</b>	<b>- 60</b>	<b>-5</b>	<b>0</b>	<b>15 (min)</b>
	↓	↓	<	<b>BROJANJE GRČEVA</b> >
	<b>LEV (p.o.) + PAR (p.o.)</b>	<b>sirćetna kiselina (i.p.)</b>		
<b>D)</b>	<b>- 60</b>	<b>-5</b>	<b>0</b>	<b>15 (min)</b>
↓	↓	↓	<	<b>BROJANJE GRČEVA</b> >
<b>CEF (i.p., 7 dana)</b>	<b>LEV (p.o.)</b>	<b>sirćetna kiselina (i.p.)</b>		

**Slika 7.** Eksperimentalni protokol za ispitivanje antinociceptivnog efekta levetiracetama (LEV) i paracetamola (PAR) (A), ceftriaksona (CEF) (B), kombinacija LEV + PAR (C) i LEV + CEF (D) u testu abdominalnih grčeva u miševa.

### **3.3. Model neuropatskog bola - dijabetesna neuropatija u miševa**

Kao model neuropatskog bola korišćen je model dijabetesne neuropatije u miševa opisan u radu Tomić i sar. (2010b), s tim da je izveden na drugom soju miševa (C57BL/6 umesto *Swiss Webster*).

#### **3.3.1. Indukcija dijabetesa i testiranje glikemije**

Dijabetes je indukovao intraperitonealnom (i.p.) injekcijom streptozotocina (150 mg/kg) (Slika 8A). Dve nedelje nakon injektovanja streptozotocina, testiran je razvoj dijabetesa merenjem koncentracije glukoze u krvi miševa korišćenjem automatskog merača glukoze u krvi (GlucoSure Plus, Apex Biotechnology Corp, Hsinchu, Taiwan) pomoću reagens traka sa glukoza oksidaza peroksidaza reagensom. Krv je uzorkovana iz retro-orbitalnog sinusa miševa pomoću heparinizirane kapilare. Miševi čija je koncentracija glukoze u krvi 2 h nakon obroka iznad 250 mg/dl (13,9 mmol/L) smatrani su dijabetičnim i korišćeni su u eksperimentima.

#### **3.3.2. Testiranje hiperalgezije**

Za testiranje razvoja hiperalgezije (bolne preosetljivosti) nakon indukcije dijabetesa korišćen je test izmicanja repa pod uticajem toplote ("tail flick test") (Le Bars, 2001; Tomić i sar., 2010b). Test se izvodi aplikovanjem toplotnog bolnog stimulusa na kožu repa miševa. Stimulus registruju površinski termoreceptori i nociceptori, a bolna reakcija životinje ogleda se u izmicanju repa, što je posledica aktivacije spinalnog refleksa, mada je sugerisan i uticaj viših nervnih centara (Le Bars, 2001; Tomić i sar., 2010b). Merni parametar je *reakciono vreme*, tj. vreme (u sekundama) koje protekne od trenutka izlaganja repa životinje toplotnom zračenju do trenutka kada životinja naglo izmakne rep, što ukazuje da je dostignut prag bola. Aparat (Hugo Sach Elektronik, Cat. No. 7360, March-Hugstetten, Nemačka) se sastoji od izvora infracrvenog toplotnog zračenja (50 W) sa mogućnošću podešavanja njegovog intenziteta. Radi lakšeg rada sa životinjama, ali i njihovog manjeg stresa, reakciona vremena su merena dok su životinje bile smeštene u odgovarajuće držače (perforirane plastične cilindre dijametra 3,2 cm i dužine 8 cm). Životinje su najpre trenirane da borave u držačima uzastopno 3 dana (po 30 min) uoči testiranja.



Prilikom merenja, toplotni zrak je bio usmeren na usko područje repa životinje (oko 4 cm udaljeno od vrha repa) kroz otvor na postolju aparata. Pritiskom na nožnu pedalu istovremeno se aktiviraju toplotni znak i štoperica. U trenutku dostizanja praga bola životinja naglim pokretom izmakne rep, što automatski zaustavlja toplotno zračenje i štopericu. Na kontrolnoj ploči aparata očitava se reakciono vreme (s) sa tačnošću od 0,1 s. Intenzitet toplotnog zračenja podešen je tako da bazalne vrednosti reakcionih vremena pre indukcije dijabetesa iznose 4-6 s. U slučaju da životinja ne izmakne rep do isteka 10 sekundi, izlaganje toploti se prekida da bi se sprečilo oštećenje tkiva ("cut off" vrednost).

U eksperimentalnom modelu dijabetesne neuropatije ispitivali smo:

- efekte levetiracetama nakon sistemske primene
- efekte kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika.

### ***3.3.3. Ispitivanje antinociceptivnog efekta levetiracetama i efekata kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika***

U eksperimentima ispitivanja antinociceptivnog efekta levetiracetama i efekata kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika učestvovali su hiperglikemični miševi koji su razvili hiperalgeziju. Kako bismo procenili stepen razvoja hiperalgezije, merena su bazalna reakciona vremena pre ( $t_{00}$ ) i 3 nedelje nakon ( $t_0$ ) indukcije dijabetesa u testu izmicanja repa miševa pod uticajem toplote. Najpre su merena bazalna reakciona vremena pre indukcije dijabetesa ( $t_{00}$ ) tako što su merenja ponavljana 3 puta u razmacima od 10 minuta. Srednja vrednost ovih merenja predstavlja  $t_{00}$  za svaku životinju (Slika 8). Tri nedelje (ili dve nedelje, u slučaju ispitivanja efekata alfa-lipoinse kiseline) nakon injekcije streptozotocina ponovo su merena reakciona vremena, kako bi se utvrdio uticaj dijabetesa na nocicepciju ( $t_0$ ). Procenat hiperalgezije (%HA) računat je prema sledećoj formuli:

$$\%HA = \frac{(t_0 - t_{00})}{(10 - t_{00})} \times 100,$$

gde je  $t_{00}$  bazalno reakciono vreme pre indukcije dijabetesa, a  $t_0$  bazalno reakciono vreme nakon indukcije dijabetesa. S obzirom da nakon indukcije dijabetesa usled razvoja hiperalgezije dolazi do skraćenja bazalnih reakcionih vremena ( $t_0 < t_{00}$ ), %HA ima negativan predznak.

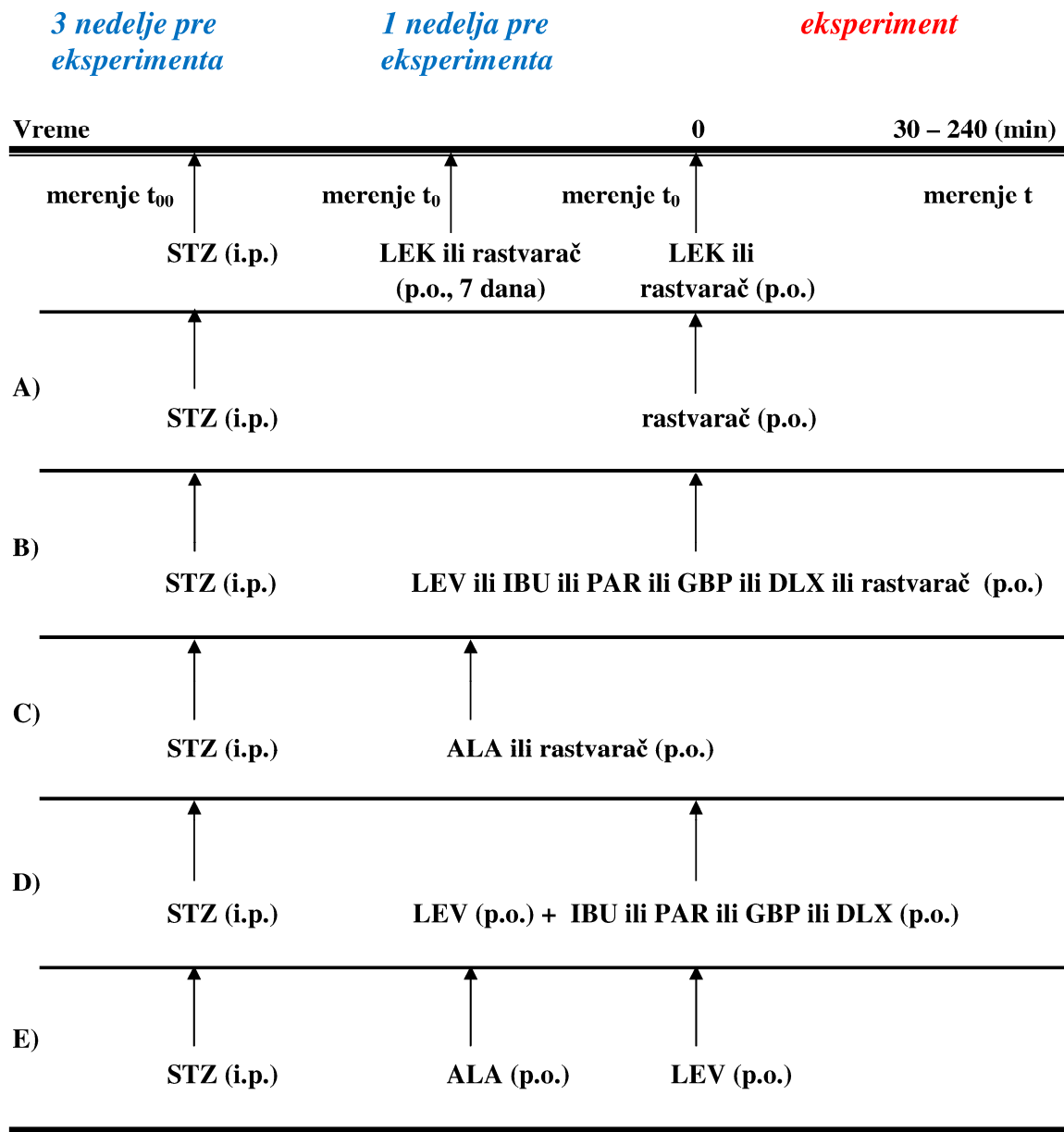
Potom su ispitivani efekti levetiracetama, ibuprofena, paracetamola, gabapentina, duloksetina, alfa lipoinske kiseline i dvojnih kombinacija levetiracetama sa navedenim analgeticima na hiperalgeziyu nastalu usled dijabetesa (streptozotocinom-indukovan dijabetes), prema eksperimentalnom protokolu prikazanom na Slici 8. Za svaki lek ispitane su 4 različite doze (Slika 8B i C). Svaka kombinacija ispitana je u 4 različite doze određene prema principima izoblografske analize (videti poglavlje 5) (Slika 8D i E). Lekovi/kombinacije lekova primenjivani/e su p.o. neposredno nakon merenja  $t_0$  (3 nedelje nakon indukcije dijabetesa), a reakciona vremena ( $t$ ) merena su 30, 60, 90, 120, 180 i 240 minuta nakon primene lekova/kombinacija lekova. Izuzetak je alfa-lipoinjska kiselina koja je primenjivana p.o. svakodnevno tokom 7 dana, počev od 14. dana u odnosu na injektovanje streptozotocina, tj. indukciju dijabetesa. Kontrolne grupe životinja dobile su rastvarač(e) (p.o.) u istoj zapremini umesto ispitivanih lekova/kombinacija lekova.

Antinociceptivni efekat ispitivanih lekova/kombinacija lekova izražen je kao procenat od maksimalne antinociceptivne aktivnosti (%MAA) računate prema formuli (Tomić i sar., 2010b):

$$\%MAA = \frac{(t - t_0)}{(10 - t_0)} \times 100,$$

gde je  $t$  reakciono vreme nakon davanja ispitivane supstance, a  $t_0$  bazalno reakciono vreme 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa. Ukoliko su vrednosti  $t$  manje od odgovarajućih  $t_0$ , smatra se da je %MAA jednak nuli, odnosno da ispitivana supstanca nije ispoljila antinociceptivni efekat.

Kontrolne i test-grupe sastojale su se od 6 do 10 miševa.  $ED_{50}$  vrednost (doza leka koja ostvaruje 50 %MAA) sa 95%-nim intervalima poverenja utvrđena je regresionom analizom linearnog dela odgovarajuće krive odnosa doze i efekta u vreme postizanja maksimalnog efekta (Tallarida i Murray, 1986).



**Slika 8.** Eksperimentalni protokol za ispitivanje: hiperalgezije izazvane streptozotocinom (STZ) (A); antinociceptivnog dejstva levetiracetama (LEV), ibuprofena (IBU), paracetamola (PAR), gabapentina (GBP), duloksetina (DLX) (B) i alfa-lipoinse kiseline (ALA) (C) i kombinacija LEV + IBU ili PAR ili GBP ili DLX (D) ili ALA (E) u dijabetesnoj neuropatiji u miševa.

#### 4. Test za procenu motorne spretnosti pacova i miševa

Test za procenu motorne sposobnosti izveden je kako bi se ispitao uticaj antinociceptivnih doza levetiracetama na motoriku eksperimentalnih životinja (pacova i miševa), a sa namerom da se ispita njegova bezbednost primene (Stepanović-Petrović i sar., 2008b; Rylander i sar., 2009). Motorna spretnost/ometenost je procenjivana na "rotarod" aparatu. Aparat (Treadmill for rats 47700/Treadmill for mice 7600, Ugo Basile, Milano, Italija) se sastoji od rotirajućeg vretena prečnika 3 cm (za miševe) i 5 cm (za pacove), podeljenog na pet odeljaka širine 5,5 cm (za miševe) i 9 cm (za pacove). Vreteno se okreće konstantnom brzinom od 15 obrtaja u minuti. Pacovi/miševi su trenirani 2 uzastopna dana pre eksperimenta da "voze" rotarod. Životinje koje će biti korišćene u eksperimentu odabirane su 24 h pre eksperimenta prema kriterijumu da ne padnu sa vretena tokom dva uzastopna perioda vožnje od po 180 s. Na dan eksperimenta životinje su još jednom testirane i samo one koje su zadovoljile navedeni kriterijum uključene su u eksperiment. Trideset minuta nakon inicijalnog testiranja na dan eksperimenta, ispitivana supstanca je primenjivana p.o., dok je kontrolna grupa životinja dobila rastvarač u istoj zapremini (p.o.). Vreme zadržavanja životinja na rotarodu (s) mereno je 60, 90, 120, 180 i 240 minuta nakon primene leka (Slika 9). Formirane se grupe od 6-10 životinja.

- 30	0	60	90	120	180	240 (min)	
↓	↓	<	<b>MERENJE VREMENA</b>				>
<b>inicijalno testiranje</b>	<b>levetiracetam (p.o.)</b>	<b>ZADRŽAVANJA NA ROTARODU</b>					

**Slika 9.** Eksperimentalni protokol za „rotarod” test.

Maksimalna dužina trajanja vožnje rotarod aparata ("cut-off") bila je 180 s. Za procenu motorne spretnosti korišćen je sledeći *kriterijum*: za životinje koje su uspele da se održe na rotirajućem vretenu 180 s smatrano je da nisu motorno onesposobljene.

## 5. Eksperimentalni dizajn i analiza podataka za utvrđivanje tipa interakcije između levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika

U zavisnosti od toga kakvu efikasnost ostvaruju lekovi *per se* u određenom eksperimentalnom modelu bola, a čija se interakcija ispituje prilikom kombinovane primene, korišćena su dva različita eksperimentalna dizajna i analize podataka za utvrđivanje tipa interakcije (sinergizam, aditivnost ili antagonizam).

- U slučaju da oba leka ostvaruju visoku analgetičku efikasnost i efekat ostvaruju na dozno-zavisan način (može da se odredi  $ED_{50}$ ), primenjuje se izobolografška analiza.
- U slučaju da jedan lek ima visoku, a drugi nisku analgetičku efikasnost i/ili efekat koji nije zavisn od doze (ne može da se odredi  $ED_{50}$ ), primenjuje se eksperimentalni dizajn i analiza opisani u daljem tekstu.

### 4.1. Izobolografška analiza

Izobolografška analiza primenjuje se za utvrđivanje tipa interakcije između dva leka visoke antinociceptivne/antihiperalgzijske aktivnosti. Ovu analizu opisali su Tallarida i sar. (1997) za lek A i lek B koji ostvaruju antinociceptivno/antihiperalgzijsko dejstvo u odgovarajućem eksperimentalnom modelu bola kao puni agonisti. Da bi se utvrdio tip interakcije između leka A i B koji su primenjeni u kombinaciji (A+B), prvo je bilo potrebno odrediti  $ED_{50}$  vrednosti lekova (doza koja ostvaruje 50% efekta) za svaki lek pojedinačno, pomoću odgovarajućih krivih odnosa log doze i efekta. Sledeći korak podrazumeva ispitivanja fiksnih kombinacija ekvi-efektivnih doza lekova A i B prema odgovarajućoj šemi, npr.  $1/16 ED_{50 \text{ LEK A}} + 1/16 ED_{50 \text{ LEK B}}$ ,  $1/8 ED_{50 \text{ LEK A}} + 1/8 ED_{50 \text{ LEK B}}$ ,  $1/4 ED_{50 \text{ LEK A}} + 1/4 ED_{50 \text{ LEK B}}$  i  $1/2 ED_{50 \text{ LEK A}} + 1/2 ED_{50 \text{ LEK B}}$ . Za svaku kombinaciju doza formirane su grupe od 6 do 10 životinja. Eksperimentalna srednja efektivna doza kombinacije ( $ED_{50 \text{ mix AB}}$ ), sastoji se iz odgovarajućih doza ispitivanih lekova A i B, koje se određuje na osnovu fiksnog masenog udela komponenti u kombinaciji.  $ED_{50 \text{ mix AB}}$  se određuje metodom linearne regresije iz krive odnosa log doze i efekta za ispitivanu kombinaciju. Zatim se  $ED_{50 \text{ mix AB}}$  statistički upoređuje sa teorijskom srednjom efektivnom dozom kombinacije ( $ED_{50 \text{ add AB}}$ ), koja se takođe sastoji iz odgovarajućih

doza ispitivanih lekova A i B, uz pretpostavku da se njihovi efekti sabiraju.  $ED_{50 \text{ add AB}}$  se izračunava prema formuli (Tallarida i sar., 1997):

$$ED_{50 \text{ add AB}} = f \times ED_{50 \text{ LEK A}} + (1-f) \times ED_{50 \text{ LEK B}},$$

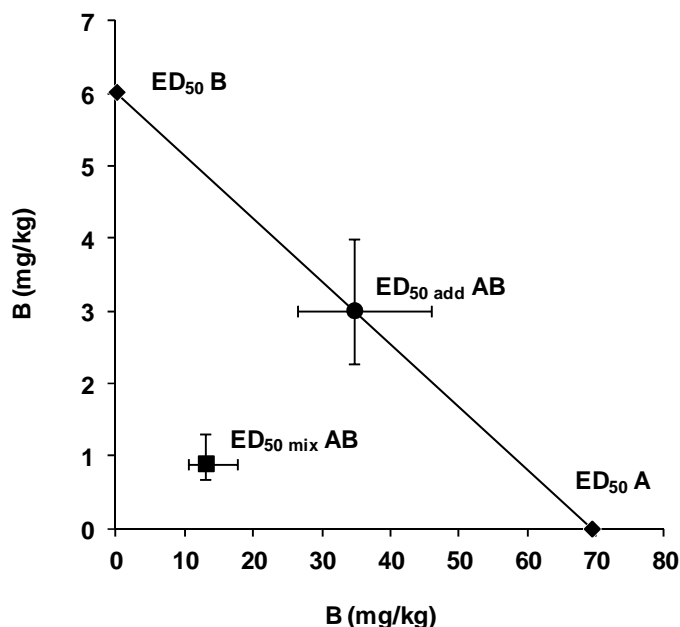
gde  $f$  označava frakciju  $ED_{50}$  leka u ispitivanoj kombinaciji. U korišćenom eksperimentalnom dizajnu  $f = 0,5$ .

U gornjoj jednačini,  $ED_{50 \text{ add AB}}$  je zbirna doza, a njena varijansa računa se kao:

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

Iz ovih varijansi, izračunavaju se 95%-ni intervali poverenja i razdvajaju na komponente prema udelu svakog leka u kombinaciji.

Supra-aditivna (sinergistička) interakcija detektuje se ako je efekat kombinacije lekova statistički značajno veći od teorijskog izračunatog ekvivalentnog efekta kombinacije lekova sa istim masenim udelom komponenti ( $ED_{50 \text{ mix AB}}$  značajno manja  $ED_{50 \text{ add AB}}$ ). Kada se  $ED_{50 \text{ mix AB}}$  ne razlikuje značajno od  $ED_{50 \text{ add AB}}$ , kombinacija ima aditivni efekat, a u slučaju da je  $ED_{50 \text{ mix AB}}$  statistički značajno veća od  $ED_{50 \text{ add AB}}$ , komponente A i B interaguju kao antagonisti (Tallarida i sar., 1997). Grafički prikaz rezultata izobolografske analize – izobologram (Slika 10) omogućava lakše tumačenje njenih rezultata.



**Slika 10.** Izobologram za lekove A i B koji ispoljavaju antinociceptivni/antihiperalgezijski efekat okarakterisan sa  $ED_{50 A}$  i  $ED_{50 B}$ . Kosa linija predstavlja liniju aditivnosti (spaja  $ED_{50 A}$  i  $ED_{50 B}$ ), a na njoj se nalazi aditivna srednja efektivna doza kombinacije ( $ED_{50 \text{ add AB}}$ ). Prema položaju eksperimentalno dobijene srednje efektivne doze kombinacije ( $ED_{50 \text{ mix AB}}$ ) u odnosu na liniju aditivnosti, tumači se karakter interakcije: 1) ako se  $ED_{50 \text{ mix AB}}$  poklapa sa linijom aditivnosti, odnosno ne razlikuje se značajno od  $ED_{50 \text{ add AB}}$ , interakcija je aditivna, 2) ako  $ED_{50 \text{ mix AB}}$  odstupa od linije aditivnosti i statistički se značajno razlikuje od  $ED_{50 \text{ add AB}}$ , a nalazi se ispod linije aditivnosti radi se o sinergizmu, a 3) ako se nalazi iznad linije aditivnosti i statistički se značajno razlikuje od  $ED_{50 \text{ add AB}}$ , radi se o antagonizmu (Tallarida i sar., 1997).

Dodatno, da bi se opisao intenzitet sinergizma među komponentama (prema kome je moguće rangirati ispitivane kombinacije), izračunava se indeks interakcije ( $\gamma$ ), prema formuli (Tallarida, 2002):

$$\gamma = \frac{ED_{50} A \text{ U KOMBINACIJI SA B}}{ED_{50} A + ED_{50} B} \text{ U KOMBINACIJI SA A} / ED_{50} B.$$

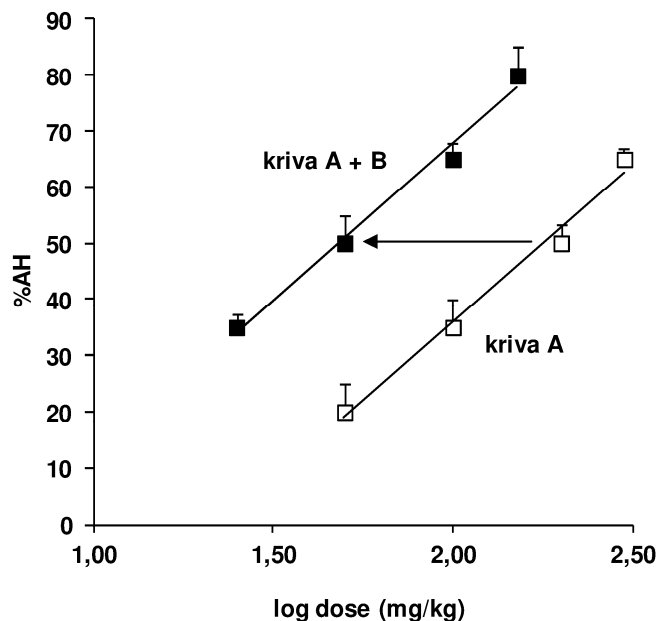
Indeks interakcije je kvantitativni pokazatelj za određenu kombinaciju lekova koji ukazuje na izmenjenu jačinu kombinacije. Vrednosti bliske 1, ukazuje na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonizam, dok vrednosti manje od 1 ukazuju na sinergističku interakciju između komponenti (Tallarida, 2002).

#### ***4.2. Analiza tipa interakcije leka sa visokom i leka sa niskom analgetičkom efikasnošću***

Interakcija između leka sa visokom (lek A) i leka sa niskom (lek B) antihiperalgezijskom efikasnošću ispitivana je na taj način što je istovremeno primenjivana fiksna, sub-efektivna doza leka sa nižom antihiperalgezijskom efikasnošću i rastuće doze leka koji je pokazao visoku antihiperalgezijsku efikasnost (Tomić i sar., 2010b). Najpre se za lek A odredi  $ED_{50}$  vrednost iz odgovarajuće krive odnosa log doze i efekta. Antihiperalgezijska efikasnost leka B se ispita u određenom doznom opsegu (prema literaturnim podacima) i za kombinovanje se odabere (mala) doza koja ne daje antihiperalgezijski efekat. U daljim eksperimentima ispituju se efekti kombinacija lekova A i B, sastavljenih od rastućih doza leka A i fiksne sub-efektivne doze leka B ( $ED_0 B$ ) (npr.  $1/8 ED_{50} A + ED_0 B$ ;  $1/4 ED_{50} A + ED_0 B$  i sl.). Za svaku kombinaciju formira se grupa od 6 do 10 životinja.

Zatim se statistički upoređuju regresiona kriva leka A primenjenog *per se* ("kriva A") i regresiona kriva leka A primenjenog u kombinaciji sa lekom B ("kriva A + B") (Slika 11). Ukoliko se te krive poklapaju, komponente ostvaruju aditivni efekat. U slučaju da postoji značajan pomak u levo "krive A + B" u odnosu na "krivu A", postoji potencijacija dejstva leka A u prisustvu leka B, tj. lekovi ostvaruju supra-aditivnu (sinergističku) interakciju. Konačno, ako se javi značajan pomak u desno, radi se o antagonizmu između lekova A i B (Tallarida, 2000). Pored toga, statistički se mogu uporediti  $ED_{50}$  vrednosti za lek A *per se* ( $ED_{50} A$ ) i za lek A primenjen zajedno sa fiksnom dozom leka B ( $ED_{50} A+B$ ). Ukoliko je  $ED_{50} A+B$  statistički

značajno manja u poređenju sa  $ED_{50}$  A, postoji potencijacija dejstva leka A u prisustvu leka B. Ovo poređenje vrši se primenom procedure za utvrđivanje odnosa jačina prema Tallarida i Murray (1986). Ukoliko 95%-ni intervali poveranja za odnos jačina ne uključuje 1, postoji značajna razlika između dve  $ED_{50}$  vrednosti.



**Slika 11.** Regresione krive odnosa log doze i antihiper-algezijskog efekta (%AH) leka A (kriva A) i leka A primenjenog u kombinaciji sa lekom B (kriva A+B). Ukoliko se detektuje značajan pomak krive A+B u desno, između lekova A i B postoji sinergizam u dejstvu. Ako se kriva A i kriva A+B poklapaju, interakcija je aditivna, a ako postoji značajan pomak krive A+B u desno u odnosu na krivu A, postoji antagonizam (Tallarida, 2000).

## 5. Analiza dužine trajanja dejstva lekova i kombinacija lekova

Za analizu dužine trajanja antinociceptivnog/antihiper-algezijskog efekta ispitivanih lekova/kombinacija lekova izračunavane su površine ispod krive (PIK) na čijoj apscisi je predstavljeno vreme (h ili min) nakon primene supstanci.

U modelu inflamatornog bola u pacova, na ordinati je predstavljena razlika u pritiscima oslanjanja između zdrave šape i šape sa hiper-algezijom - df (g), a na apscisi vreme (h). Zatim su izračunavane površine ispod krivih (PIK) primenom trapezoidnog pravila (Tallarida i Murray, 1986) i formirane razlike u PIK između kontrolne (grupa koja je dobila rastvarač(e) umesto ispitivane/ih supstance/i) i eksperimentalne grupe (grupa koja je dobila odgovarajući tretman, lek/kombinaciju lekova) ( $PIK_{kontrol} - PIK_{eksp}$ ), koje su direktno proporcionalne intenzitetu antihiper-algezijskog dejstva. Razlika između  $PIK_{kontrol}$  i  $PIK_{eksp}$  ( $\Delta PIK$ ), izražena je u funkciji procenta antihiper-algezijskog dejstva (%AH) određenog tretmana, postignutog u trenutku



maksimalnog efekta. Linearna zavisnost između ova dva parametra označava da je dužina trajanja dejstva primenjene doze leka/kombinacije lekova zavisna od doze (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).

U modelu dijabetesne neuropatije u miševa, na ordinati je predstavljena razlika između reakcionih vremena posle i pre davanja leka -  $t-t_0$  (Yaksh i sar., 1986), a na apscisi vreme (min). Kao i u prethodnom modelu, za svaku dozu leka/kombinacije lekova izračunavane su površine ispod krive (PIK) primenom trapezoidnog pravila (Tallarida i Murray, 1986). Zatim su dobijene PIK izražene u funkciji procenta od maksimalne antinociceptivne aktivnosti (%MAA). Linearna zavisnost između ova dva parametra označava da je dužina trajanja dejstva primenjene doze leka/kombinacije lekova zavisna od doze (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).

Nagibi dobijenih regresionih kriva ( $\Delta\text{PIK} = a \times \%AH + b$  i  $\text{PIK} = a \times \%MAA + b$ , gde je "a" nagib krive, a "b" odsečak na y-osi) su relativna mera dužine trajanja dejstva lekova/kombinacija lekova), tj. što je nagib veći, trajanje antinociceptivnog/antihiperalgzijskog dejstva je duže (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a). Ukoliko se nagibi  $\%AH-\Delta\text{PIK}/\%MAA-\text{PIK}$  regresionih kriva za dva tretmana ne razlikuju značajno, smatra se da imaju približno sličnu dužinu trajanja dejstva. Da li su razlike između nagiba krivih ispitivanih lekova/kombinacija lekova statistički značajne, procenjavano je testom paralelizma (Tallarida i Murray, 1986).

Dodatno, na bazi izračunatih koeficijenata korelacije za  $\%AH-\Delta\text{PIK}$  i  $\%MAA-\text{PIK}$  regresione krive procenjuje se da li je dužina trajanja dejstva lekova/kombinacija lekova dozno-zavisna (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).

## 6. Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (standardna greška) u grupi od 6-10 životinja. Pri statističkoj obradi rezultata korišćeni su sledeći računarski programi: Pharm PCS (Pharmacological Calculation System) (Micro-Computer Specialists, Philadelphia, PA, USA), Pharm Tools Pro (The McCary Group, Schnecksville, PA, USA), SPSS 18 za Windows i Microsoft Excel.

*Pharm PCS* program korišćen je za izračunavanje: ED<sub>50</sub> vrednosti sa 95% intervalima poverenja, površina ispod krivih (trapezoidno pravilo) i odnosa jačina između dva leka.

Programom *Pharm Tools Pro* određivana je vrsta interakcije između lekova (sinergizam/aditivnost), rađena je ANOVA u linearnoj regresiji uz odgovarajući post hoc test (Bonferroni i Tukey HSD test), Kruskal-Wallis test i test paralelizma.

Pri statističkoj obradi rezultata korišćeni su sledeći statistički testovi: jednofaktorska ANOVA, Bonferroni i Tukey HSD test, Studentov *t*-test, Kruskal-Wallis i Mann Whitney U test.

## IV REZULTATI

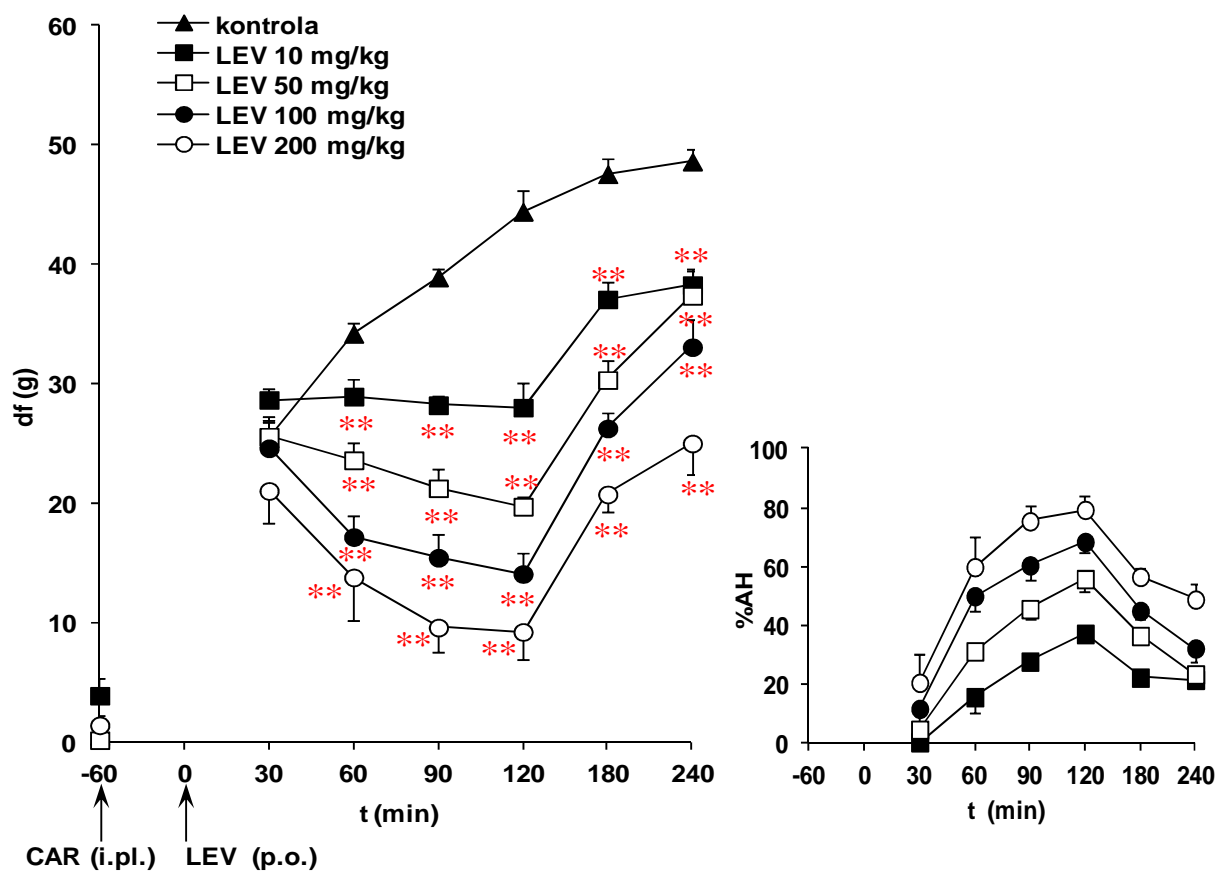
### 1. Efekti levetiracetama u eksperimentalnim modelima bola u pacova i miševa

Dejstvo levetiracetama je ispitivano u modelima somatskog (infamatornog), visceralnog i neuropatskog bola u pacova i miševa.

#### *1.1. Efekat levetiracetama u modelu inflamatornog bola u pacova nakon sistemske i lokalne periferne primene*

U modelu somatskog inflamatornog bola u pacova, levetiracetam je ispoljio statistički značajno i dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo nakon sistemske i lokalne periferne primene.

Nakon *sistemske primene* levetiracetam (10-200 mg/kg; p.o.) je dozno-zavisno smanjio razliku u pritiscima oslanjanja između zdrave šape i šape sa hiperalgezijom, df (g), u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 12 – veliki grafikon). Maksimum antihiperalgezijskog dejstva (%AH) levetiracetam postiže 120 min nakon p.o. primene, a odgovarajući %AH iznose 36,94%, 55,62%, 68,32% i 79,26% za doze levetiracetama od 10, 50, 100 i 200 mg/kg, redom (Slika 12 – mali grafikon). Kriva odnosa log doze i efekta levetiracetama konstruisana za vrednosti maksimalnog %AH ima visok koeficijent korelacije ( $r = 0,994$ ; Slike 29A, 31A, 33A i 35A). Srednja efektivna doza levetiracetama, nakon sistemske primene, u trenutku maksimalnog efekta iznosi  $27,59 \pm 2,72$  (18,03 – 42,21) mg/kg (Tabele 5-8). Dužina trajanja dejstva levetiracetama zavisna je od doze, jer kriva odnosa antihiperalgezijskog dejstva (%AH) i razlike površina ispod krivih kontrolne i eksperimentalne grupe ( $\Delta$ PIK) ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,995$ ; nije prikazano) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).

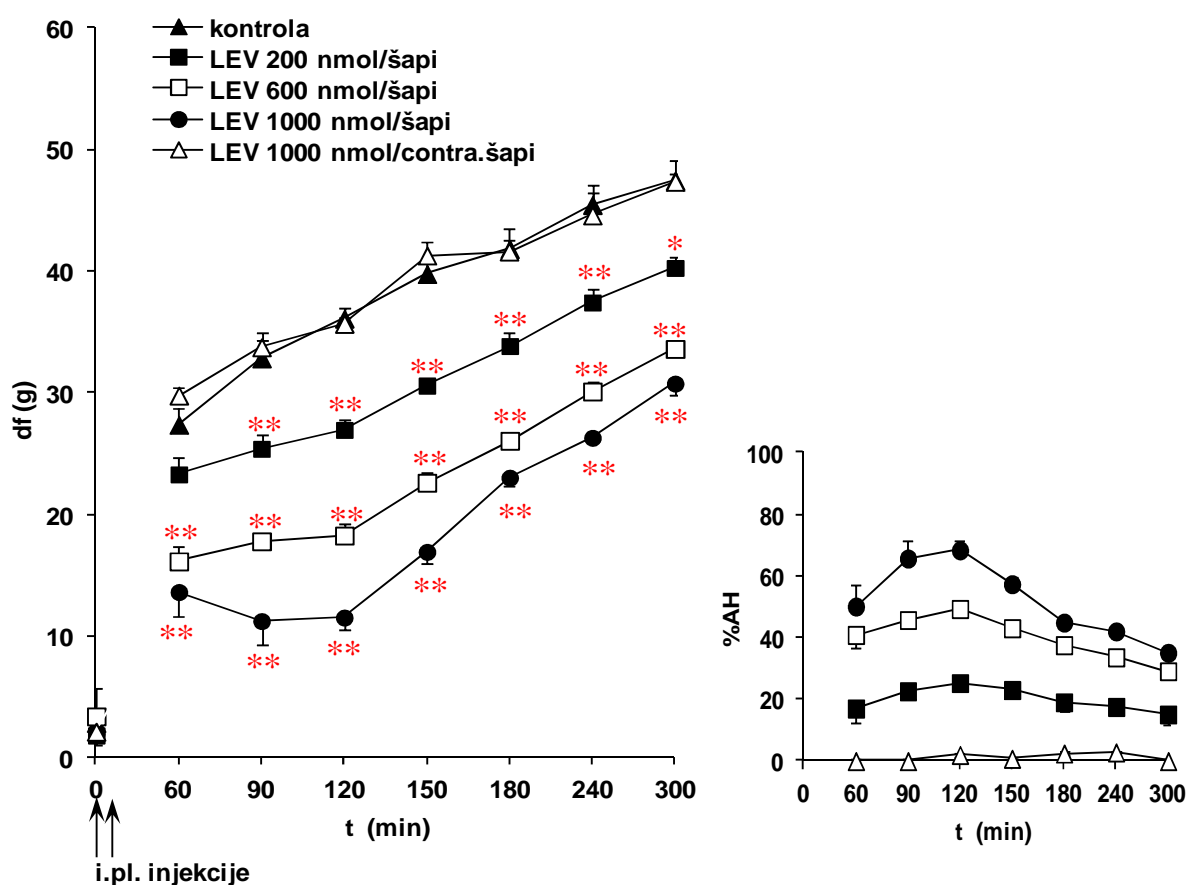


**Slika 12.** Vremenski tok sistemskeg antihiperlgezijskog dejstva levetiracetama (LEV), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperlgezijom,  $df$  (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije intraplantarnom injekcijom (i.pl.) karagenina (CAR), dok je LEV primenjen peroralno (p.o.) 60 min nakon CAR (označeno strelicama). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja,  $df$  (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolu.

**Manji grafikon:** Vremenski tok antihiperlgezijskog dejstva LEV izraženog kao procenat antihiperlgezijskog dejstva (%AH). Za simbole videti veliki grafikon.

Nakon lokalne periferne primene levetiracetama (200-1000 nmol/šapi; i.pl.) zajedno sa karageninom, zabeleženo je statistički značajno i dozno-zavisno smanjenje razlike u pritiscima oslanjanja između zdrave šape i šape sa hiperlgezijom,  $df$  (g), u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 13 – veliki grafikon). Sve ispitivane doze postigle su maksimalan antihiperlgezijski efekat (%AH) 120 min nakon i.pl. primene, a odgovarajući %AH iznose 25,31%, 49,38% i 68,40% za doze levetiracetama od 200, 600 i 1000 nmol/šapi, redom (Slika 13 - mali grafikon). Kriva odnosa log doze i efekta levetiracetama

konstruisana za vrednosti maksimalnog %AH ima visok koeficijent korelacije ( $r = 0,989$ ; nije prikazano). Odgovarajuća  $ED_{50}$  vrednost  $\pm$  SEM (95%-ni interval poverenja) određena u trenutku maksimalnog efekta ispitivanih doza iznosi  $538,93 \pm 51,48$  (159,91 – 1816,32) nmol/šapi. Efekti levetiracetama su lokalne prirode, s obzirom da je izostao efekat najveće ispitivane doze levetiracetama (1000 nmol/šapi) primenjene kontralateralno, u zdravu šapu pacova ( $p > 0,05$ ; Student  $t$ -test) (Slika 13).

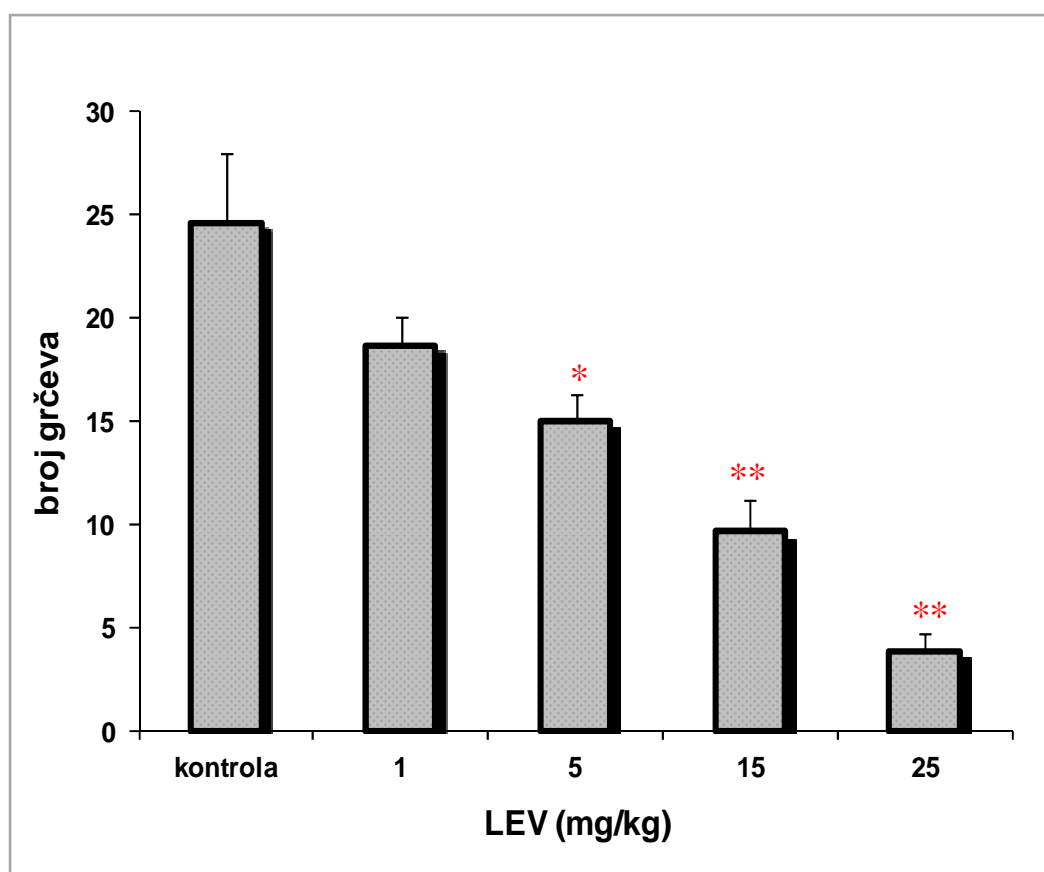


**Slika 13.** Vremenski tok lokalnog perifernog antihiperlgezijskog dejstva levetiracetama (LEV), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperlgezijom,  $df$  (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre intraplantarnih (i.pl.) injekcija (označeno strelicama). LEV je primenjen istovremeno sa karageninom (CAR) u sklopu jedne injekcije (i.pl.). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja,  $df$  (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolu. contra = kontralateralno.

**Manji grafikon:** Vremenski tok lokalnog perifernog antihiperlgezijskog dejstva LEV izraženog kao procenat antihiperlgezijskog dejstva (%AH). Za simbole videti veliki grafikon.

## 1.2. Efekat levetiracetama u modelu visceralnog bola u miševa

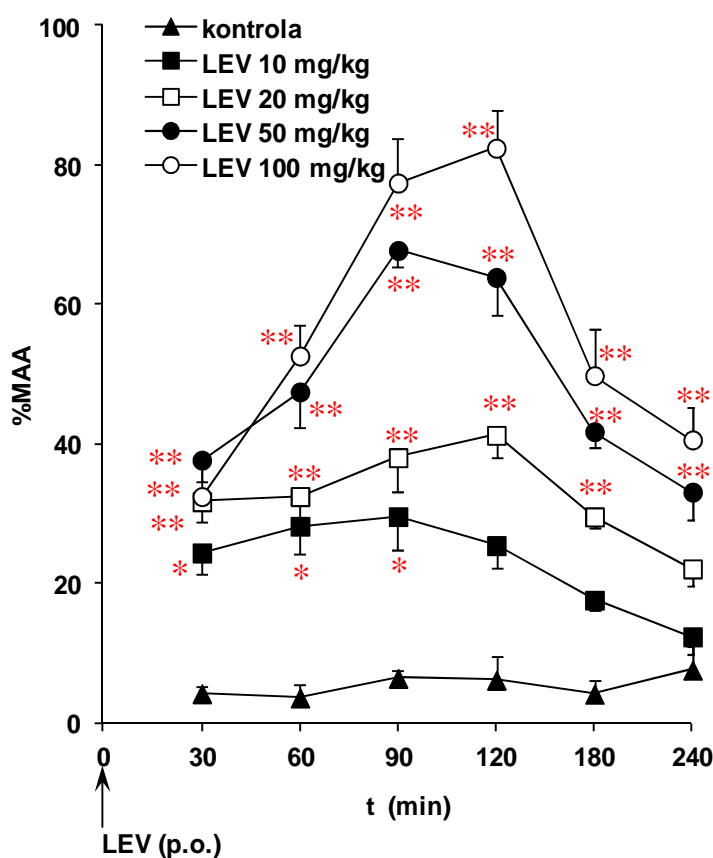
U testu abdominalnih grčeva u miševa, levetiracetam (1-25 mg/kg; p.o.) je statistički značajno i dozno-zavisno smanjio broj abdominalnih grčeva (N) u odnosu na kontrolu, grupu miševa koja je dobila rastvor sirćetne kiseline i rastvarač (p.o.) umesto leka ( $p < 0,01$ ; Kruskal-Wallis test) (Slika 14). Antinociceptivni efekat levetiracetama izražen u procentima iznosi 25,63% (1 mg/kg; p.o.), 38,89% (5 mg/kg; p.o.), 61,07% (15 mg/kg; p.o.) i 80% (25 mg/kg; p.o.) (nije prikazano). Kriva odnosa log doze i antinociceptivnog efekta levetiracetama ima visok koeficijent korelacije ( $r = 0,956$ ; Slike 41A i 43A). Odgovarajuća  $ED_{50}$  vrednost  $\pm$  SEM (95%-ni interval poverenja) iznosi  $6,03 \pm 1,61$  (1,90-19,13) mg/kg (Tabele 9 i 10).



**Slika 14.** Antinociceptivno dejstvo levetiracetama (LEV), izraženo kao broj grčeva izazvanih intraperitonealnom injekcijom rastvora sirćetne kiseline. LEV je primenjen per os 55 minuta pre rastvora sirćetne kiseline. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Kruskal-Wallis potom Mann-Whitney U test) određena je u odnosu na kontrolu.

### 1.3. Efekat levetiracetama u modelu dijabetesne neuropatije u miševa

U testu izmicanja repa pod uticajem toplote kod dijabetičnih miševa, levetiracetam (10-100 mg/kg; p.o.) ostvario je statistički značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja koja je dobila rastvarač (p.o.) umesto leka ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 15). Maksimum antinociceptivnog dejstva (%MAA) levetiracetam postiže 90-120 min nakon p.o. primene, a odgovarajući %MAA iznose 29,59%, 41,26%, 67,79% i 82,47% za doze od 10, 20, 50 i 100 mg/kg, redom (Slika 15). Kriva odnosa log doze i efekta levetiracetama (%MAA) u trenutku maksimalnog efekta ispitivanih doza pokazuje visok stepen linearne korelacije ( $r = 0,996$ ; Slike 47A, 49A, 51A, 53A i 55A). Srednja efektivna doza (95%-ni interval poverenja) levetiracetama u dijabetesnoj neuropatiji iznosi  $25,33 \pm 1,52$  (19,28 – 34,50) mg/kg (Tabele 12-16). Dužina trajanja dejstva levetiracetama zavisna je od doze, jer kriva odnosa antinociceptivnog dejstva (%MAA) i površine ispod krive (PIK) ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,995$ ; nije prikazano) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 15.** Vremenski tok antinociceptivnog dejstva levetiracetama (LEV), nakon peroralne primene (p.o.) (označeno strelicom) u dijabetičnih miševa, izraženog kao procenat od maksimalne antinociceptivne aktivnosti (%MAA). Antinociceptivno dejstvo mereno je u testu izmicanja repa pod uticajem toplote. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu miševa.

## 2. Mehanizam antihiperalgezijskog efekta levetiracetama u modelu inflamatornog bola u pacova

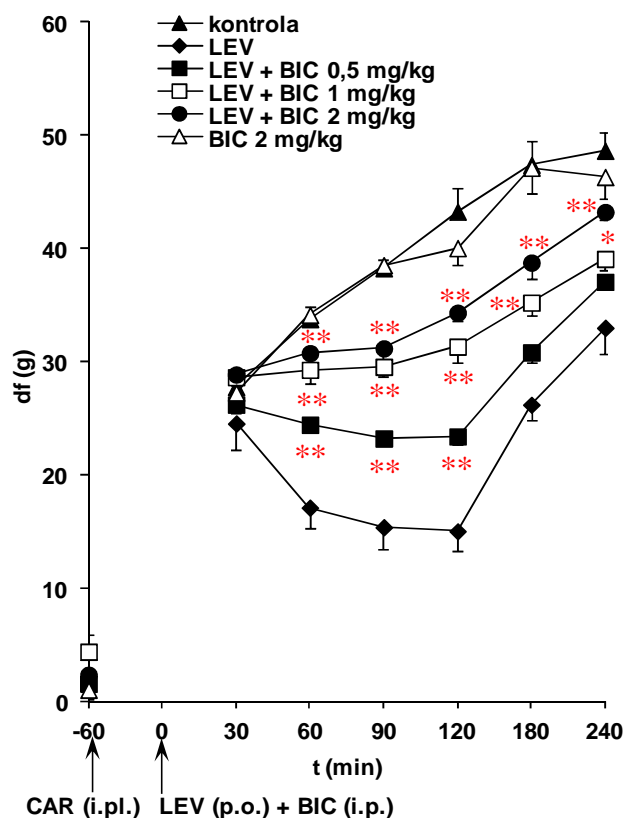
Da bismo ispitali da li levetiracetam deluje preko GABA<sub>A</sub>, opioidergičkih,  $\alpha_2$ -adrenergičkih, serotonergičkih i adenozijskih receptora i na kom nivou (centralni i/ili periferni nervni sistem), pratili smo uticaj sistemski i lokalno periferno primenjenih antagonista pomenutih receptora na sistemsko i lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama u inflamatornom modelu bola u pacova.

### 2.1. Uticaj antagonista GABA-ergičkih receptora na antihiperalgezijski efekat levetiracetama

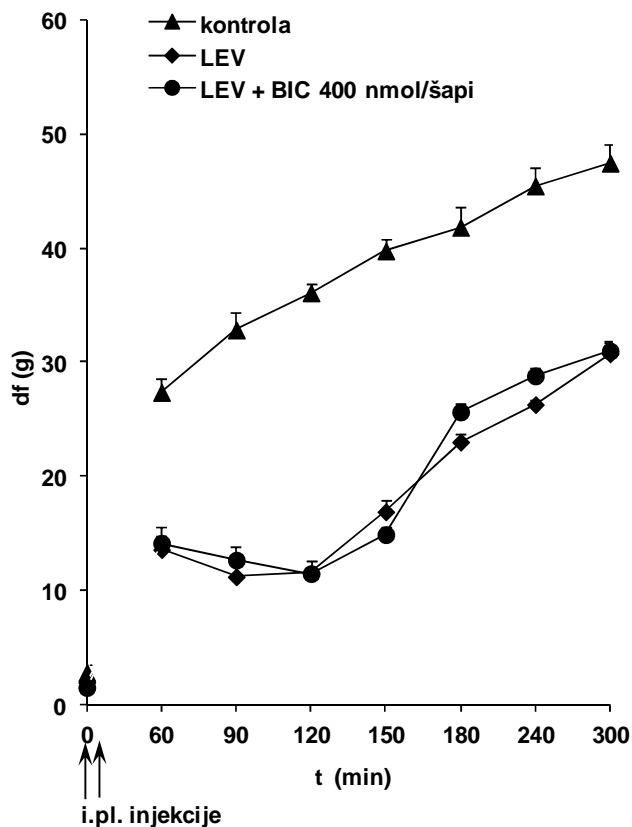
*Sistemski primenjen bikukulin*, selektivni GABA<sub>A</sub> antagonist (0,5-2 mg/kg; i.p.), statistički je značajno i dozno-zavisno smanjio antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 16). Maksimum inhibitornog dejstva (%I) bikukulina na antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama postiže se 60 min nakon i.p. primene, a odgovarajući %I iznose 44,50% (0,5 mg/kg; i.p.), 73,37% (1 mg/kg; i.p.) i 86,49% (2 mg/kg; i.p.) (nije prikazano). Bikukulin, *per se*, u najvećoj ispitivanoj dozi (2 mg/kg; i.p.) nije ostvario uticaj na hiperalgeziju izazvanu karageninom u inflamatornom modelu bola u pacova ( $p > 0,05$ ; Studentov *t*-test) (Slika 16).

Nakon *lokalne periferne primene*, bikukulin (400 nmol/šapi; i.pl.) nije statistički značajno uticao na lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (1000 nmol/šapi; i.pl.) ( $p > 0,05$ ; Studentov *t*-test) (Slika 16). Bikukulin, primenjen *per se* u najvećoj ispitivanoj dozi, nije uticao na hiperalgeziju izazvanu karageninom u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p > 0,05$ ; Studentov *t*-test) (nije prikazano).





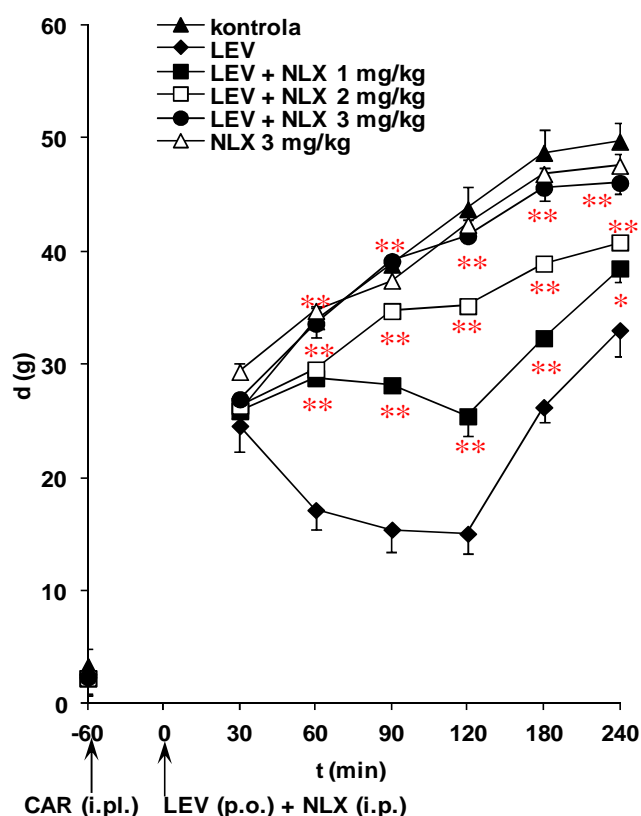
**Slika 16.** Vremenski tok inhibitornog dejstva sistemski primenjenog bikukulina (**BIC**) na sistemsko antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (**LEV**), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom, *df* (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije intraplantarnom injekcijom (*i.pl.*) karagenina (**CAR**), dok su **BIC** (*i.p.*) i **LEV** (100 mg/kg; *p.o.*) primenjeni 60 min nakon **CAR** (označeno strelicama). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, *df* (g), u grupi od 6 do 8 pacova. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Bonferroni test) određena je u odnosu na krivu za **LEV**.



**Slika 17.** Odsustvo inhibitornog dejstva lokalno periferno primenjenog bikukulina (**BIC**) na lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (**LEV**), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom, *df* (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre intraplantarnih (*i.pl.*) injekcija (označeno strelicama). **BIC** (*i.pl.*) i **LEV** (1000 nmol/šapi; *i.pl.*) primenjeni su istovremeno sa karageninom (**CAR**), u sklopu jedne injekcije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, *df* (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Ne postoji statistički značajna razlika između krivih **LEV** vs **LEV** + **BIC** 400 nmol/šapi ( $p > 0,05$ ; Studentov *t*-test).

## 2.2. Uticaj antagonista opioidergičkih receptora na antihiperalgezijski efekat levetiracetama

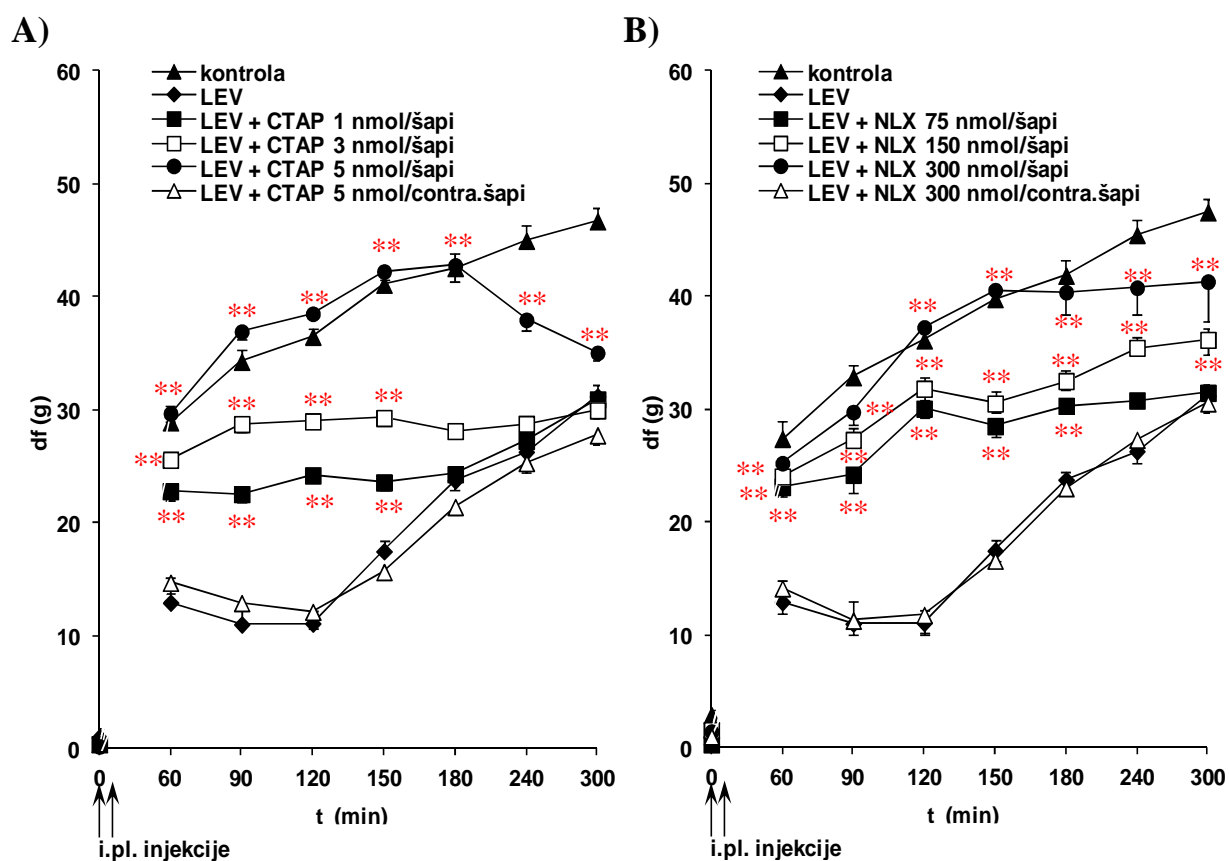
Sistemski primenjen nalokson, neselektivni antagonist opioidergičkih receptora (1-3 mg/kg; i.p.), izazvao je statistički značajno i dozno-zavisno smanjenje antihiperalgezijskog dejstva levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 17). Maksimalno inhibitorno dejstvo (%I) nalokson postiže 60-90 minuta nakon i.p. primene, a odgovarajući %I iznose 70,27% (1 mg/kg; i.p.), 82,49% (2 mg/kg; i.p.) i 100% (3 mg/kg; i.p.) (nije prikazano). Najveća ispitivana doza naloksona (3 mg/kg; i.p.) nije ostvarila značajan uticaj na hiperalgeziju izazvanu karageninom u ovom modelu bola u pacova ( $p > 0,05$ ; Studentov  $t$ -test) (Slika 18).



**Slika 18.** Vremenski tok inhibitornog dejstva sistemski primenjenog naloksona (NLX) na sistemsko antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (LEV), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom,  $df$  (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije intraplantarnom injekcijom (i.pl.) karagenina (CAR), dok su BIC (i.p.) i LEV (100 mg/kg; p.o.) primenjeni 60 min nakon CAR (označeno strelicama). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja,  $df$  (g), u grupi od 6 do 8 pacova. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Bonferroni test) određena je u odnosu na krivu za LEV.

Istovremena primena naloksona (neselektivnog antagoniste opioidergičkih receptora) (75-300 nmol/šapi; i.pl.) ili CTAP (selektivnog antagoniste  $\mu$ -opioidergičkih receptora) (1-5 nmol/šapi; i.pl.) sa levetiracetamom (1000 nmol/šapi; i.pl.) u zadnju šapu pacova izazvala je značajno i dozno-zavisno smanjenje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva

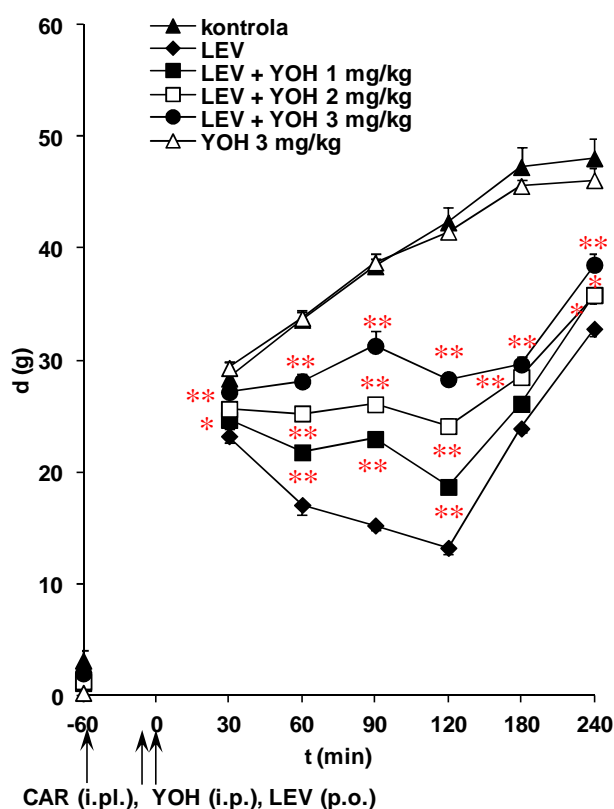
levetiracetama ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 19A i B). Maksimalno inhibitorno dejstvo (%I) nalokson postiže 120 minuta nakon i.pl. primene, uz odgovarajuće %I od 75,50%, 82,68% i 100% za doze naloksona od 75, 150 i 300 nmol/šapi, redom (nije prikazano). CTAP ostvaruje najveću inhibiciju antihiperalgzijskog dejstva levetiracetama 90-120 minuta nakon i.pl. primene, uz %I od 51,44%, 75,80% i 100% za doze CTAP od 1, 3 i 5 nmol/šapi, redom (nije prikazano). Efekti naloksona i CTAP su lokalne prirode, jer injekcija najvećih ispitivanih doza antagonista u zdravu šapu nije ostvarila inhibitorno dejstvo (Slika 19A i B). Nalokson i CTAP, primenjeni *per se* u najvećim ispitivanim dozama, nisu uticali na hiperalgziju izazvanu karageninom ( $p > 0,05$ ; Studentov  $t$ -test) (nije prikazano).



**Slika 19.** Vremenski tok inhibitornog dejstva lokalno periferno primenjenih antagonista opioidergičkih receptora, naloksona (NLX) (A) i CTAP (B) na lokalno periferno antihiperalgzijsko dejstvo levetiracetama (LEV), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgzijom, df (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre intraplantarnih (i.pl.) injekcija (označeno strelicama). NLX (i.pl.) ili CTAP (i.pl.) primenjeni su istovremeno sa LEV (1000 nmol/šapi; i.pl.) i karageninom (CAR) (i.pl.), u sklopu jedne injekcije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, df (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na krivu za LEV. contra. = kontralateralno.

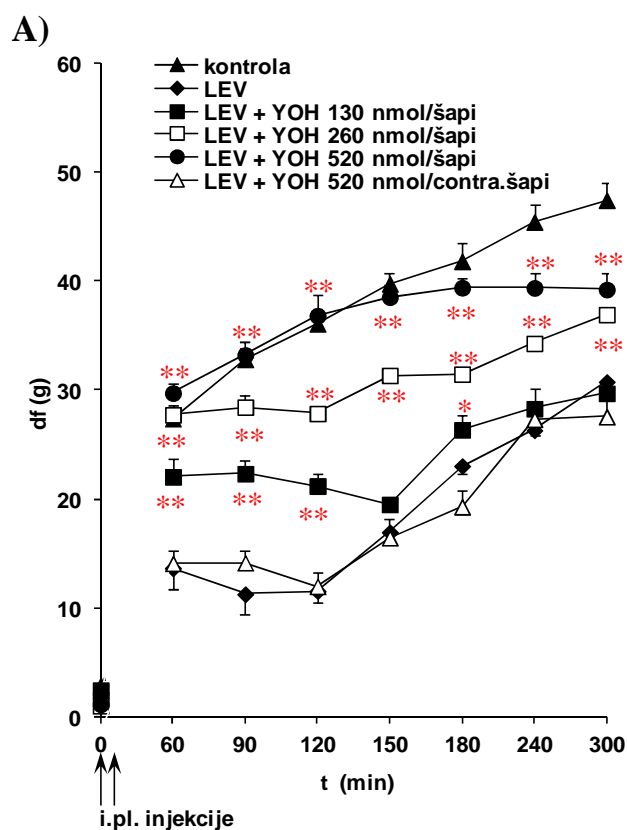
### 2.3. Uticaj antagonista adrenergičkih receptora na antihiperalgezijski efekat levetiracetama

Sistemska primena johimbina, selektivnog antagoniste  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora (1-3 mg/kg; i.p.), značajno je smanjila antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 20). Johimbin je dozno-zavisno inhibirao antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama. Maksimalno inhibitorno dejstvo johimbin postiže 90 minuta nakon i.p. primene, a odgovarajući procenti inhibicije iznose 51,33% (1 mg/kg; i.p.), 79,60% (2 mg/kg; i.p.) i 100% (3 mg/kg; i.p.) (nije prikazano). Najveća ispitivana sistemska doza johimbina (3 mg/kg; i.p.) nije ostvarila značajan uticaj na hiperalgeziju izazvanu karageninom u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p > 0,05$ ; Studentov  $t$ -test) (Slika 20).

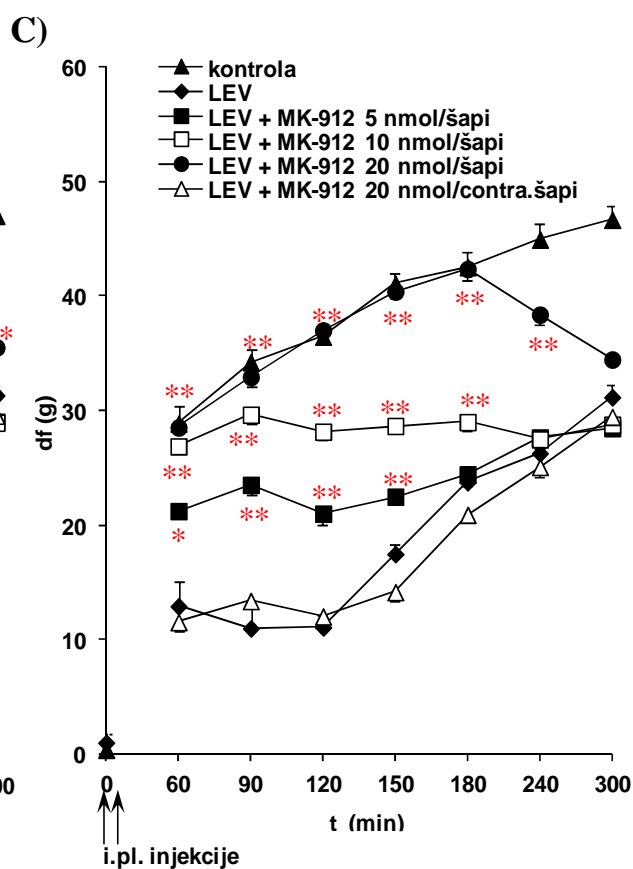
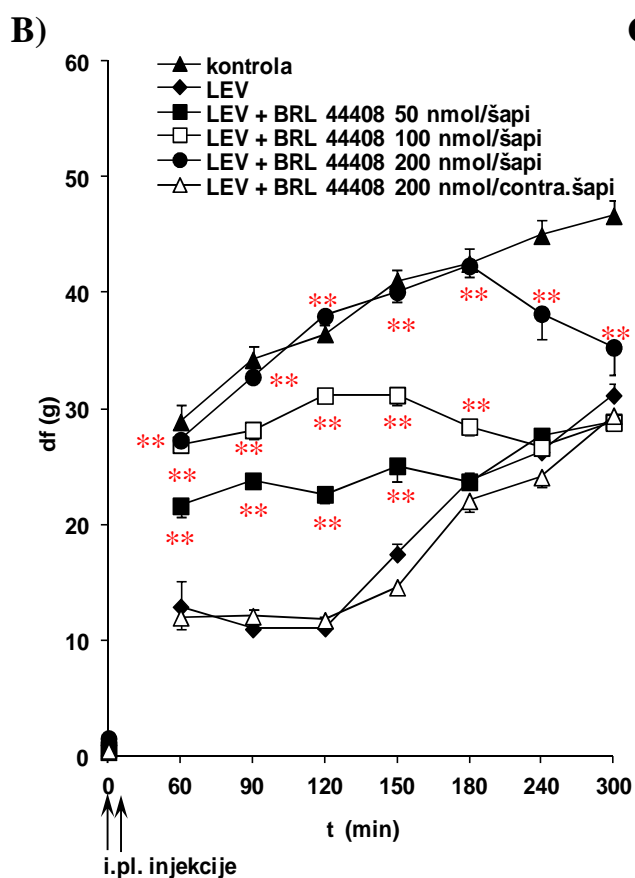


**Slika 20.** Vremenski tok inhibitornog dejstva sistemski primenjenog johimbina (YOH) na sistemsko antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (LEV), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom,  $df$  (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije intraplantarnom injekcijom (i.pl.) karagenina (CAR), YOH (i.p.) je primenjen 15 minuta pre LEV (100 mg/kg; p.o.) odnosno 45 minuta nakon izazivanja inflamacije (označeno strelicama). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja,  $df$  (g), u grupi od 6 do 8 pacova. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Bonferroni test) određena je u odnosu na krivu za LEV.

Nakon *lokalne periferne primene*, johimbin (selektivni antagonist  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora) (130-520 nmol/šapi; i.pl.) ili BRL 44408 (selektivni antagonist  $\alpha_{2A}$  adrenergičkih receptora) (50-200 nmol/šapi; i.pl.) ili MK-912 (selektivni antagonist  $\alpha_{2C}$  adrenergičkih receptora) (5-20 nmol/šapi; i.pl.), primenjen istovremeno sa levetiracetamom (1000 nmol/šapi; i.pl.) u zadnju šapu pacova, statistički značajno je antagonizovao antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 21A, B i C). Inhibitorni efekti johimbina, BRL 44408 i MK-912 su dozno-zavisni. Maksimum inhibitornog dejstva johimbin postiže 90 minuta nakon i.pl. primene, a odgovarajući procenti inhibicije iznose 51,33%, 79,60% i 100% za doze johimbina od 130, 260 i 520 nmol/šapi (i.pl.), redom (nije prikazano). BRL 44408 je ostvario najveći stepen inhibicije antihiperalgezijskog dejstva levetiracetama 90-120 minuta nakon i.pl. primene uz procenat inhibicije od 54,12%, 78,98% i 100% za doze BRL 44408 od 50, 100 i 200 nmol/šapi (i.pl.), redom (nije prikazano). Maksimalne inhibitorne efekte MK-912 postiže 90-150 min nakon i.pl. primene. Odgovarajući procenti inhibicije iznose 52,98%, 79,85% i 100% za doze MK-912 od 5, 10 i 20 nmol/šapi (i.pl.), redom (nije prikazano). Inhibitorno dejstvo johimbina, BRL 44408 i MK-912 na lokalne periferne antihiperalgezijske efekte levetiracetama je lokalnog karaktera, s obzirom da injekcija najvećih ispitivanih doza  $\alpha_2$ -adrenergičkih antagonista u zdravu šapu nije ostvarila inhibiciju efekata levetiracetama primenjenog u šapu sa hiperalgezijom (Figura 21A, B i C). Lokalna periferna primena najvećih ispitivanih doza  $\alpha_2$ -adrenergičkih antagonista *per se* nije uticala značajno na bolnu preosetljivost izazvanu karageninom u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p > 0,05$ ; Student *t*-test) (nije prikazano).

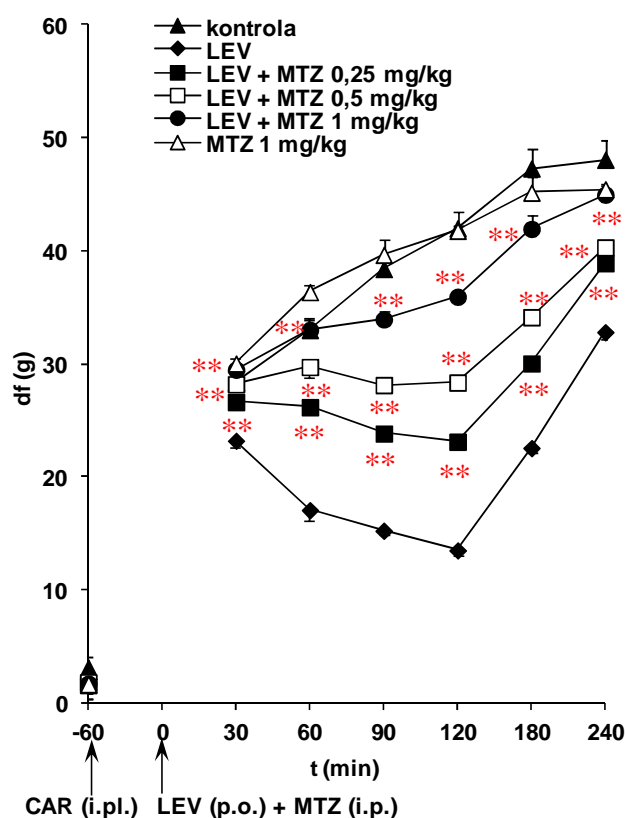


**Slika 21.** Vremenski tok inhibitorynog dejstva lokalno periferno primenjenih antagonista  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora, johimbina (YOH) (A), BRL 44408 (B) i MK-912 (C), na lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (LEV), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom, df (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre intraplantarnih (i.pl.) injekcija (označeno strelicama). YOH (i.pl.) ili BRL 44408 (i.pl.) ili MK-912 (i.pl.) primenjeni su istovremeno sa LEV (1000 nmol/šapi; i.pl.) i karageninom (CAR) (i.pl.) u sklopu jedne injekcije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, df (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na krivu za LEV. contra. = kontralateralno.



## 2.4. Uticaj antagonista serotonergičkih receptora na antihiperalgezijski efekat levetiracetama

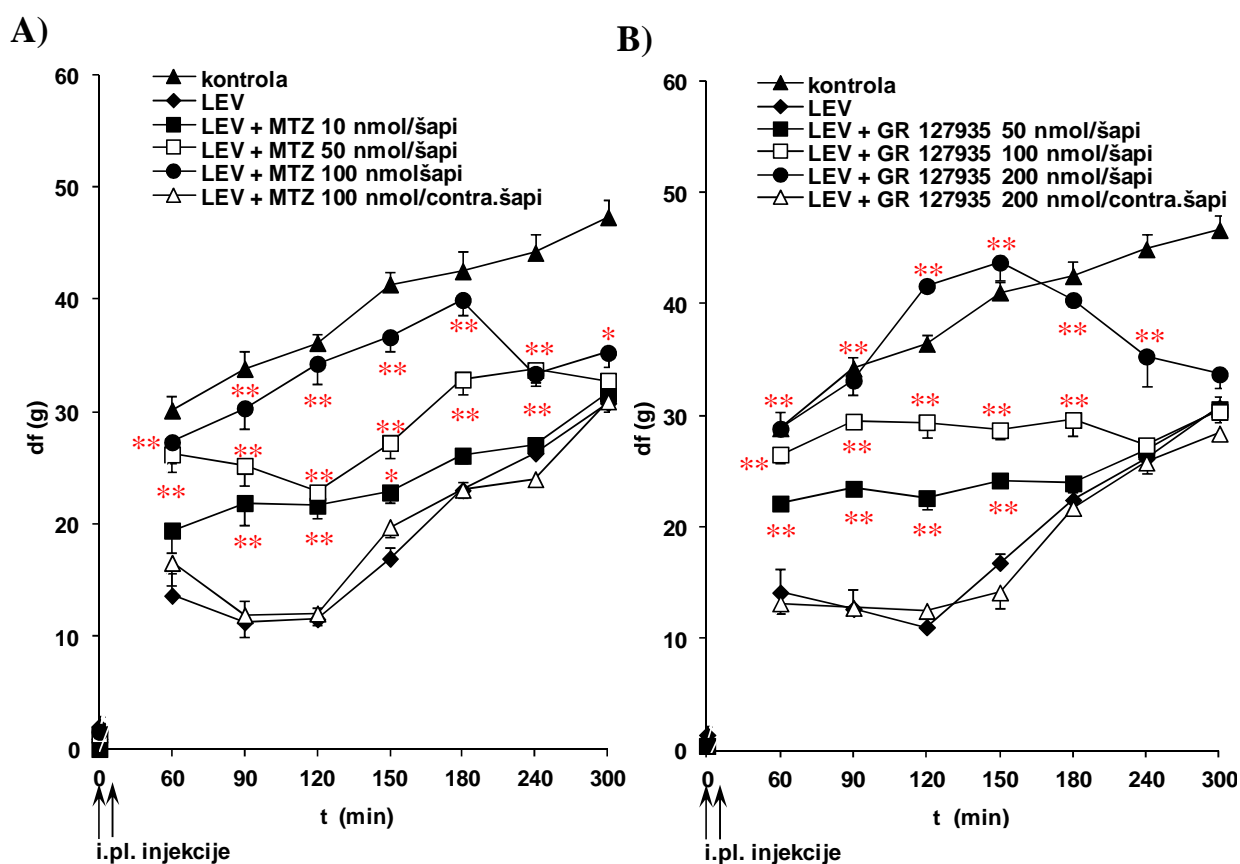
Sistemski primenjen metizergid, neselektivni antagonist 5-HT receptora (0,25-1 mg/kg, i.p.), statistički je značajno i dozno-zavisno smanjio antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 22). Maksimalno inhibitorno dejstvo metizergida zabeleženo je 60 min nakon i.p. primene, a odgovarajući procenti inhibicije iznose 55,05% (0,25 mg/kg; i.p.), 76,57% (0,5 mg/kg; i.p.) i 100% (1 mg/kg; i.p.) (nije prikazano). Najveća ispitivana sistemska doza metizergida (1 mg/kg; i.p.) nije ostvarila značajan uticaj na hiperalgeziju izazvanu karageninom u ovom modelu bola ( $p > 0,05$ ; Studentov  $t$ -test) (Slika 22).



**Slika 22.** Vremenski tok inhibitornog dejstva sistemski primenjenog metizergida (MTZ) na sistemsko antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (LEV), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom, df (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije intraplantarnom injekcijom (i.pl.) karagenina (CAR), dok su MTZ (i.p.) i LEV (100 mg/kg; p.o.) primenjeni 60 min nakon izazivanja inflamacije (označeno strelicama). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, df (g), u grupi od 6 do 8 pacova. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Bonferroni test) određena je u odnosu na krivu za LEV.

Lokalno periferno primenjen metizergid, neselektivni antagonist 5-HT receptora (10-100 nmol/šapi; i.pl.) ili GR 127935, selektivni 5-HT<sub>1B/1D</sub> antagonist (50-200 nmol/šapi; i.pl.), sa levetiracetamom (1000 nmol/šapi; i.pl.) u zadnju šapu pacova, statistički je značajno i dozno-zavisno antagonizovao antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska

ANOVA) (Slika 23A i B). Maksimalna inhibicija (%I) efekata levetiracetama metizergidom postignuta je 90 min nakon i.pl. aplikacije, a odgovarajući %I su 46,31%, 61,16% i 88,91% za doze metizergida od 10, 50 i 100 nmol/šapi (i.pl.), redom (nije prikazano). Maksimalno inhibitorno dejstvo GR 127935 je postigao 90-120 min nakon i.pl. primene, a odgovarajući %I iznose 52,72%, 79,14% i 100% za doze 50, 100 i 200 nmol/šapi (i.pl.), redom (nije prikazano). Efekti metizergida i GR 127935 su lokalne prirode, jer injekcija najvećih ispitivanih doza antagonista u zdravu šapu nije ostvarila inhibitorno dejstvo (Slika 23A i B). Metizergid i GR 127935, primenjeni *per se* u najvećim ispitivanim dozama, nisu uticali na hiperalgeziju izazvanu karageninom ( $p > 0,05$ ; Studentov *t*-test) (nije prikazano).



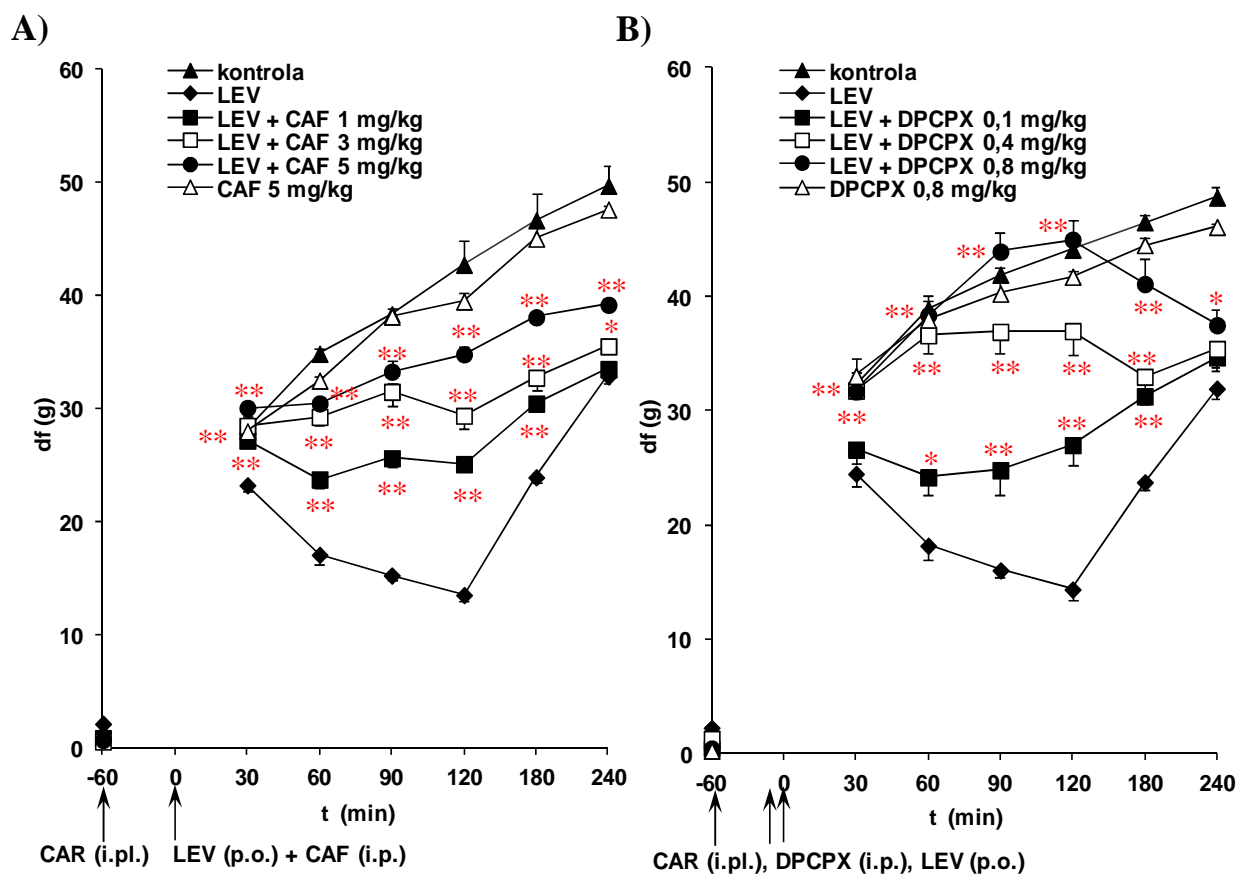
**Slika 23.** Vremenski tok inhibitornog dejstva lokalno periferno primenjenih antagonista serotonergičkih receptora, metizergida (MTZ) (A) i GR 127935 (B) na lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (LEV), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom, df (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre intraplantarnih (i.pl.) injekcija (označeno strelicama). MTZ (i.pl.) ili GR 127935 (i.pl.) primenjeni su istovremeno sa LEV (1000 nmol/šapi; i.pl.) i karageninom (CAR), u sklopu jedne injekcije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, df (g), u grupi od 6-8 životinja. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na krivu za LEV. contra. = kontralateralno.



## ***2.5. Uticaj antagonista adenozijskih receptora na antihiperalgezijski efekat levetiracetama***

U modifikovanom testu pritiska na šapu pacova, *sistemski primenjen kofein*, neselektivni antagonist adenozijskih receptora (1-5 mg/kg; i.p.), statistički je značajno i dozno-zavisno antagonizovao sistemske antihiperalgezijske efekte levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 24A). Maksimum inhibitornog dejstva kofeina na antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama postignut je 90 min nakon i.p. primene, a odgovarajući procenti inhibicije iznose 44,99%, 70,39% i 78,06% za doze kofeina od 1, 3 i 5 mg/kg (i.p.), redom (nije prikazano). Najveća ispitivana sistemska doza kofeina (5 mg/kg; i.p.) primenjena *per se* nije ostvarila značajan uticaj na hiperalgeziju izazvanu karageninom ( $p > 0,05$ ; Studentov *t*-test) (Slika 24A).

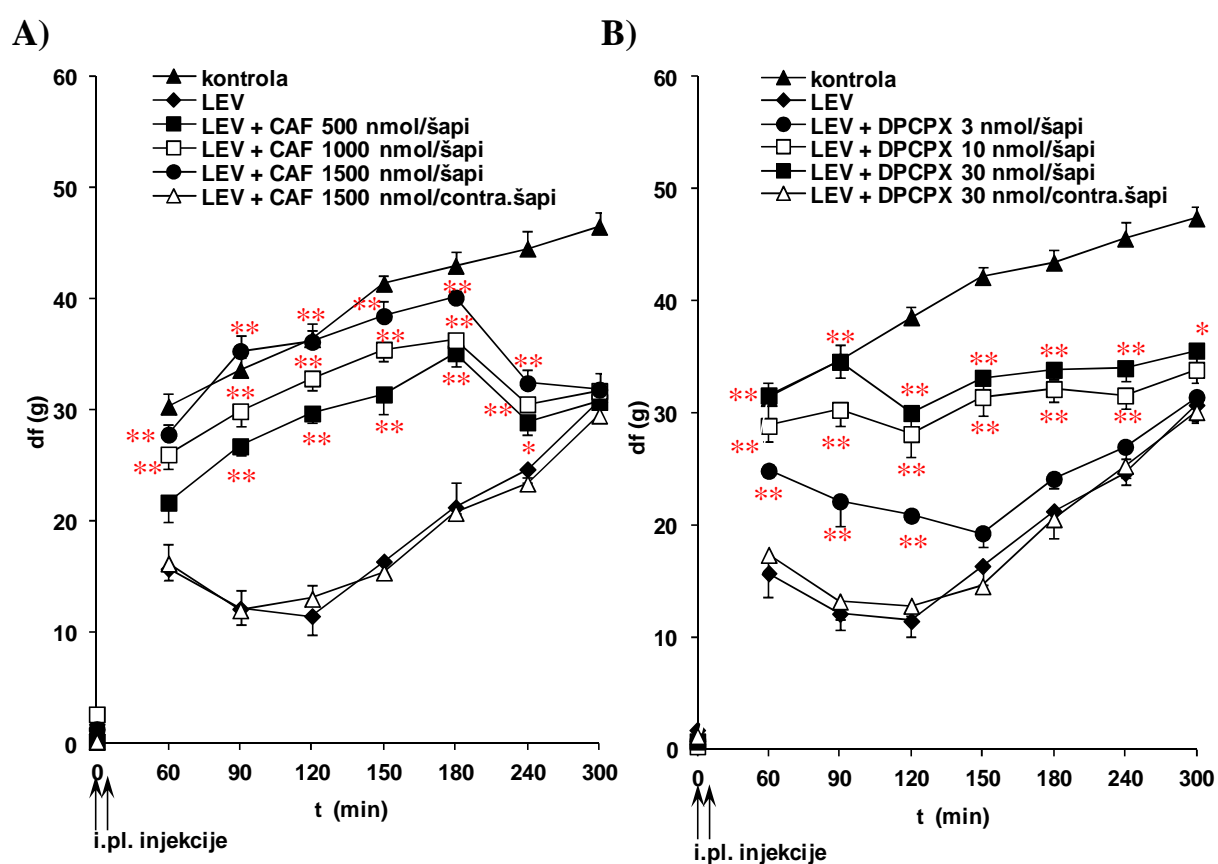
U istom testu, *sistemski primenjen DPCPX (1,3-dipropil-8-ciklopentilksantin)*, selektivni antagonist adenozijskih A<sub>1</sub> receptora (0,1-0,8 mg/kg; i.p.), statistički je značajno inhibirao sistemske antihiperalgezijske efekte levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 24B). DPCPX ostvaruje inhibitorne efekte dozno-zavisno. DPCPX maksimalno inhibira antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama 60-120 min nakon i.p. primene, a odgovarajući procenti inhibicije iznose 40,83% (0,1 mg/kg; i.p.), 84,58% (0,4 mg/kg; i.p.) i 100% (0,8 mg/kg; i.p.) (nije prikazano). Najveća ispitivana sistemska doza DPCPX (0,8 mg/kg; i.p.) nije pokazala intrinzičko antihiperalgezijsko dejstvo u inflamatornom modelu bola u pacova ( $p > 0,05$ ; Studentov *t*-test) (Slika 24B).



**Slika 24.** Vremenski tok inhibitornog dejstva sistemski primenjenog kofeina (CAF) (A) i DPCPX (B) na sistemsko antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (LEV), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu i šapu sa hiperalgezijom, df (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije intraplantarnom injekcijom (i.pl.) karagenina (CAR). DPCPX (i.p.) je primenjen 15 minuta pre LEV (100 mg/kg; p.o.) odnosno 45 minuta nakon izazivanja inflamacije, a CAF (i.p.) neposredno pre primene LEV (p.o.) (označeno strelicama). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, df (g) u grupi od 6 do 8 pacova. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Bonferroni test) određena je u odnosu na krivu za LEV. DPCPX, 1,3-dipropil-8-ciklopentilksantin.

Nakon lokalne periferne primene kofeina, neselektivnog antagoniste adenozijskih receptora (500-1500 nmol/šapi; i.pl.) ili DPCPX, selektivnog antagoniste adenozijskih  $A_1$  receptora (3-30 nmol/šapi; i.pl.), i levetiracetama (1000 nmol/šapi; i.pl.) u zadnju šapu pacova, zabeleženo je statistički značajno smanjenje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva levetiracetama ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 25A i B). Kofein i DPCPX su dozno-zavisno inhibirali lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama. Najveći stepen inhibicije antihiperalgezijskog dejstva levetiracetama kofein postiže 90-120 min nakon i.pl. primene, a odgovarajući procenti inhibicije iznose 73,19%, 85,85% i 100% za doze kofeina od

500, 1000 i 1500 nmol/šapi (i.pl.), redom (nije prikazano). Maksimalnu inhibiciju DPCPX postiže 90 min nakon i.pl. aplikacije uz procenete inhibicije od 45,11%, 77,51% i 100% za doze od 3, 10 i 30 nmol/šapi (i.pl.), redom (nije prikazano). Efekti kofeina i DPCPX su lokalne prirode, jer je inhibitorski uticaj izostao nakon njihove primene u kontralateralnu (zdravu) šapu (Slika 25A i B). Lokalna periferna primena najvećih ispitivanih doza CAF (1500 nmol/šapi; i.pl.) i DPCPX (30 nmol/šapi; i.pl.) nije ostvarila *per se* značajan uticaj na hiperalgeziju izazvanu karageninom u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p > 0,05$ ; Studentov *t*-test) (nije prikazano).



**Slika 25.** Vremenski tok inhibitorynog dejstva lokalno periferno primenjenih antagonista adenozijskih receptora, kofeina (CAF) (A) i DPCPX (B), na lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (LEV), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom, df (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre intraplantarnih (i.pl.) injekcija (označeno strelicama). CAF (i.pl.) ili DPCPX (i.pl.) primenjeni su istovremeno sa LEV (1000 nmol/šapi; i.pl.) i karageninom (CAR), u sklopu jedne injekcije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, df (g), u grupi od 6-8 životinja. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na krivu za LEV. contra. = kontralateralno; DPCPX, 1,3-dipropil-8-ciklopentilksantin.

### 3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u eksperimentalnim modelima bola

#### 3.1. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelu inflamatornog bola u pacova

Kako bi se odredio tip interakcije između levetiracetama i ibuprofena/celekoksiba/paracetamola/ceftriaksona/kofeina u inflamatornom modelu bola u pacova, najpre su ispitani efekti pojedinačnih lekova, a potom i efekti dvojnih kombinacija levetiracetama i pomenutih lekova.

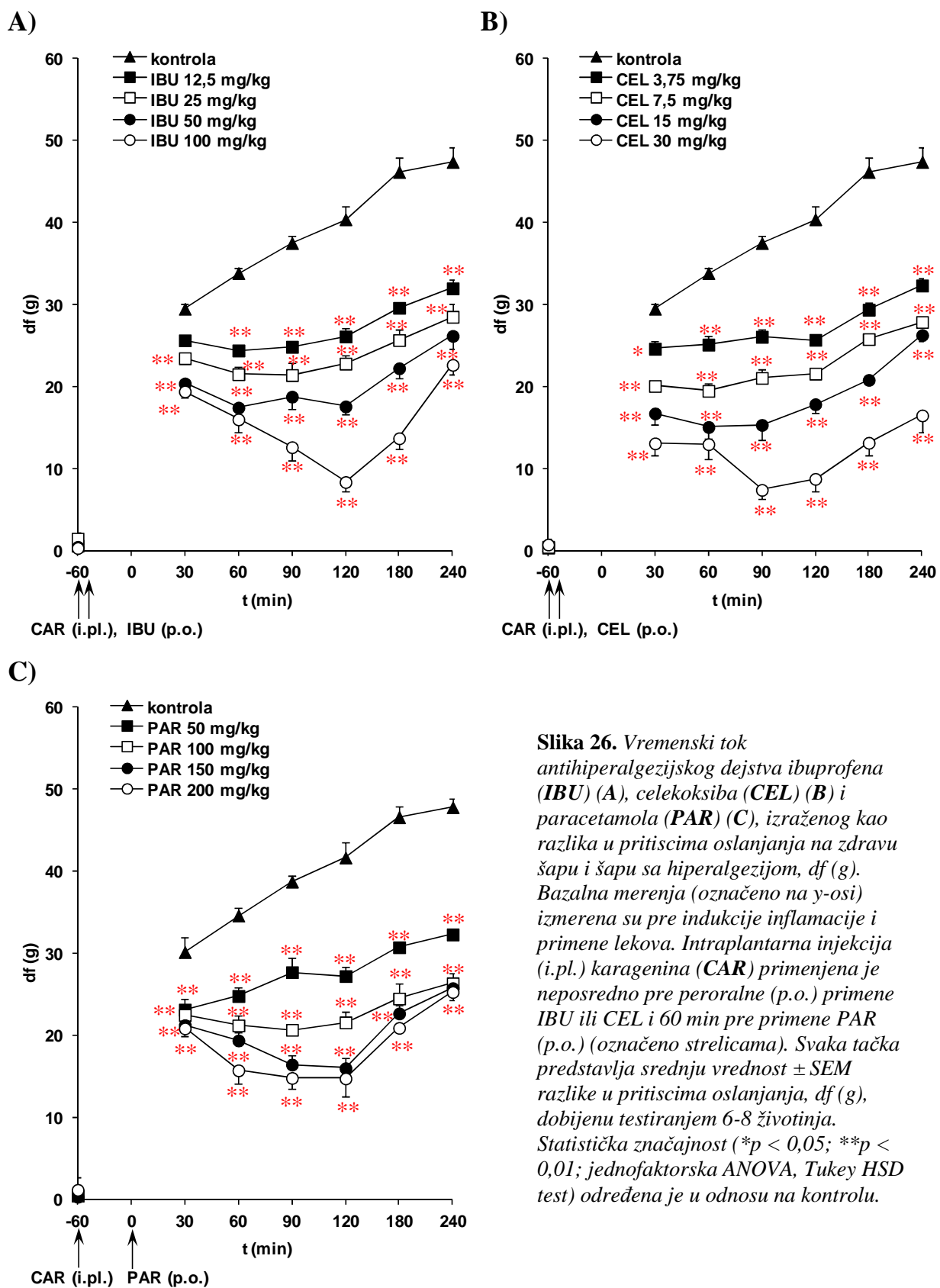
##### 3.1.1. Efekti ibuprofena, celekoksiba, paracetamola, ceftriaksona i kofeina

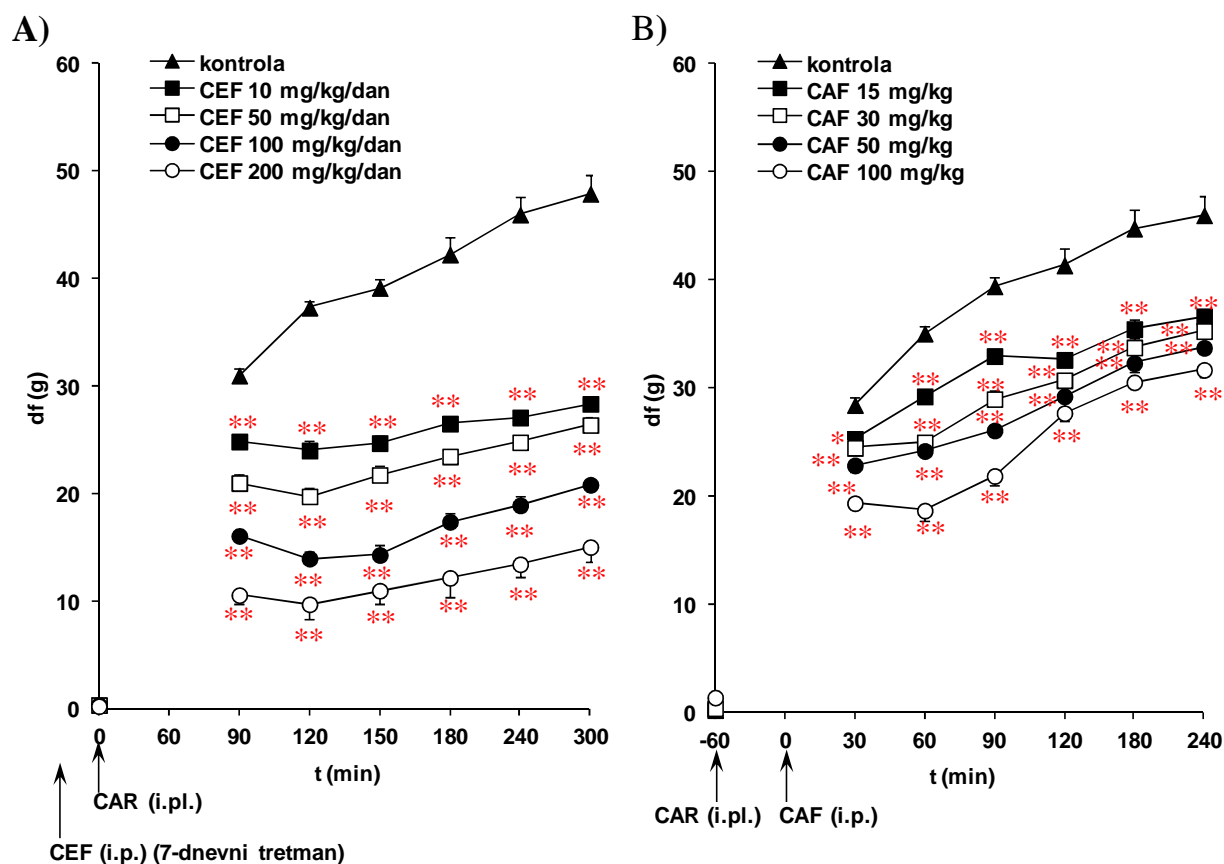
U modifikovanom testu pritiska na šapu pacova, ibuprofen (12,5-100 mg/kg; p.o.), celekoksib (3,75-30 mg/kg; p.o.), paracetamol (50-200 mg/kg; p.o.) i ceftriakson (10-200 mg/kg/dan; 7-dnevni tretman; i.p.) izazvali su statistički značajno, dozno-zavisno i visoko efikasno antihiperalgezijsko dejstvo ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slike 26A-C i 27A). *Ibuprofen* postiže maksimalno antihiperalgezijsko dejstvo (%AH) 180 min nakon p.o. primene, a odgovarajući %AH iznose 37,37%, 45,33%, 57,86% i 79,99% za doze ibuprofena od 12,5; 25; 50 i 100 mg/kg, redom (nije prikazano). Srednja efektivna doza ibuprofena, u trenutku maksimalnog efekta ispitivanih doza iznosi  $27,43 \pm 3,61$  (15,56 – 48,36) mg/kg (Tabela 5). Maksimum antihiperalgezijskog dejstva *celekoksib* postiže 150-180 min nakon p.o. primene, uz %AH od 36,42%, 46,60%, 59,17% i 80,31% za doze celekoksiba od 3,75; 7,5; 15 i 30 mg/kg, redom (nije prikazano). Srednja efektivna doza celekoksiba iznosi  $8,09 \pm 0,82$  (5,29 – 12,43) mg/kg (Tabela 6). Što se tiče *paracetamola*, njegovo maksimalno antihiperalgezijsko dejstvo zabeleženo je 120 min nakon p.o. primene, izraženo u procentima: 34,70% (50 mg/kg; p.o.), 48,25% (100 mg/kg; p.o.), 61,67% (150 mg/kg; p.o.) i 64,65% (200 mg/kg; p.o.) (nije prikazano). Srednja efektivna doza paracetamola iznosi  $99,90 \pm 5,15$  (80,02 – 124,72) mg/kg (Tabela 7). Efekti *ceftriaksona* u inflamatornom modelu bola u pacova ispitivani su 8. dana nakon 7-dnevne i.p. primene odgovarajućih doza ceftriaksona. Pokazano je da ceftriakson postiže maksimalno antihiperalgezijsko dejstvo na 120-240 min merenje (u odnosu na indukciju

inflamacije), uz %AH od 41,09% (10 mg/kg/dan; i.p.), 46,12% (50 mg/kg/dan; i.p.), 63,53% (100 mg/kg/dan; i.p.) i 74,04% (200 mg/kg/dan; i.p.) (nije prikazano). Srednja efektivna doza ceftriaksona je  $31,96 \pm 12,02$  (6,32-161,61) mg/kg/dan (Tabela 8).

*Kofein* (15-100 mg/kg; i.p.) je takođe ostvario značajno i dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo, ali niže efikasnosti u poređenju sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom i ceftriaksonom (Slika 27B). Maksimalno dejstvo kofein postiže 60-120 min nakon i.p. primene, a odgovarajući %AH iznose 21,17% (15 mg/kg; i.p.), 28,75% (30 mg/kg; i.p.), 33,74% (50 mg/kg; i.p.) i 46,79% (100 mg/kg; i.p.) (nije prikazano).

Dužina trajanja dejstva ibuprofena, celekoksiba, paracetamola i ceftriaksona zavisna je od doze, jer krive odnosa antihiperalgezijskog dejstva (%AH) i razlike površina ispod krivih kontrolne i eksperimentalne grupe ( $\Delta$ PIK) imaju visoke koeficijente linearne korelacije ( $r = 0,996; 0,999; 0,989$  i 1, redom; nije prikazano) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).





**Slika 27.** Vremenski tok antihiperalgezijskog dejstva ceftriaksona (CEF) (A) i kofeina (CAF) (B), izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom,  $df$  (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije intraplantarnom injekcijom (i.pl.) karagenina (CAR). CEF je primenjivan intraperitonealno (i.p.) svakodnevno tokom 7 dana, a 8. dana je rađen eksperiment (indukovana inflamacija), dok je CAF je primenjen (i.p.) 60 min nakon CAR (označeno strelicama). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja,  $df$  (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolu.

### 3.1.2. Efekti kombinovane primene levetiracetama i ibuprofena

Levetiracetam i ibuprofen, primenjeni zajedno u fiksnim frakcijama  $ED_{50}$  (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2) statistički značajno i dozno-zavisno smanjuju hiperalgeziju izazvanu i.pl. injekcijom karagenina, u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 28). Kombinacija postiže maksimum antihiperalgezijskog dejstva (%AH) 120-180 min nakon p.o. primene levetiracetama (tj. 180-240 min nakon p.o. primene ibuprofena), a odgovarajući %AH iznose 44,77% (1/16 + 1/16  $ED_{50}$ ; p.o.), 52,51% (1/8 + 1/8  $ED_{50}$ ; p.o.), 69,33% (1/4 + 1/4  $ED_{50}$ ; p.o.) i 78,80% (1/2 + 1/2  $ED_{50}$ ; p.o.) (nije prikazano). Kriva odnosa log

doza kombinacija levetiracetama i ibuprofena i maksimalnih efekata ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,990$ ) (Slika 29A). Eksperimentalna srednja efektivna doza kombinacije ( $ED_{50 \text{ mix LEV + IBU}}$ ) izračunata je regresionom analizom linearnog dela krive odnosa log doza i efekta (Slika 29A), što je prikazano u Tabeli 5 i izobologramu (Slika 29B).

Za kombinaciju levetiracetam-ibuprofen, izobologram je konstruisan povezivanjem vrednosti  $ED_{50}$  levetiracetama (27,59 mg/kg), označeno na apscisi kao tačka sa koordinatama (27,59; 0), i  $ED_{50}$  ibuprofena (27,43 mg/kg) označeno na ordinati kao tačka sa koordinatama (0; 27,43), čime se dobija teorijska linija aditivnosti (Slika 29B). Vrednost  $ED_{50 \text{ mix LEV + IBU}}$  sa 95%-nim intervalima poverenja za kombinaciju lekova, izračunata linearnom regresijom iz krive odnosa doza i efekta, podeljena je na komponente prema masenom odnosu doza lekova u kombinaciji. Ta tačka unosi se u izobologram (Slika 29B). U ovoj studiji, levetiracetam i ibuprofen primenjivani su zajedno u fiksnim frakcijama  $ED_{50}$ :

$$1/2 ED_{50 \text{ LEVETIRACETAM}} + 1/2 ED_{50 \text{ IBUPROFEN}} = 13,80 \text{ mg/kg} + 13,72 \text{ mg/kg}$$

$$1/4 ED_{50 \text{ LEVETIRACETAM}} + 1/4 ED_{50 \text{ IBUPROFEN}} = 6,90 \text{ mg/kg} + 6,86 \text{ mg/kg}$$

$$1/8 ED_{50 \text{ LEVETIRACETAM}} + 1/8 ED_{50 \text{ IBUPROFEN}} = 3,45 \text{ mg/kg} + 3,43 \text{ mg/kg}$$

$$1/16 ED_{50 \text{ LEVETIRACETAM}} + 1/16 ED_{50 \text{ IBUPROFEN}} = 1,72 \text{ mg/kg} + 1,71 \text{ mg/kg}.$$

Fiksni maseni odnos doza levetiracetama i ibuprofena u kombinaciji iznosi otprilike 1:1, što znači da su u svakoj ispitivanoj kombinaciji primenjivane približno iste doze lekova (Tabela 5). Dobijena vrednost  $ED_{50 \text{ mix}}$  za levetiracetam-ibuprofen kombinaciju iznosi **5,02 mg/kg** (Tabela 5), a sastoji se od 2,52 mg/kg levetiracetama i 2,50 mg/kg ibuprofena. Ova tačka ima koordinate (2,52; 2,5) na levetiracetam-ibuprofen izobologramu (Slika 29B).

Tačka koja leži na liniji aditivnosti je teorijska (aditivna) srednja efektivna doza kombinacije ( $ED_{50 \text{ add LEV + IBU}}$ ). Prema formuli koja je navedena u Materijalu i metodama, teorijska (aditivna)  $ED_{50}$  za kombinaciju levetiracetam-ibuprofen iznosi:

$$ED_{50 \text{ add LEV + IBU}} = 0,5 \times 27,59 + 0,5 \times 27,43 = \mathbf{27,52 \text{ mg/kg}},$$

a sastoji se od 13,80 mg/kg levetiracetama i 13,72 mg/kg ibuprofena (Tabela 5).

Nakon izračunavanja  $ED_{50 \text{ mix}}$  i  $ED_{50 \text{ add}}$  za kombinaciju levetiracetam-ibuprofen izvršeno je poređenje ove dve doze i zabeležena je statistički značajna razlika ( $ED_{50 \text{ mix}} < ED_{50 \text{ add}}$ ) ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test), odnosno da lekovi primenjeni u kombinaciji ostvaruju sinergističku interakciju (Tallarida i sar., 1997). Na izobologramu (Slika 29B) se može videti da ne dolazi do preklapanja 95%-nih intervala poverenja ovih tačaka, što je grafički pokazatelj sinergizma između ispitivanih lekova.

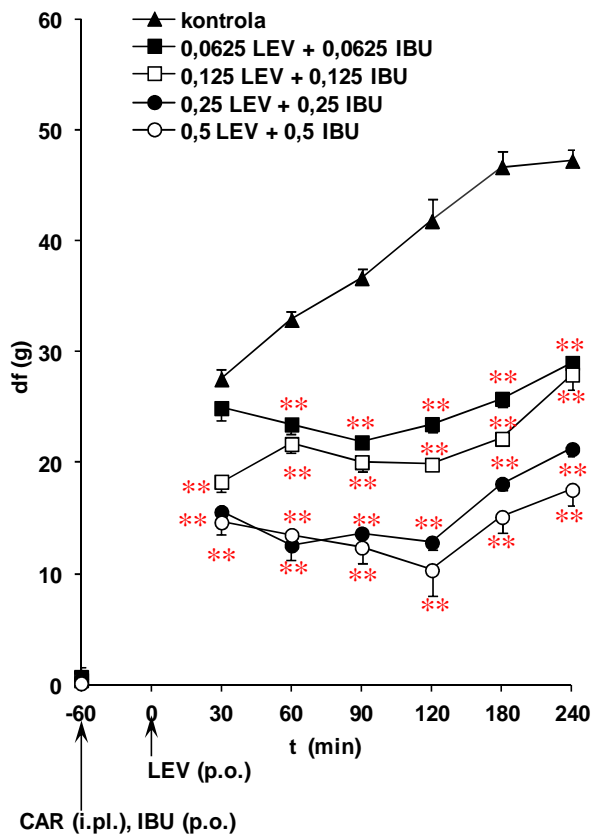


Vrednost indeksa interakcije ( $\gamma$ ) (videti Materijal i metode), izračunata je na sledeći način:

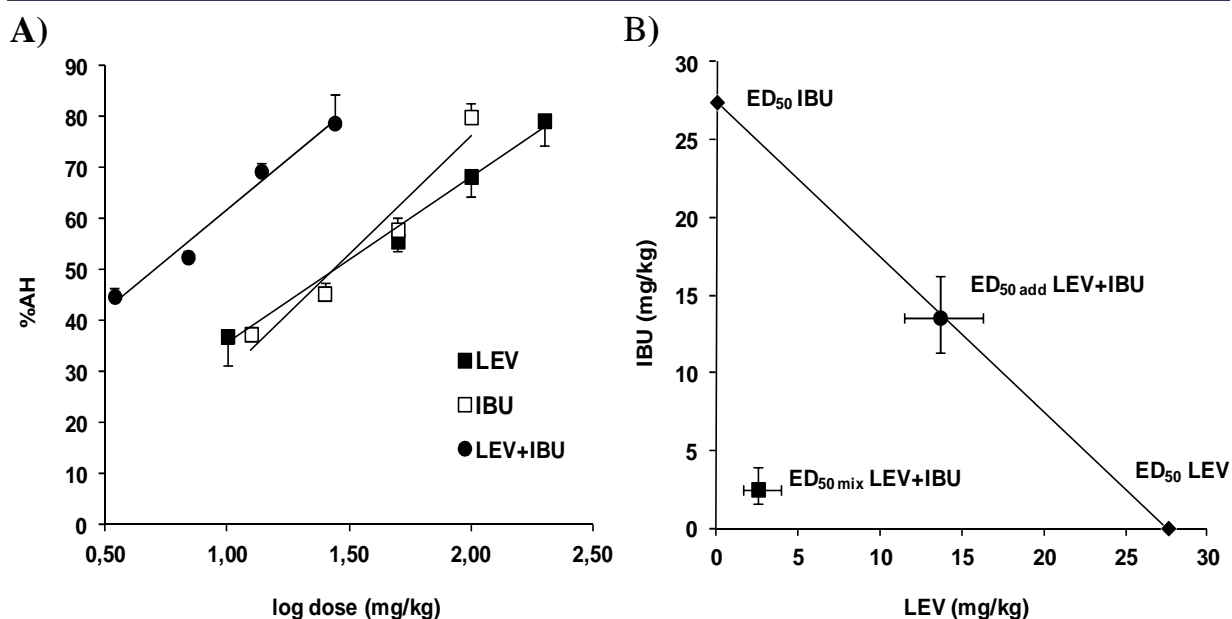
$$\gamma = \frac{ED_{50} \text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA IBUPROFENOM}}{ED_{50} \text{ LEVETIRACETAM} + ED_{50} \text{ IBUPROFEN U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM}} / \frac{ED_{50} \text{ IBUPROFEN}}{ED_{50} \text{ IBUPROFEN}} = \frac{2,52/27,59 + 2,50/27,43}{2} = \mathbf{0,18}$$
 (Tabela 5).

Vrednost  $\gamma$  manja od 1 potvrđuje sinergističku interakciju između levetiracetama i ibuprofena.

Dužina trajanja dejstva levetiracetama, ibuprofena i kombinacije levetiracetam-ibuprofen upoređivana je posredstvom nagiba krivih %AH- $\Delta$ PIK (videti Materijal i metode), koji je merilo dužine trajanja dejstva lekova/kombinacije lekova (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a). Nagibi krivih upoređivani su testom paralelizma. Tretman sa većim nagibom ima dugotrajniji efekat. Nagib krive za levetiracetam ( $1,30 \pm 0,10$ ) ne razlikuje se značajno od nagiba krivih za ibuprofen ( $1,05 \pm 0,06$ ) i kombinaciju levetiracetam-ibuprofen ( $1,19 \pm 0,09$ ), ukazujući na približno istu dužinu trajanja efekata svih ispitivanih tretmana ( $p > 0,05$ ; test paralelizma). Dužina trajanja dejstva kombinacije levetiracetama i ibuprofena zavisi od primenjene doze, jer kriva odnosa %AH- $\Delta$ PIK ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,994$ ; nije prikazano) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 28.** Vremenski tok antihiperalgezijskog dejstva levetiracetam-ibuprofen (LEV+IBU) kombinacije, izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom,  $df$  (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije i primene lekova. Intraplantarna injekcija (i.pl.) karagenina (CAR) primenjena je neposredno pre peroralne (p.o.) primene IBU i 60 min pre primene LEV (p.o.) (obeleženo strelicama). LEV i IBU su primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  ( $1/16=0,0625$ ;  $1/8=0,125$ ;  $1/4=0,25$  i  $1/2=0,5$ ). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja,  $df$  (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu krivu.



**Slika 29.** A) Regresione krive odnosa log doze i antihiperalgezijskog dejstva (%AH) u trenutku postizanja maksimalnog efekta levetiracetama (LEV), ibuprofena (IBU) i levetiracetam-ibuprofen (LEV + IBU) kombinacije u inflamatornom modelu bola u pacova. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-8 životinja. B) Izobologram za LEV+IBU kombinaciju u inflamatornom modelu bola u pacova. ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova (određene u trenutku postizanja maksimalnog efekta) obeležene su na osama. Linija koja povezuje pojedinačne ED<sub>50</sub> lekova je teorijska linija aditivnosti, a tačka na njoj je ED<sub>50 add</sub> (teorijska aditivna ED<sub>50</sub>). Između ED<sub>50 add</sub> i ED<sub>50 mix</sub> (eksperimentalna ED<sub>50</sub> za kombinaciju lekova) postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test), što ukazuje na sinergističku interakciju između levetiracetama i ibuprofena.

**Tabela 5.** ED<sub>50</sub>  $\pm$  SEM vrednosti (mg/kg) sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) izmereni u trenutku maksimalnog antihiperalgezijskog efekta nakon p.o. primene levetiracetama, ibuprofena i njihove kombinacije u inflamatornom modelu bola u pacova

Lek/kombinacija lekova	ED <sub>50</sub> <sup>a</sup> $\pm$ SEM (95%-ni intervali poverenja)			
levetiracetam	27,59 $\pm$ 2,72 (18,03 – 42,21)			
ibuprofen	27,43 $\pm$ 3,61 (15,56 – 48,36)			
	maseni odnos doza	ED <sub>50 add</sub>	ED <sub>50 mix</sub> <sup>d</sup>	$\gamma$ <sup>b</sup>
levetiracetam+ibuprofen	1:1	27,52 $\pm$ 1,98 (22,76 – 32,50)	5,02 $\pm$ 0,51* (3,23 – 7,80)	0,18

<sup>a</sup> ED<sub>50</sub> = doza leka koja ostvaruje 50% antihiperalgezijskog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = \text{ED}_{50} \text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA IBUPROFENOM} / \text{ED}_{50} \text{ LEVETIRACETAM} + \text{ED}_{50} \text{ IBUPROFEN U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM} / \text{ED}_{50} \text{ IBUPROFEN}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

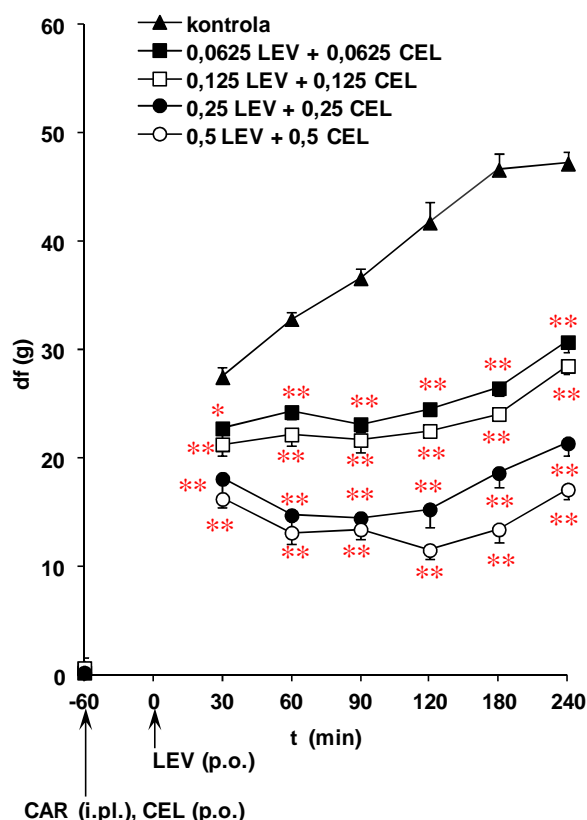
<sup>c</sup> ED<sub>50 add</sub> = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

<sup>d</sup> ED<sub>50 mix</sub> = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

\*  $p < 0,05$  između ED<sub>50 add</sub> i ED<sub>50 mix</sub> ( $t$ -test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).

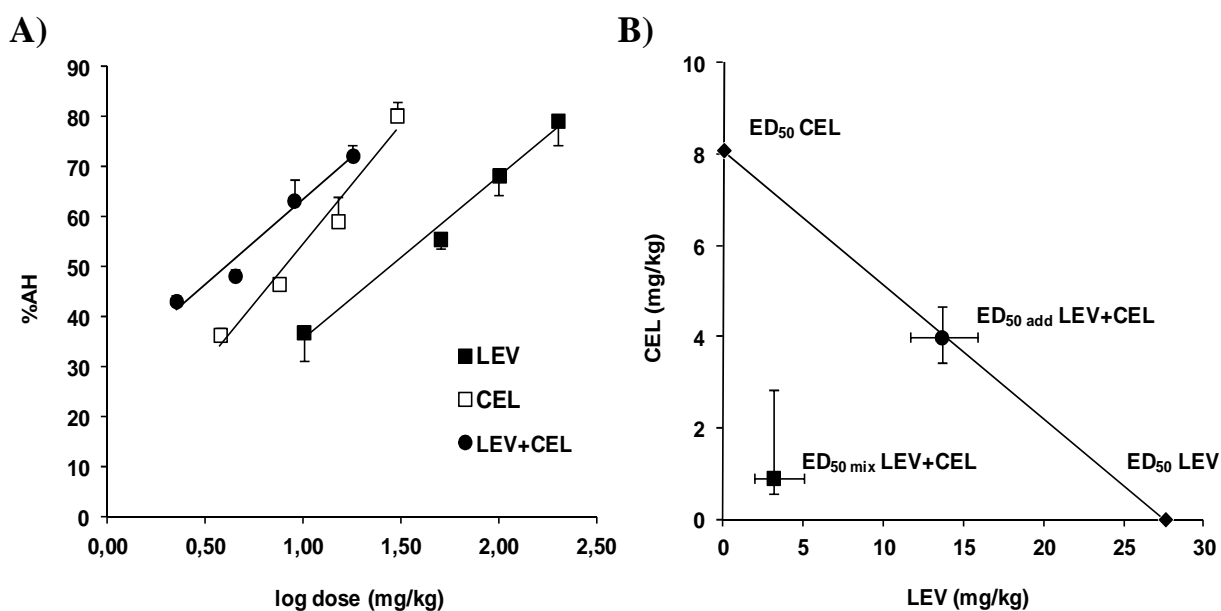
### 3.1.3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i celekoksiba

U modifikovanom testu pritiska na šapu pacova, kombinacija levetiracetama i celekoksiba (primenjeni zajedno u fiksnim frakcijama ED<sub>50</sub>: 1/16, 1/8, 1/4 i 1/2) značajno je i dozno-zavisno smanjila razliku u pritiscima oslanjanja između zdrave šape i šape sa hiperalgezijom izazvanom i.pl. injekcijom karagenina, df (g) ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 30). Maksimumi antihiperalgezijskog dejstva (%AH) kombinacije levetiracetam-celekoksib postignuti su 120-180 min nakon p.o. primene levetiracetama, odnosno 180-240 min nakon p.o. primene celekoksiba. Odgovarajući %AH iznose 43,16% (1/16 + 1/16 ED<sub>50</sub>; p.o.), 48,25% (1/8 + 1/8 ED<sub>50</sub>; p.o.), 63,28% (1/4 + 1/4 ED<sub>50</sub>; p.o.) i 72,27% (1/2 + 1/2 ED<sub>50</sub>; p.o.) (nije prikazano). Kriva odnosa log doza kombinacije levetiracetama i celekoksiba i %AH u trenutku maksimalnih efekata ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,985$ ) (Slika 31A).



**Slika 30.** Vremenski tok antihiperalgezijskog dejstva levetiracetam-celekoksib (LEV+CEL) kombinacije, izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom, df (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije i primene lekova. Intraplantarna injekcija (i.pl.) karagenina (CAR) primenjena je neposredno pre peroralne (p.o.) primene CEL i 60 min pre primene LEV (p.o.) (obeleženo strelicama). LEV i CEL su primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih ED<sub>50</sub> (1/16=0,0625; 1/8=0,125; 1/4=0,25 i 1/2=0,5). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, df (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu krivu.

Izobologrfska analiza kombinacije levetiracetama i celekoksiba izvedena je na način opisan kod kombinacije levetiracetam-ibuprofen (videti Rezultate, poglavlje 3.1.2.).  $ED_{50\text{ mix}}$  i  $ED_{50\text{ add}}$  za kombinaciju levetiracetam-celekoksib se statistički značajno razlikuju, tj.  $ED_{50\text{ mix}}$  je značajno manja od  $ED_{50\text{ add}}$  ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test) (Tabela 6), što ukazuje da levetiracetam i celekoksib ostvaruju sinergističku interakciju (Tallarida i sar., 1997). Sinergistička interakcija je potvrđena i time što se 95%-ni intervali poverenja  $ED_{50\text{ mix LEV+CEL}}$  i  $ED_{50\text{ add LEV+CEL}}$  ne preklapaju (Slika 31B). Dodatno, niska vrednost indeksa interakcije ( $\gamma < 1$ ), takođe ide u prilog sinergističkoj interakciji između levetiracetama i celekoksiba (Tabela 6). Dužine trajanja dejstva levetiracetama, celekoksiba i njihove kombinacije su približno iste, jer ne postoji statistički značajna razlika između nagiba krivih %AH- $\Delta$ PIK za levetiracetam ( $1,30 \pm 0,10$ ), celekoksib ( $1,24 \pm 0,04$ ) i levetiracetam-celekoksib ( $1,44 \pm 0,04$ ) kombinaciju ( $p > 0,05$ ; test paralelizma) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a). Dužina trajanja dejstva ispitivane kombinacije zavisi od primenjene doze, s obzirom da kriva odnosa %AH- $\Delta$ PIK ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 1$ ; nije prikazano) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 31.** A) Regresione krive odnosa log doze i antihiperalgezijskog dejstva (%AH) u trenutku postizanja maksimalnog efekta levetiracetama (LEV), celekoksiba (CEL) i levetiracetam-celekoksib (LEV+CEL) kombinacije u inflamatornom modelu bola u pacova. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-8 životinja. B) Izobologram za LEV+CEL kombinaciju u inflamatornom modelu bola u pacova.  $ED_{50}$  vrednosti pojedinačnih lekova (određene u trenutku postizanja maksimalnog efekta) obeležene su na osama. Linija koja povezuje pojedinačne  $ED_{50}$  lekova je teorijska linija aditivnosti, a tačka na njoj je  $ED_{50\text{ add}}$  (teorijska aditivna  $ED_{50}$ ). Između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  (eksperimentalna  $ED_{50}$  za kombinaciju lekova) postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test), što ukazuje na sinergističku interakciju između levetiracetama i celekoksiba.

**Tabela 6.**  $ED_{50} \pm SEM$  vrednosti (mg/kg) sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) izmereni u trenutku maksimalnog antihiperalgezijskog efekta nakon p.o. primene levetiracetama, celekoksiba i njihove kombinacije u inflamatornom modelu bola u pacova

Lek/kombinacija lekova	$ED_{50}^a \pm SEM$ (95%-ni intervali poverenja)			
levetiracetam	27,59 $\pm$ 2,72 (18,03 – 42,21)			
celekoksib	8,09 $\pm$ 0,82 (5,29 – 12,43)			
	maseni odnos doza	$ED_{50}^{add}$	$ED_{50}^{mix}$	$\gamma^b$
levetiracetam+celecoxib	3,4:1	17,84 $\pm$ 1,12 (15,11 – 20,52)	4,00 $\pm$ 0,45* (2,46 – 6,50)	0,22

<sup>a</sup>  $ED_{50}$  = doza leka koja ostvaruje 50% antihiperalgezijskog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = ED_{50} \text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA CELEKOKSIBOM} / ED_{50} \text{ LEVETIRACETAM} + ED_{50} \text{ CELEKOKSIB U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM} / ED_{50} \text{ CELEKOKSIB}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

<sup>c</sup>  $ED_{50}^{add}$  = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

<sup>d</sup>  $ED_{50}^{mix}$  = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

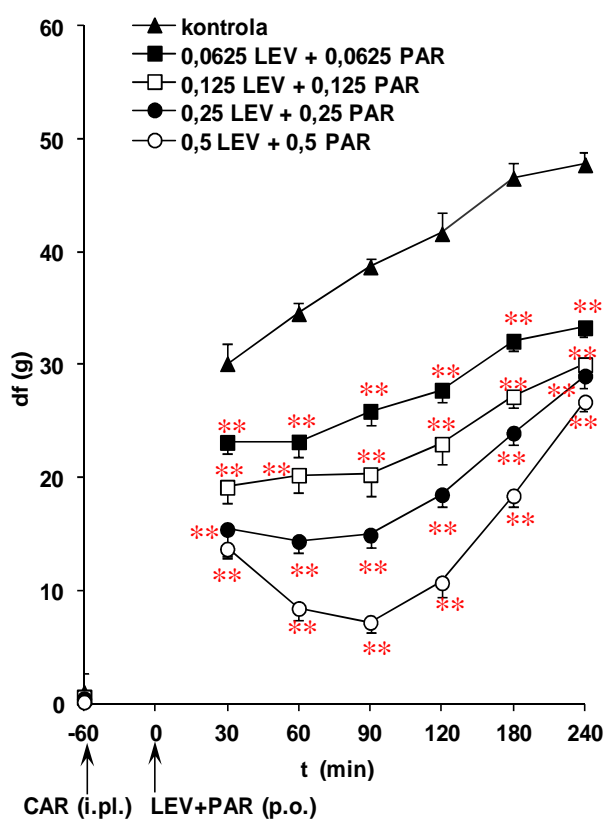
\*  $p < 0,05$  između  $ED_{50}^{add}$  i  $ED_{50}^{mix}$  ( $t$ -test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).

### 3.1.4. Efekti kombinovane primene levetiracetama i paracetamola

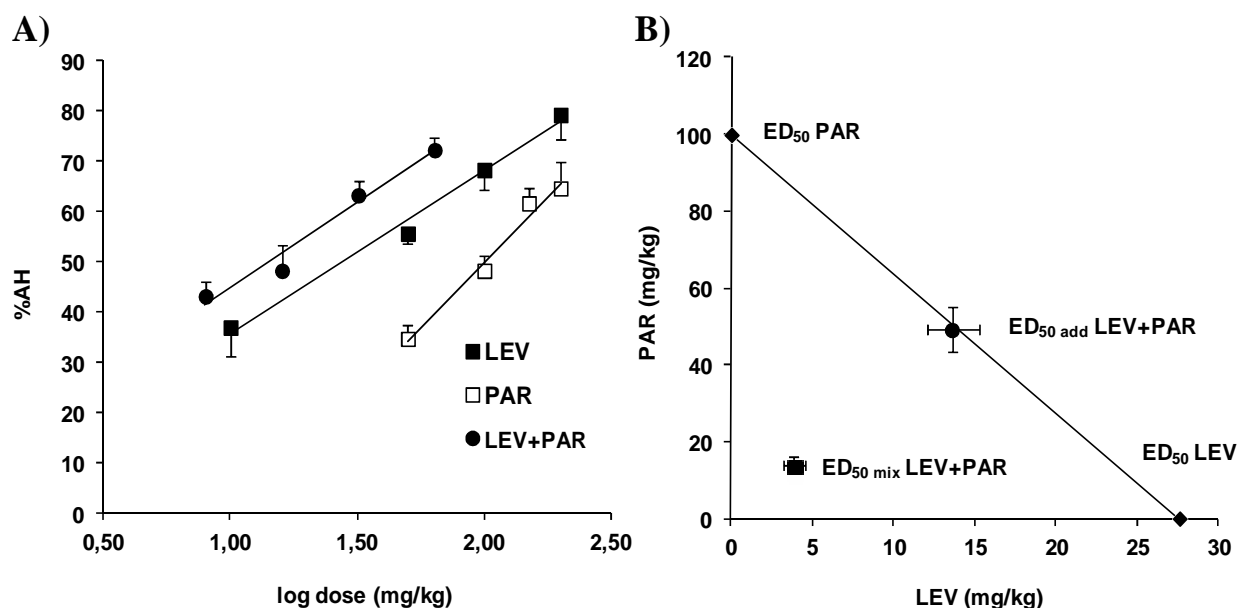
Levetiracetam i paracetamol primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  vrednosti (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2) ostvarili su statistički značajno i dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo u inflamatornom modelu bola u pacova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 32). Maksimalno antihiperalgezijsko dejstvo (%AH) kombinacije levetiracetam-paracetamol postiže se 90 min nakon p.o. primene levetiracetama i paracetamola uz %AH od 33,02% (1/16 + 1/16  $ED_{50}$ ; p.o.), 47,57% (1/8 + 1/8  $ED_{50}$ ; p.o.), 61,41% (1/4 + 1/4  $ED_{50}$ ; p.o.) i 81,39% (1/2 + 1/2  $ED_{50}$ ; p.o.) (nije prikazano). Kriva odnosa log doza kombinacije levetiracetama i paracetamola i %AH u trenutku postizanja maksimalnih efekata ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,996$ ) (Slika 33A).

Izoblografaska analiza kombinacije levetiracetama i paracetamola izvedena je na način opisan kod kombinacije levetiracetam-ibuprofen (videti Rezultate, poglavlje 3.1.2.).  $ED_{50}^{mix}$  kombinacije levetiracetam-paracetamol značajno je manja od  $ED_{50}^{add}$  ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test) (Tabela 7), što ukazuje da levetiracetam i paracetamol ostvaruju sinergističku interakciju (Tallarida i sar., 1997). Na sinergističku interakciju ukazuje i podatak da se 95%-ni intervali poverenja  $ED_{50}^{mix}$  LEV+PAR i  $ED_{50}^{add}$  LEV+PAR ne preklapaju (Slika 33B). Niska vrednost indeksa interakcije ( $\gamma < 1$ ),

takođe ide u prilog sinergističkoj interakciji između levetiracetama i paracetamola (Tabela 7). Dužine trajanja dejstva levetiracetama, paracetamola i levetiracetam-paracetamol kombinacije upoređivane su posredstvom nagiba krivih odnosa antihiperalgezijskog dejstva (%AH) i razlike površina ispod krivih kontrolne i eksperimentalne grupe ( $\Delta$ PIK), koji je merilo dužine trajanja dejstva lekova/kombinacija lekova. Pokazano je da postoji statistički značajna razlika u nagibima krivih za levetiracetam ( $1,30 \pm 0,10$ ) i levetiracetam-paracetamol ( $1,01 \pm 0,01$ ) kombinaciju ( $p < 0,05$ ; test paralelizma), ali ne i između levetiracetama i paracetamola ( $1,08 \pm 0,11$ ) ili paracetamola i levetiracetam-paracetamol kombinacije ( $p > 0,05$ ; test paralelizma) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a). Ovo znači da kombinacija levetiracetam-paracetamol ima kraće dejstvo od dejstva pojedinačno primenjenog levetiracetama. Visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 1$ ; nije prikazano) krive odnosa %AH i  $\Delta$ PIK, ukazuje da je dužina trajanja dejstva kombinacije levetiracetam-paracetamol dozno-zavisna (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 32.** Vremenski tok antihiperalgezijskog dejstva levetiracetam-paracetamol ( $LEV+PAR$ ) kombinacije, izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom,  $df$  (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije i primene lekova. Intraplantarna injekcija (i.pl.) karagenina ( $CAR$ ) primenjena je 60 min pre peroralne (p.o.) primene  $PAR$  i  $LEV$  (p.o.) (obeleženo strelicama).  $LEV$  i  $PAR$  su primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  ( $1/16=0,0625$ ;  $1/8=0,125$ ;  $1/4=0,25$  i  $1/2=0,5$ ). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm SEM$  razlike u pritiscima oslanjanja,  $df$  (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu krivu.



**Slika 33. A)** Regresione krive odnosa log doze i antihiperalgezijskog dejstva (%AH) u trenutku postizanja maksimalnog efekta levetiracetama (LEV), paracetamola (PAR) i levetiracetam-paracetamol (LEV+PAR) kombinacije u inflamatornom modelu bola u pacova. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-8 životinja. **B)** Izobologram za LEV+PAR kombinaciju u inflamatornom modelu bola u pacova. ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova (određene u trenutku postizanja maksimalnog efekta) obeležene su na osama. Linija koja povezuje pojedinačne ED<sub>50</sub> lekova je teorijska linija aditivnosti, a tačka na njoj je ED<sub>50</sub> add (teorijska aditivna ED<sub>50</sub>). Između ED<sub>50</sub> add i ED<sub>50</sub> mix (eksperimentalna ED<sub>50</sub> za kombinaciju lekova), postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test), što ukazuje na sinergističku interakciju između levetiracetama i paracetamola.

**Tabela 7.** ED<sub>50</sub>  $\pm$  SEM vrednosti (mg/kg) sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) izmereni u trenutku maksimalnog antihiperalgezijskog efekta nakon p.o. primene levetiracetama, paracetamola i njihove kombinacije u inflamatornom modelu bola u pacova

Lek/kombinacija lekova	ED <sub>50</sub> <sup>a</sup> $\pm$ SEM (95%-ni intervali poverenja)			
levetiracetam	27,59 $\pm$ 2,72 (18,03 – 42,21)			
paracetamol	99,90 $\pm$ 5,15 (80,02 – 124,72)			
	maseni odnos doza	ED <sub>50</sub> add	ED <sub>50</sub> mix <sup>d</sup>	$\gamma$ <sup>b</sup>
levetiracetam+paracetamol	1:3,6	63,75 $\pm$ 3,03 (55,67 – 70,54)	17,46 $\pm$ 0,88* (14,89 – 20,85)	0,27

<sup>a</sup> ED<sub>50</sub> = doza leka koja ostvaruje 50% antihiperalgezijskog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = \text{ED}_{50} \text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA PARACETAMOLOM} / \text{ED}_{50} \text{ LEVETIRACETAM} + \text{ED}_{50} \text{ PARACETAMOL U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM} / \text{ED}_{50} \text{ PARACETAMOL}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

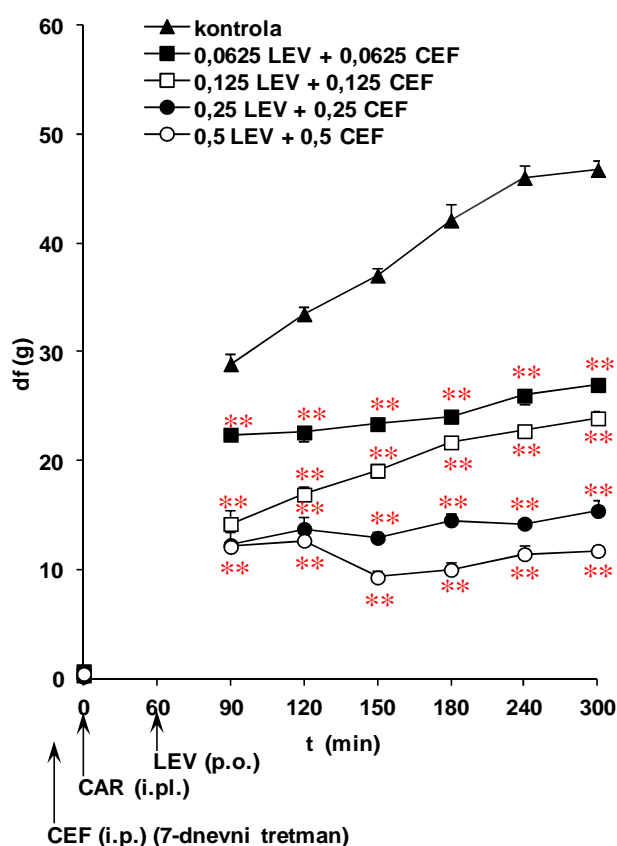
<sup>c</sup> ED<sub>50</sub> add = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

<sup>d</sup> ED<sub>50</sub> mix = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

\*  $p < 0,05$  između ED<sub>50</sub> add i ED<sub>50</sub> mix ( $t$ -test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).

### 3.1.5. Efekti kombinovane primene levetiracetama i ceftriaksona

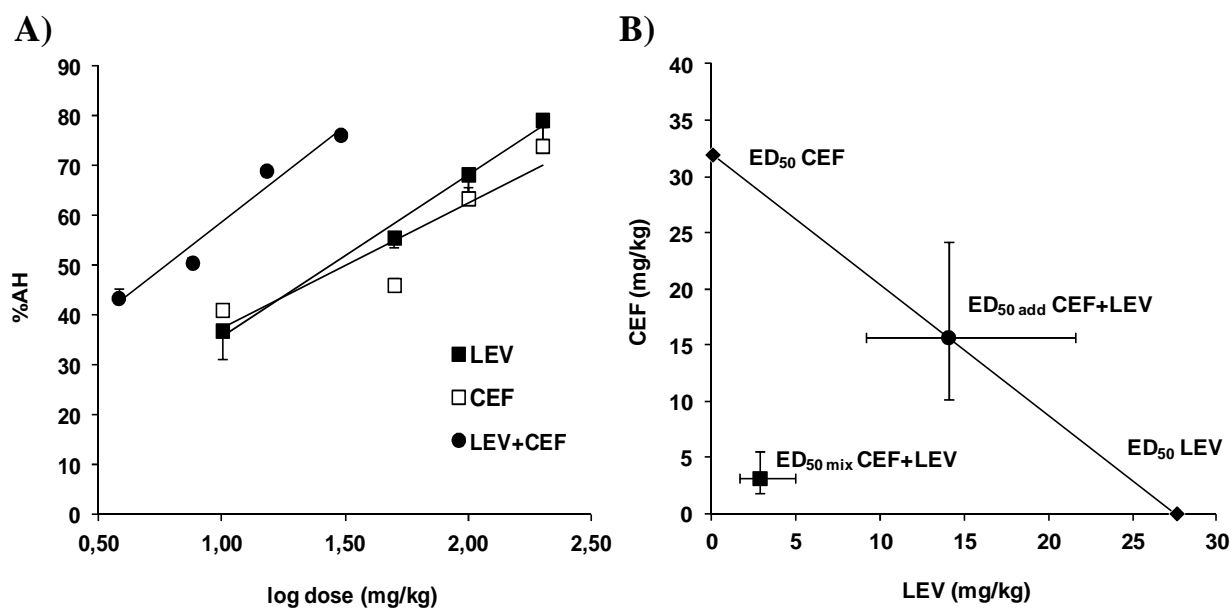
U modifikovanom testu pritiska na šapu pacova, kombinacija levetiracetama (p.o.) i ceftriaksona (i.p.; 7-dnevna primena), primenjenih u fiksnim frakcijama pojedinačnih ED<sub>50</sub> (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2) značajno je i dozno-zavisno smanjila razliku u pritiscima oslanjanja između zdrave šape i šape sa hiperalgezijom izazvanom i.pl. injekcijom karagenina, df (g) ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 34). Maksimumi antihiperalgezijskog dejstva (%AH) kombinacije levetiracetam-ceftriakson postignuti su 180-240 min nakon indukcije inflamacije karageninom (i.pl.). Odgovarajući %AH iznose 43,49% (1/16 + 1/16 ED<sub>50</sub>; p.o./i.p.), 50,57% (1/8 + 1/8 ED<sub>50</sub>; p.o./i.p.), 69,08% (1/4 + 1/4 ED<sub>50</sub>; p.o./i.p.) i 76,28% (1/2 + 1/2 ED<sub>50</sub>; p.o./i.p.) (nije prikazano). Kriva odnosa log doza kombinacije levetiracetama i ceftriaksona i %AH u trenutku maksimalnih efekata ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,983$ ) (Slika 35A).



**Slika 34.** Vremenski tok antihiperalgezijskog dejstva levetiracetam-ceftriakson (**LEV+CEF**) kombinacije, izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgezijom, df (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije intraplantarnom injekcijom (i.pl.) karagenina (CAR). CEF je primenjivan intraperitonealno (i.p.), svakodnevno tokom 7 dana, a 8. dana je rađen eksperiment, dok je LEV je primenjen peroralno (p.o.) 60 min nakon CAR (i.pl.) (obeleženo strelicama). LEV i CEF su primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih ED<sub>50</sub> (1/16=0,0625; 1/8=0,125; 1/4=0,25 i 1/2=0,5). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, df (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu krivu.



Izobolografskom analizom (detaljan postupak opisan u poglavlju 3.1.2. Rezultata) procenjeno je da levetiracetam i ceftriakson ostvaruju sinergističku interakciju u inflamatornom modelu bola u pacova, jer je vrednost  $ED_{50\text{ mix}}$  kombinacije značajno manja od  $ED_{50\text{ add}}$  ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test) (Tallarida i sar., 1997), a indeks interakcije ( $\gamma$ ) manji od 1 (Tabela 8). Na izobologramu se može videti da se 95%-ni intervali poverenja  $ED_{50\text{ mix LEV+CEF}}$  i  $ED_{50\text{ add LEV+CEF}}$  ne preklapaju (Slika 35B), što je grafički pokazatelj sinergizma između levetiracetama i ceftriaksona. Dužina trajanja dejstva ceftriaksona veća je u odnosu na dužinu trajanja dejstva levetiracetama, jer je pokazano da je nagib krive %AH- $\Delta$ PIK za ceftriakson ( $1,62 \pm 0,36$ ) statistički značajno veći od nagiba odgovarajuće krive za levetiracetam ( $1,30 \pm 0,10$ ) ( $p < 0,05$ ; test paralelizma). S druge strane, ne postoji značajna razlika u dužini trajanja dejstva levetiracetam-ceftriakson kombinacije ( $1,41 \pm 0,19$ ) u odnosu na dužinu trajanja dejstva pojedinačnih lekova ( $p > 0,05$ ; test paralelizma) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a). Dužina trajanja dejstva ispitivane kombinacije zavisi od primenjene doze, s obzirom da kriva odnosa %AH- $\Delta$ PIK kombinacije ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 1$ ; nije prikazano) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 35.** A) Regresione krive odnosa log doze i antihiperalgezijskog dejstva (%AH) u trenutku postizanja maksimalnog efekta levetiracetama (LEV), ceftriaksona (CEF) i levetiracetam-ceftriakson (LEV+CEF) kombinacije u inflamatornom modelu bola u pacova. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-8 životinja. B) Izobologram za LEV+CEF kombinaciju u inflamatornom modelu bola u pacova.  $ED_{50}$  vrednosti pojedinačnih lekova (određene u trenutku postizanja maksimalnog efekta) obeležene su na osama. Linija koja povezuje pojedinačne  $ED_{50}$  lekova je teorijska linija aditivnosti, a tačka na njoj je  $ED_{50\text{ add}}$  (teorijska aditivna  $ED_{50}$ ). Između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  (eksperimentalna  $ED_{50}$  za kombinaciju lekova), postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test), što ukazuje na sinergističku interakciju između levetiracetama i ceftriaksona.

**Tabela 8.**  $ED_{50} \pm SEM$  vrednosti sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) izmereni u trenutku maksimalnog antihiperalgezijskog efekta nakon primene levetiracetama (mg/kg) (p.o.), ceftriaksona (mg/kg/dan) (i.p./7-dnevni tretman) i njihove kombinacije u inflamatornom modelu bola u pacova

Lek/kombinacija lekova		$ED_{50}^a \pm SEM$ (95%-ni intervali poverenja)		
levetiracetam		27,59 $\pm$ 2,72 (18,03 – 42,21)		
ceftriakson		31,96 $\pm$ 12,02 (6,32 – 161,61)		
	maseni odnos doza	$ED_{50\text{ add}}$	$ED_{50\text{ mix}}^d$	$\gamma^b$
levetiracetam+ceftriakson	1,12:1	30,24 $\pm$ 5,24 (19,32 – 45,83)	5,93 $\pm$ 0,77* (3,39 – 10,38)	0,20

<sup>a</sup>  $ED_{50}$  = doza leka koja ostvaruje 50% antihiperalgezijskog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = ED_{50\text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA CEFTRIAKSONOM}} / ED_{50\text{ LEVETIRACETAM}} + ED_{50\text{ CEFTRIAKSON U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM}} / ED_{50\text{ CEFTRIAKSON}}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

<sup>c</sup>  $ED_{50\text{ add}}$  = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

<sup>d</sup>  $ED_{50\text{ mix}}$  = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

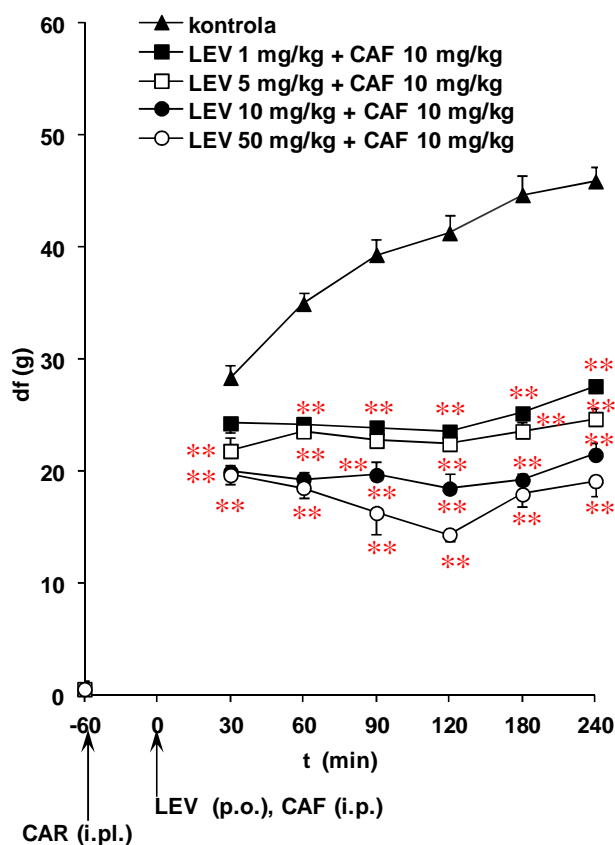
\*  $p < 0,05$  između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  ( $t$ -test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).

### 3.1.6. Efekti kombinovane primene levetiracetama i kofeina

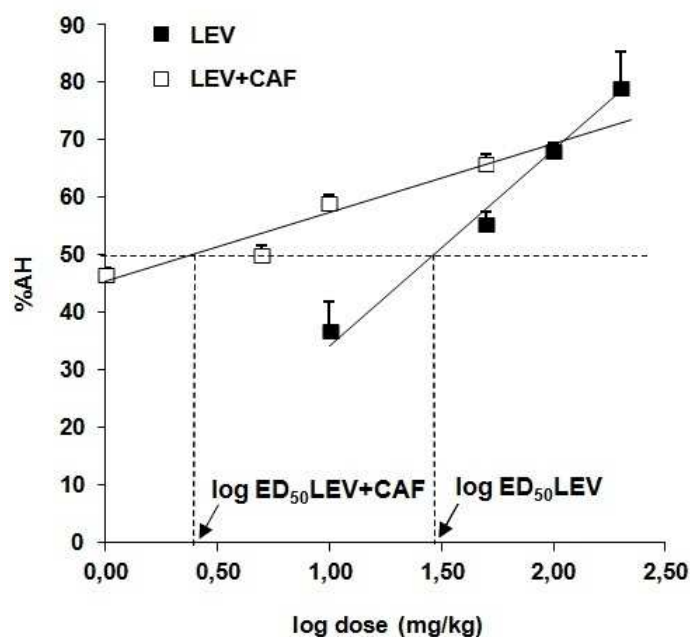
Levetiracetam (1-50 mg/kg; p.o.)-kofein (10 mg/kg; i.p.) kombinacija izazvala je statistički značajno i dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 36). Kombinacija postiže maksimalno antihiperalgezijsko dejstvo (%AH) 120-180 min nakon primene levetiracetama (p.o.) i kofeina (i.p.), a odgovarajući %AH iznose 46,67% (1/16 + 1/16  $ED_{50}$ ; p.o./i.p.), 50,08% (1/8 + 1/8  $ED_{50}$ ; p.o./i.p.), 59,24% (1/4 + 1/4  $ED_{50}$ ; p.o./i.p.) i 66% (1/2 + 1/2  $ED_{50}$ ; p.o./i.p.) (nije prikazano). Kriva odnosa log doza kombinacije levetiracetam-kofein i %AH u trenutku maksimalnih efekata ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,959$ ) (Slika 37).

Zabeležen je značajan pomak u levo regresione krive odnosa log doza i efekata levetiracetama u prisustvu fiksne doze kofeina (10 mg/kg; i.p.), u poređenju sa regresionom krivom levetiracetama primenjenog *per se* ( $p < 0,05$ ; test poređenja dve regresione krive) (Slika 37), što ukazuje da kofein potencira antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama u inflamatornom modelu bola u pacova. Ove dve krive nisu paralelne, već konvergiraju i presecaju se, a potencijacija se jasno uočava pri dozama levetiracetama koje daju oko 50%AH i manjim (Slika 37).  $ED_{50} \pm SEM$  (95%-ni interval poverenja) za levetiracetam u prisustvu kofeina iznosi 2,45  $\pm$

0,90 (0,50–12,01) mg/kg, što je značajno manje od  $ED_{50}$  vrednosti levetiracetama primenjenog *per se*  $27,59 \pm 2,72$  (18,03 – 42,21) mg/kg. Odnos jačina između ove dve  $ED_{50}$  vrednosti iznosi 3,50 (1,60 – 6,92), a kako je donja granica intervala poverenja veća od 1, smatra se da je razlika između  $ED_{50\text{ LEV+CAF}}$  i  $ED_{50\text{ LEV}}$  statistički značajna, što potvrđuje sinergističku interakciju između levetiracetama i kofeina ( $p < 0,05$ ; test odnosa jačina). Nagibi kriva odnosa antihiperalgzijskog dejstva (%AH) i razlike površina ispod krivih kontrolne i eksperimentalne grupe ( $\Delta\text{PIK}$ ) za levetiracetam (1,30  $\pm$  0,10), kofein (0,91  $\pm$  0,07) i levetiracetam-kofein kombinaciju (1,36  $\pm$  0,06) se ne razlikuju značajno ( $p > 0,05$ ; test paralelizma) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a), ukazujući da svi ispitivani tretmani imaju približno istu dužinu trajanja dejstva. Dužina trajanja dejstva levetiracetam-kofein kombinacije zavisi od primenjene doze, s obzirom da kriva odnosa %AH- $\Delta\text{PIK}$  kombinacije ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,998$ ; nije prikazano) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 36.** Vremenski tok antihiperalgzijskog dejstva levetiracetam-kofein (LEV+CAF) kombinacije, izraženog kao razlika u pritiscima oslanjanja na zdravu šapu i šapu sa hiperalgzijom, df (g). Bazalna merenja (označeno na y-osi) izmerena su pre indukcije inflamacije i primene LEV i CAF. Intraplantarna injekcija (i.pl.) karagenina (CAR) primenjena je 60 min pre peroralne (p.o.) primene LEV i intraperitonealne (i.p.) primene CAF (obeleženo strelicama). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM razlike u pritiscima oslanjanja, df (g), dobijenu testiranjem 6-8 životinja. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu krivu.



**Slika 37.** Regresione krive odnosa log doze i antihiperalgezijskog dejstva (%AH) u trenutku postizanja maksimalnog efekta levetiracetama (LEV) i levetiracetam-kofein (LEV+CAF) kombinacije u inflamatornom modelu bola u pacova. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM grupe od 6-8 pacova. Postoji statistički značajno pomeranje krive LEV+CAF u levo u odnosu na krivu LEV, što ukazuje na potencijaciju antihiperalgezijskog efekta LEV od strane kofeina ( $p < 0,05$ ; test poređenja dve regresione krive).  $ED_{50}$  za LEV u prisustvu CAF značajno je manja od  $ED_{50}$  za sam LEV ( $p < 0,05$ ; test odnosa jačina).

### 3.1.7. Rangiranje kombinacija levetiracetama sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom i ceftriaksonom prema stepenu sinergizma

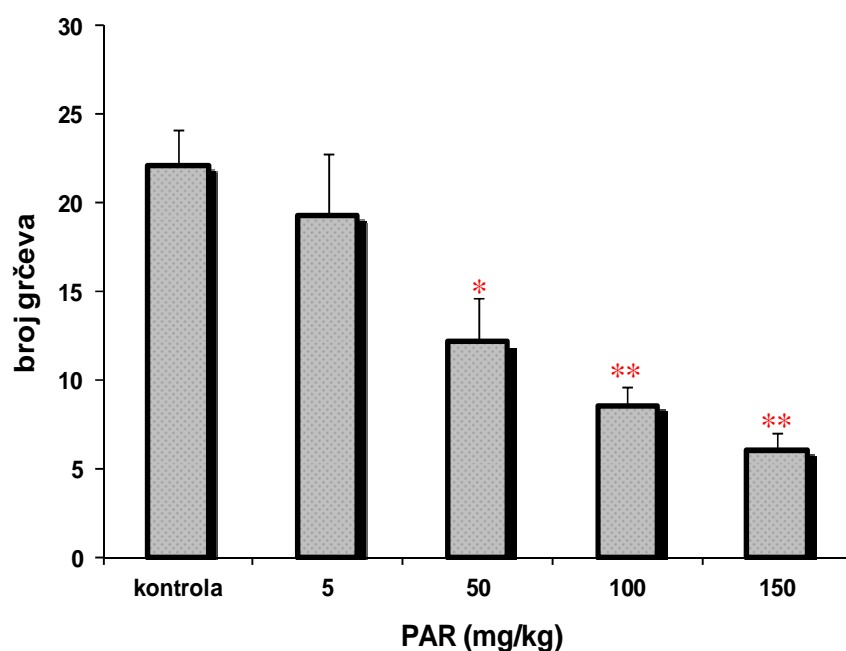
U inflamatornom modelu bola u pacova, levetiracetam je ostvario sinergističku interakciju sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom i ceftriaksonom (Slike 29B, 31B, 33B i 35B). Prema vrednostima indeksa interakcije ( $\gamma$ ), koji opisuje stepen sinergizma između dva leka visoke analgetičke efikasnosti primenjenih u kombinaciji (što je vrednost  $\gamma$  manja, sinergizam/potencijacija među komponentama je veća), ispitivane kombinacije mogu se rangirati na sledeći način:

1. levetiracetam-ibuprofen ( $\gamma = 0,18$ )
2. levetiracetam-ceftriakson ( $\gamma = 0,20$ )
3. levetiracetam-celekoksib ( $\gamma = 0,22$ )
4. levetiracetam-paracetamol ( $\gamma = 0,27$ ) (Tabele 5, 6, 7 i 8).

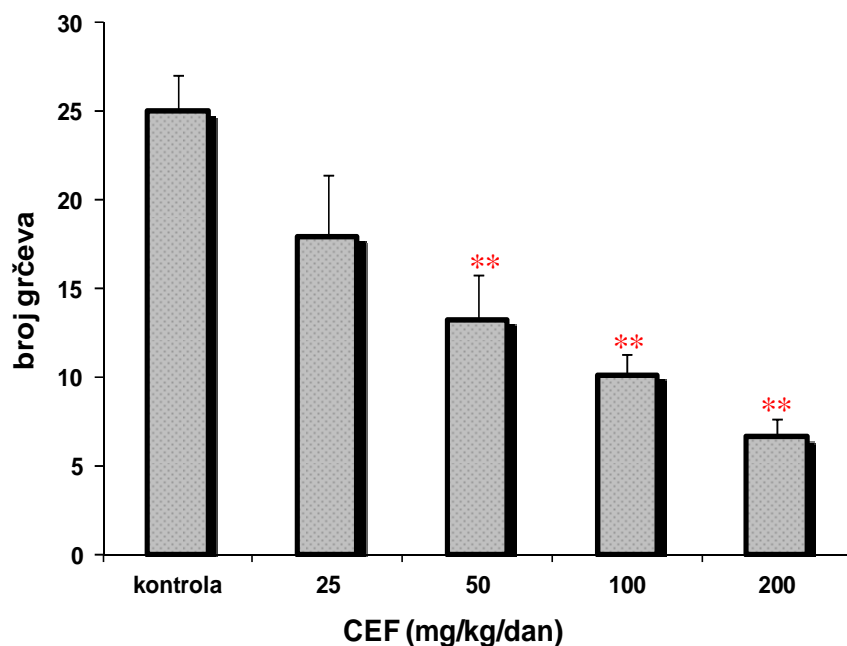
### 3.2. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelu visceralnog bola u miševa

#### 3.2.1. Efekti paracetamola i ceftriaksona

U testu abdominalnih grčeva u miševa, paracetamol (5-150 mg/kg; p.o.) i ceftriakson (25-200 mg/kg/dan; tokom 7 dana; i.p.) statistički su značajno i dozno-zavisno smanjili broj grčeva (N) izazvanih injekcijom (i.p.) rastvora sirćetne kiseline ( $p < 0,01$ ; Kruskal-Wallis test) (Slike 38 i 39). *Paracetamol* ostvaruje antinociceptivnu aktivnost od 20%, 40,3%, 61,4% i 72,7%AA za doze od 5, 50, 100 i 150 mg/kg, redom (nije prikazano). Kriva odnosa log doze i antinociceptivnog efekta paracetamola ima visok koeficijent korelacije ( $r = 0,952$ ) (Slika 41A). Odgovarajuća  $ED_{50}$  vrednost  $\pm$  SEM (95%-ni interval poverenja) za paracetamol iznosi  $48,43 \pm 14,48$  (13,36-175,58) mg/kg (Tabela 9). Antinociceptivni efekat *ceftriaksona* iznosi 24,1% (25 mg/kg/dan; i.p.), 44,3% (50 mg/kg/dan; i.p.), 58,9% (100 mg/kg/dan; i.p.) i 74,6% (200 mg/kg/dan; i.p.) (nije prikazano). Kriva odnosa log doze i %AA ceftriaksona ima visok koeficijent korelacije ( $r = 0,997$ ) (Slika 43A). Odgovarajuća  $ED_{50} \pm$  SEM (95%-tni interval poverenja) iznosi  $69,32 \pm 2,76$  (58,39 – 82,31) mg/kg (Tabela 10).



**Slika 38.** Antinociceptivno dejstvo paracetamola (PAR), izraženo kao broj grčeva izazvanih intraperitonealnom injekcijom rastvora sirćetne kiseline. PAR je primenjen per os 55 minuta pre rastvora sirćetne kiseline. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Kruskal-Wallis potom Mann-Whitney U test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

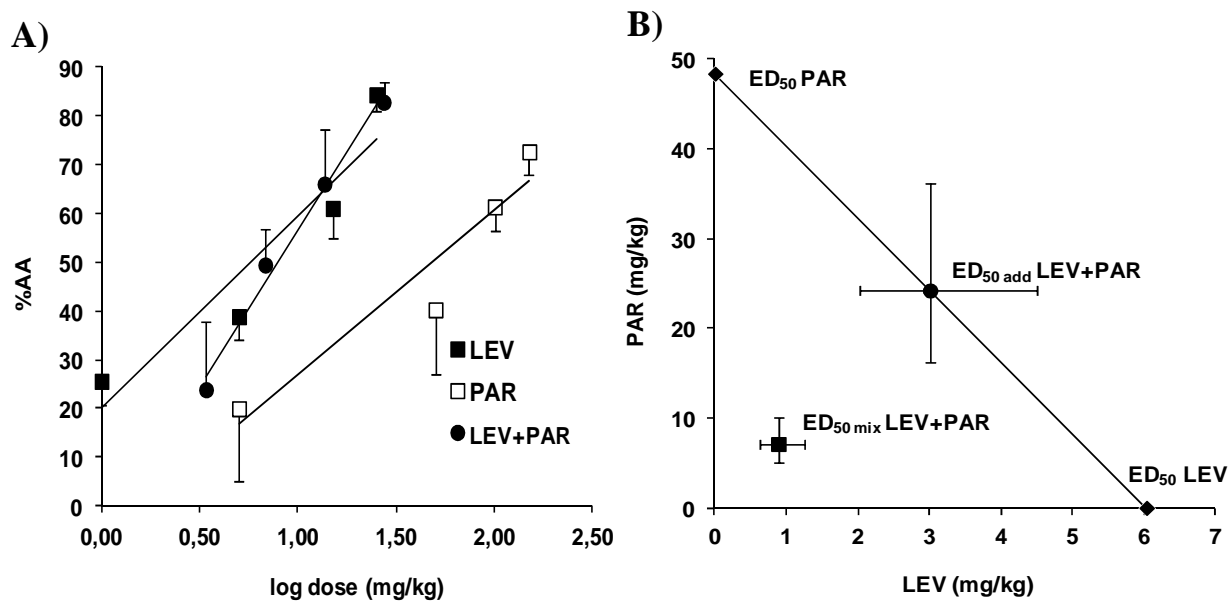
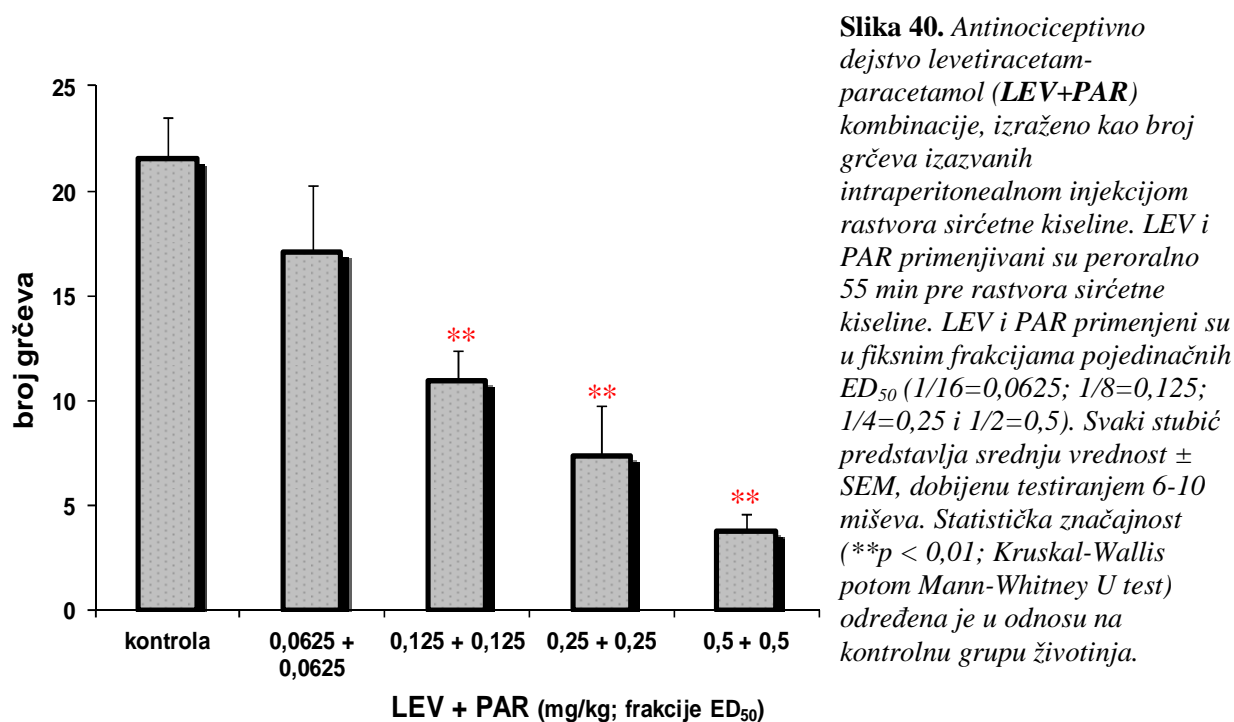


**Slika 39.** Antinociceptivno dejstvo ceftriaksona (CEF), izraženo kao broj grčeva izazvanih intraperitonealnom injekcijom (i.p.) rastvora sirćetne kiseline. CEF je primenjivan i.p. uzastopno tokom 7 dana, a 8. dana je rađen eksperiment. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; Kruskal-Wallis potom Mann-Whitney U test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

### 3.2.2. Efekti kombinovane primene levetiracetama i paracetamola

Levetiracetam i paracetamol primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  vrednosti (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2) statistički su značajno i dozno-zavisno smanjili broj grčeva (N) izazvanih injekcijom (i.p.) rastvora sirćetne kiseline ( $p < 0,01$ ; Kruskal-Wallis U test) (Slika 40). Kombinacija levetiracetam-paracetamol postiže antinociceptivne efekte (%AA) od 23,9% (1/16 + 1/16  $ED_{50}$ ; p.o.), 49,5% (1/8 + 1/8  $ED_{50}$ ; p.o.), 66,1% (1/4 + 1/4  $ED_{50}$ ; p.o.) i 80% (1/2 + 1/2  $ED_{50}$ ; p.o.) u visceralnom modelu bola u miševa (nije prikazano). Kriva odnosa log doza kombinacije levetiracetam-paracetamol i %AA ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,990$ ) (Slika 41A).

Tip interakcije između levetiracetama i paracetamola u visceralnom modelu bola u miševa određivan je izoblografskom analizom (postupak opisan u poglavlju 3.1.2. Rezultata).  $ED_{50 \text{ mix}}$  kombinacije levetiracetam-paracetamol značajno je manja od  $ED_{50 \text{ add}}$  ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test) (Tabela 9), što ukazuje da levetiracetam i paracetamol ostvaruju sinergističku interakciju (Tallarida i sar., 1997). Na sinergističku interakciju ukazuje i podatak da se 95%-ni intervali poverenja  $ED_{50 \text{ mix LEV+PAR}}$  i  $ED_{50 \text{ add LEV+PAR}}$  ne preklapaju, prikazano na izoblogramu (Slika 41B). Niska vrednost indeksa interakcije ( $\gamma < 1$ ), takođe ide u prilog sinergističkoj interakciji između levetiracetama i paracetamola u visceralnom modelu bola u miševa (Tabela 9).



**Tabela 9.**  $ED_{50} \pm SEM$  vrednosti (mg/kg) sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) nakon p.o. primene levetiracetama, paracetamola i njihove kombinacije u visceralnom modelu bola u miševa

Lek/kombinacija lekova	$ED_{50}^a \pm SEM$ (95%-ni intervali poverenja)			
levetiracetam	$6,03 \pm 1,62$ (1,90 - 19,13)			
paracetamol	$48,43 \pm 14,48$ (13,36 - 175,58)			
	maseni odnos doza	$ED_{50\text{ add}}$	$ED_{50\text{ mix}}^d$	$\gamma^b$
levetiracetam+paracetamol	8,07:1	$27,25 \pm 4,48$ (18,23 – 40,75)	$8,01 \pm 0,66^*$ (5,64 – 11,40)	0,29

<sup>a</sup>  $ED_{50}$  = doza leka koja ostvaruje 50% antinociceptivnog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = ED_{50\text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA PARACETAMOLOM}}/ED_{50\text{ LEVETIRACETAM}} + ED_{50\text{ PARACETAMOL U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM}}/ED_{50\text{ PARACETAMOL}}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

<sup>c</sup>  $ED_{50\text{ add}}$  = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

<sup>d</sup>  $ED_{50\text{ mix}}$  = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

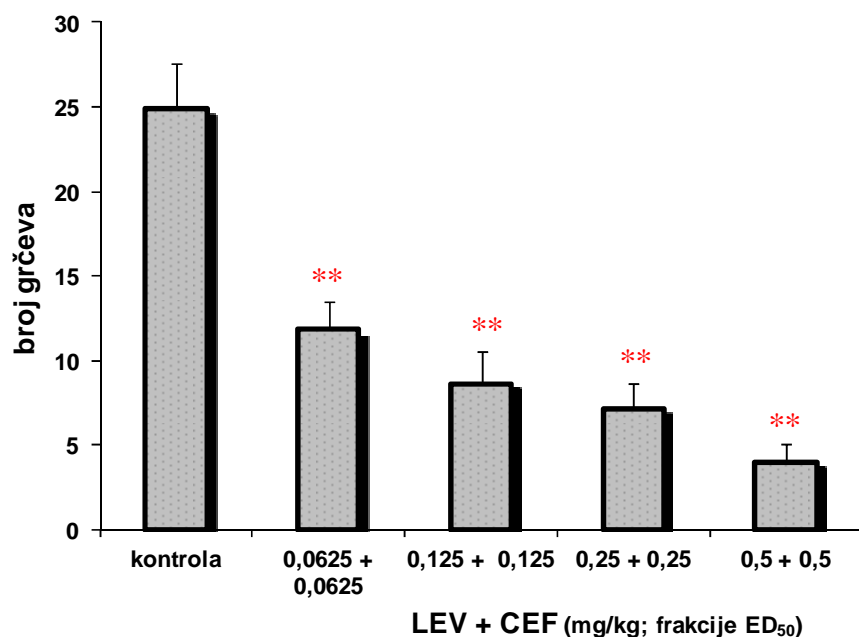
\*  $p < 0,05$  između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  ( $t$ -test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).

### 3.2.3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i ceftriaksona

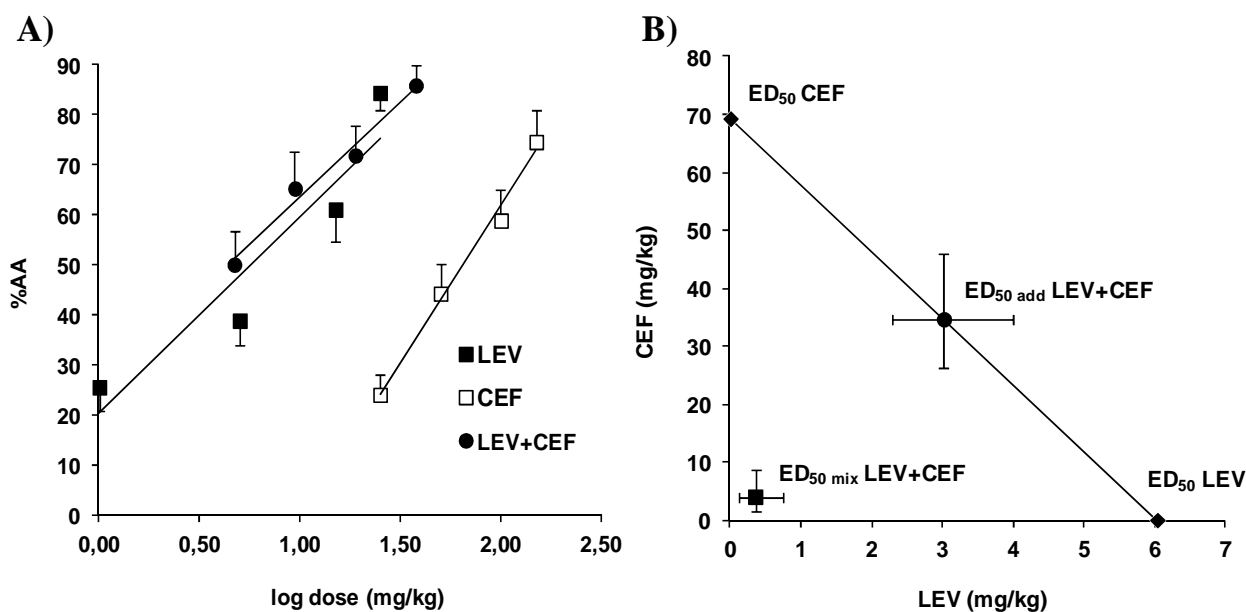
Kombinacija levetiracetama (p.o.) i ceftriaksona (7-dnevna primena; i.p.) u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  vrednosti (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2) ostvarila je statistički značajno i dozno-zavisno smanjenje broja grčeva (N) izazvanih i.p. injekcijom rastvora sirćetne kiseline miševima ( $p < 0,01$ ; Kruskal-Wallis test) (Slika 42). Kombinacija levetiracetam-ceftriakson ostvaruje antinociceptivne efekte (%AA) od 50,1% (1/16 + 1/16  $ED_{50}$ ; p.o./i.p.), 65,3% (1/8 + 1/8  $ED_{50}$ ; p.o./i.p.), 71,9% (1/4 + 1/4  $ED_{50}$ ; p.o./i.p.) i 85,9% (1/2 + 1/2  $ED_{50}$ ; p.o./i.p.) u visceralnom modelu bola u miševa (nije prikazano). Kriva odnosa log doza i %AA ispitivane kombinacije ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,990$ ) (Slika 43A).

Tip interakcije između levetiracetama i ceftriaksona u visceralnom modelu bola u miševa određivan je izobolografskom analizom (postupak opisan u poglavlju 3.1.2. Rezultata).  $ED_{50\text{ mix}}$  kombinacije levetiracetam-ceftriakson značajno je manja od odgovarajuće  $ED_{50\text{ add}}$  ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test) (Tabela 10), što ukazuje da levetiracetam i ceftriakson ostvaruju sinergističku interakciju (Tallarida i sar., 1997). Na sinergističku interakciju ukazuje i podatak da se 95%-ni intervali poverenja  $ED_{50\text{ mix LEV+CEF}}$  i  $ED_{50\text{ add LEV+CEF}}$  ne preklapaju, prikazano na izobologramu (Slika 43B), kao i vrednost indeksa interakcije ( $\gamma$ ) manja od 1 (Tabela 10).





**Slika 42.** Antinociceptivno dejstvo levetiracetam-ceftriakson (**LEV+CEF**) kombinacije, izraženo kao broj grčeva izazvanih intraperitonealnom (i.p.) injekcijom rastvora sirćetne kiseline. CEF je primenjivan i.p. uzastopno tokom 7 dana, a 8. dana je rađen eksperiment, dok je LEV primenjen peroralno 55 min pre rastvora sirćetne kiseline. LEV i CEF primenjeni su u fiksnim frakcijama pojedinačnih ED<sub>50</sub> (1/16=0,0625; 1/8=0,125; 1/4=0,25 i 1/2=0,5). Svaki stubić predstavlja srednju vrednost ± SEM, dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\*\*p < 0,01; Kruskal-Wallis potom Mann-Whitney U test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



**Slika 43.** A) Regresione krive odnosa log doze i antinociceptivnog dejstva (%AA) levetiracetama (**LEV**), ceftriaksona (**CEF**) i levetiracetam-ceftriakson (**LEV+CEF**) kombinacije u visceralnom modelu bola u miševa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SEM dobijenu testiranjem 6-10 životinja. B) Izobologram za **LEV+CEF** kombinaciju u visceralnom modelu bola u miševa. ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova obeležene su na osama. Linija koja povezuje pojedinačne ED<sub>50</sub> lekova je teorijska linija aditivnosti, a tačka na njoj je ED<sub>50 add</sub> (teorijska aditivna ED<sub>50</sub>). Između ED<sub>50 add</sub> i ED<sub>50 mix</sub> (eksperimentalna ED<sub>50</sub> za kombinaciju lekova), postoji statistički značajna razlika (p < 0,05; t-test), što ukazuje na sinergističku interakciju između levetiracetama i ceftriaksona.

**Tabela 10.**  $ED_{50} \pm SEM$  vrednosti sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) nakon primene levetiracetama (mg/kg) (p.o.), ceftriaksona (mg/kg/dan) (i.p./7-dnevni tretman) i njihove kombinacije u visceralnom modelu bola u miševa

Lek/kombinacija lekova	$ED_{50}^a \pm SEM$ (95%-ni intervali poverenja)			
levetiracetam	6,03 $\pm$ 1,62 (1,90 – 19,13)			
ceftriakson	69,32 $\pm$ 2,76 (58,39 – 82,31)			
	maseni odnos doza	$ED_{50 \text{ add}}$	$ED_{50 \text{ mix}}^d$	$\gamma^b$
levetiracetam+ceftriakson	11,50:1	37,68 $\pm$ 4,28 (27,79 – 49,07)	4,38 $\pm$ 0,60* (1,69 – 9,33)	0,12

<sup>a</sup>  $ED_{50}$  = doza leka koja ostvaruje 50% antinociceptivnog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = ED_{50 \text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA CEFTRIAKSONOM}} / ED_{50 \text{ LEVETIRACETAM}} + ED_{50 \text{ CEFTRIAKSON U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM}} / ED_{50 \text{ CEFTRIAKSON}}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

<sup>c</sup>  $ED_{50 \text{ add}}$  = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

<sup>d</sup>  $ED_{50 \text{ mix}}$  = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

\*  $p < 0,05$  između  $ED_{50 \text{ add}}$  i  $ED_{50 \text{ mix}}$  ( $t$ -test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).

### 3.2.4. Rangiranje kombinacija levetiracetama sa paracetamolom i ceftriaksonom prema stepenu sinergizma

U visceralnom modelu bola u miševa, levetiracetam je ostvario sinergističku interakciju sa paracetamolom i ceftriaksonom (Slike 41B i 43B). Prema vrednostima indeksa interakcije ( $\gamma$ ), koji opisuje stepen sinergizma između dva leka visoke analgetičke efikasnosti primenjenih u kombinaciji (što je vrednost  $\gamma$  manja, sinergizam/potencijacija među komponentama je veća), ispitivane kombinacije mogu se rangirati na sledeći način:

1. levetiracetam-ceftriakson ( $\gamma = 0,12$ )
2. levetiracetam-paracetamol ( $\gamma = 0,29$ ) (Tabele 9 i 10).

### 3.3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i ibuprofena, paracetamola, gabapentina, duloksetina i alfa-lipoiinske kiseline u modelu dijabetesne neuropatije u miševa

#### 3.3.1. Procena dijabetesa i dijabetesne neuropatije

Dve nedelje nakon injekcije streptozotocina (150 mg/kg; i.p.), dijabetični miševi imali su statistički značajno veću koncentraciju glukoze u krvi u poređenju sa vrednostima glikemije pre indukcije dijabetesa iste grupe miševa ( $p < 0,01$ ; uporedni  $t$ -test) (Tabela 11). Pored toga, dijabetični miševi razvili su klasične simptome dijabetesa, kao što je gubitak telesne mase ( $p < 0,01$ ; uporedni  $t$ -test) (Tabela 11). Tri nedelje nakon injekcije streptozotocina, kod dijabetičnih miševa zabeleženo je statistički značajno skraćanje reakcionih vremena u testu izmicanja repa pod uticajem toplote u poređenju sa bazalnim reakcionim vremenima iste grupe miševa od pre tri nedelje ( $p < 0,01$ ; uporedni  $t$ -test) (Tabela 11). Na bazi razlike u reakcionim vremenima pre i nakon indukcije dijabetesa, izračunat je procenat hiperalgezije (%HA), koji ukazuje da se kod dijabetičnih životinja razvila bolna dijabetesna neuropatija (Tabela 11).

**Tabela 11.** Opšti parametri  $\pm$  SEM pre i nakon indukcije dijabetesa injekcijom streptozotocina (150 mg/kg; i.p.). Koncentracija glukoze u krvi merena je pre i 2 nedelje nakon indukcije dijabetesa. Telesna masa i reakciono vreme mereni su pre i 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa. Na bazi razlika u reakcionim vremenima pre i nakon indukcije dijabetesa izračunat je procenat hiperalgezije (%HA).

parametar	telesna masa (g)	koncentracija glukoze u krvi (mmol/L)	reakciono vreme (s)	hiperalgezija (%HA)
pre indukcije dijabetesa (n=52)	25,59 $\pm$ 0,31	5,6 $\pm$ 0,3	25,59 $\pm$ 0,31	/
nakon indukcije dijabetesa (n=52)	22,06 $\pm$ 0,35**	HI**	22,18 $\pm$ 0,34**	-41,13 $\pm$ 1,98

HI znači da je koncentracija glukoze u krvi bila iznad gornjeg limita detekcije (> 30,6 mmol/L)

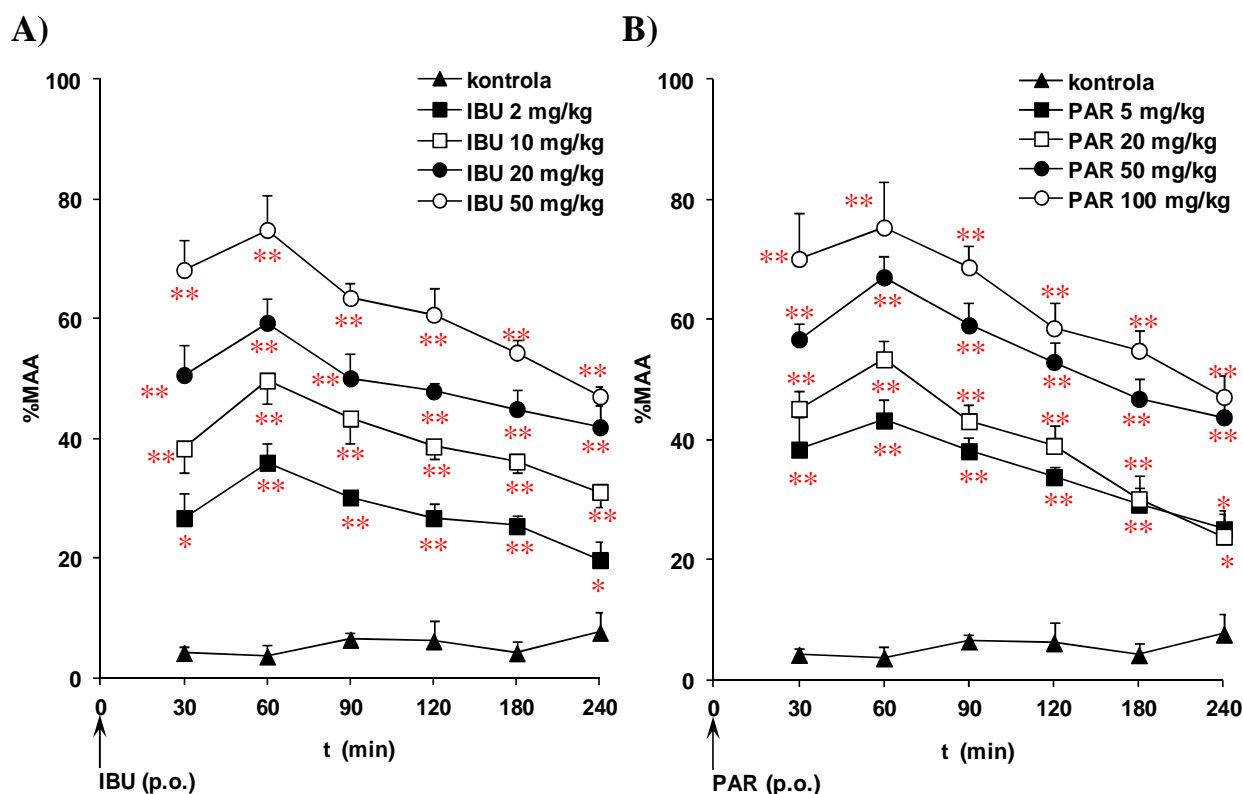
\*\*  $p < 0,01$ ; uporedni  $t$ -test za parove (pre i nakon indukcije dijabetesa)

U cilju ispitivanja interakcije levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika, najpre su ispitani efekti svakog leka pojedinačno. Za svaki lek je određena ED<sub>50</sub> pomoću odgovarajućih krivih odnosa log doze i efekta. Potom su ispitivane dvojne kombinacije levetiracetama i analgetika. Svi eksperimenti sprovedeni su 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa.

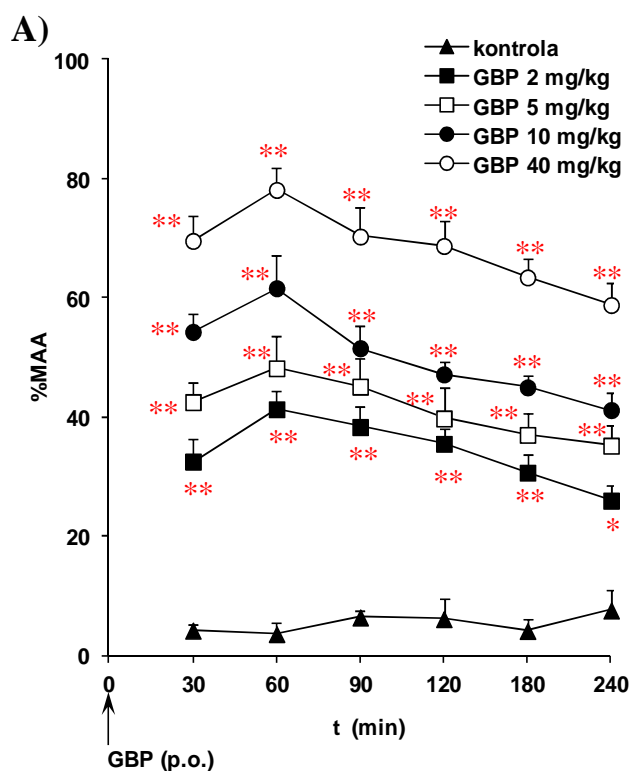
### 3.3.2. Efekti ibuprofena, paracetamola, gabapentina, duloksetina i alfa-liponske kiseline

U testu izmicanja repa pod uticajem toplote kod dijabetičnih miševa, ibuprofen (2-50 mg/kg; p.o.), paracetamol (5-100 mg/kg; p.o.), gabapentin (2-40 mg/kg; p.o.), duloksetin (1-30 mg/kg; p.o.) i alfa-liponska kiselina (12,5-100 mg/kg/dan; 7-dnevni tretman, p.o.) ostvarili su statistički značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja koja je dobila odgovarajući rastvarač (p.o.) umesto ispitivanog leka ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slike 44 i 45). Kod svih ispitivanih doza *ibuprofena*, maksimum antinociceptivnog dejstva (%MAA) postiže se 60 min nakon p.o. primene, a odgovarajući %MAA iznose 35,95%, 49,71%, 59,36% i 74,90% za doze ibuprofena od 2, 10, 20 i 50 mg/kg, redom (Slika 44A). Kriva odnosa log doze i efekta ibuprofena konstruisana za vrednosti maksimalnog antinociceptivnog dejstva pokazuje visok stepen linearne korelacije ( $r = 0,984$ ) (Slika 47A). Srednja efektivna doza (95%-ni interval poverenja) ibuprofena u dijabetesnoj neuropatiji iznosi  $7,82 \pm 1,27$  (3,89 – 15,72) mg/kg (Tabela 12). *Paracetamol*, u svim ispitivanim dozama, postiže maksimalno antinociceptivno dejstvo 60 min nakon p.o. primene, a %MAA iznose 43,24% (5 mg/kg; p.o.), 53,41% (20 mg/kg; p.o.), 67,09% (50 mg/kg; p.o.) i 75,39% (100 mg/kg; p.o.) (Slika 44B). Kriva odnosa log doze i efekta paracetamola, u trenutku postizanja maksimalnog efekta, pokazuje visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,988$ ) (Slika 49A). Srednja efektivna doza (95%-ni interval poverenja) paracetamola u dijabetesnoj neuropatiji iznosi  $10,83 \pm 1,74$  (5,41 – 21,68) mg/kg (Tabela 13). Kod svih ispitivanih doza *gabapentina*, maksimum antinociceptivnog dejstva postiže se 60 min nakon p.o. primena, a %MAA iznose 41,32% (2 mg/kg; p.o.), 48,21% (5 mg/kg; p.o.), 61,65% (10 mg/kg; p.o.) i 78,15% (40 mg/kg; p.o.) (Slika 45A). Kriva odnosa log doze i efekta gabapentina konstruisana za vrednosti maksimalnog antinociceptivnog dejstva pokazuje visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,991$ ) (Slika 51A). Srednja efektivna doza (95%-ni interval poverenja) gabapentina u dijabetesnoj neuropatiji iznosi  $4,47 \pm 0,54$  (2,66 – 7,52) mg/kg (Tabela 14). *Duloksetin* postiže maksimalno antinociceptivno dejstvo u svim ispitivanim dozama 90 min nakon p.o. primene, a odgovarajući %MAA iznose 43,51% (1 mg/kg; p.o.), 62,72% (5 mg/kg; p.o.), 73,08% (15 mg/kg; p.o.) i 83,43% (30 mg/kg; p.o.) (Slika 45B). Kriva odnosa log doze i maksimalnog antinociceptivnog efekta duloksetina pokazuje visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,998$ ) (Slika 53A). Srednja efektivna doza (95%-ni interval poverenja) duloksetina u dijabetesnoj neuropatiji iznosi  $1,75 \pm$

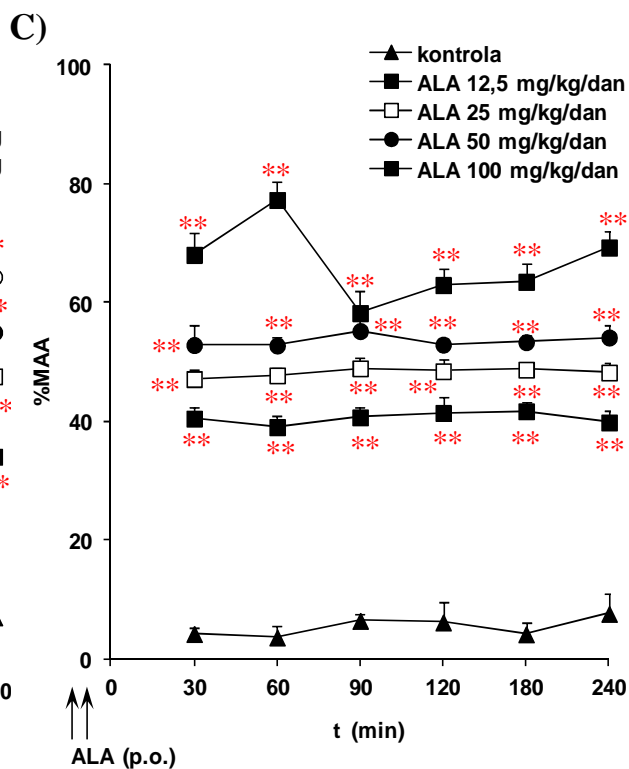
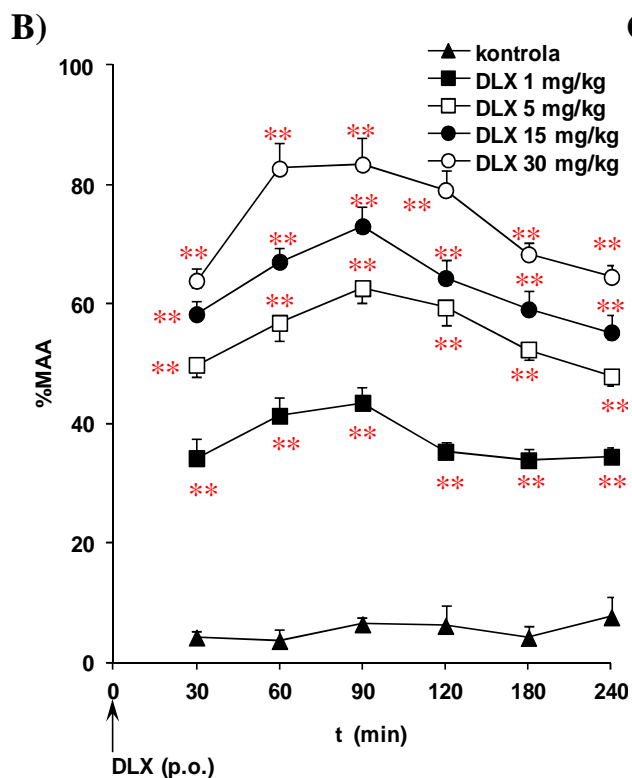
0,15 (0,56 – 5,39) mg/kg (Tabela 15). Alfa-lipoiniska kiselina ostvaruje maksimalno antinociceptivno dejstvo na 60-180 min merenja, nakon 7-dnevne p.o. primene, uz %MAA od 41,70% (12,5 mg/kg/dan; p.o.), 48,94% (25 mg/kg/dan; p.o.), 55,23% (50 mg/kg/dan; p.o.) i 77,32% (100 mg/kg/dan; p.o.) (Slika 45C). Kriva odnosa log doze i maksimalnog antinociceptivnog efekta alfa-lipoiniske pokazuje visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,95$ ) (Slika 55A). Srednja efektivna doza (95%-ni interval poverenja) alfa-lipoiniske kiseline u dijabetesnoj neuropatiji iznosi  $24,79 \pm 4,90$  (10,57 – 58,14) mg/kg (Tabela 16). Dužina trajanja dejstva ibuprofena, paracetamola, gabapentina, duloksetina i alfa-lipoiniske kiseline zavisna je od doze, jer krive koje prikazuju odnos antinociceptivnog dejstva (%MAA) i površine ispod krive (PIK) imaju visoke koeficijente linearne korelacije ( $r = 0,997$ ;  $0,977$ ;  $0,998$ ;  $0,998$  i  $0,988$ , redom; nije prikazano) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 44.** Vremenski tok antinociceptivnog dejstva ibuprofena (IBU) (A) i paracetamola (PAR) (B) nakon peroralne primene (p.o.) (obeleženo strelicama) u dijabetičnih miševa, izraženog kao procenat od maksimalne antinociceptivne aktivnosti (%MAA). Antinociceptivno dejstvo mereno je u testu izmicanja repa pod uticajem toplote. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu miševa.

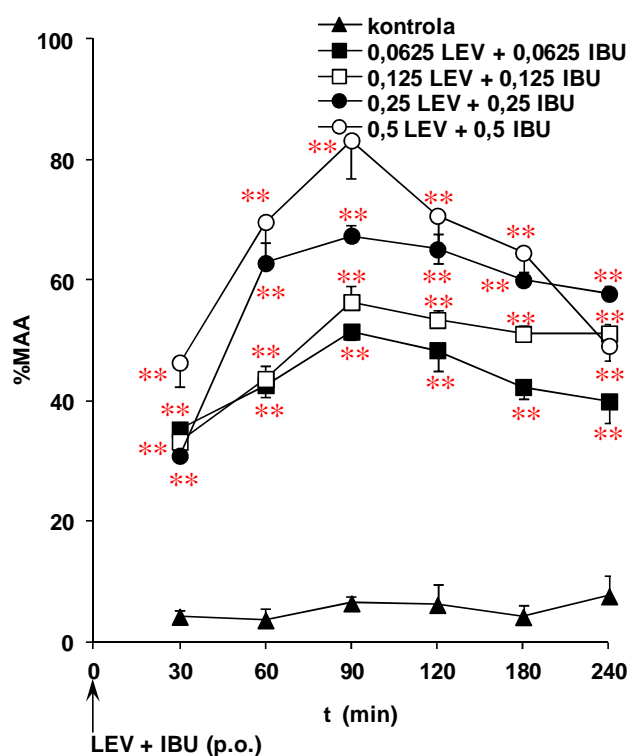


*Slika 45. Vremenski tok antinociceptivnog dejstva gabapentina (GBP) (A), duloksetina (DLX) (B) i alfa-lipoinse kiseline (ALA) (C) nakon peroralne primene (p.o.) (obeleženo strelicama) u dijabetičnih miševa, izraženog kao procenat od maksimalne antinociceptivne aktivnosti (%MAA). Antinociceptivno dejstvo mereno je u testu izmicanja repa pod uticajem toplote. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu miševa.*



### 3.3.3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i ibuprofena

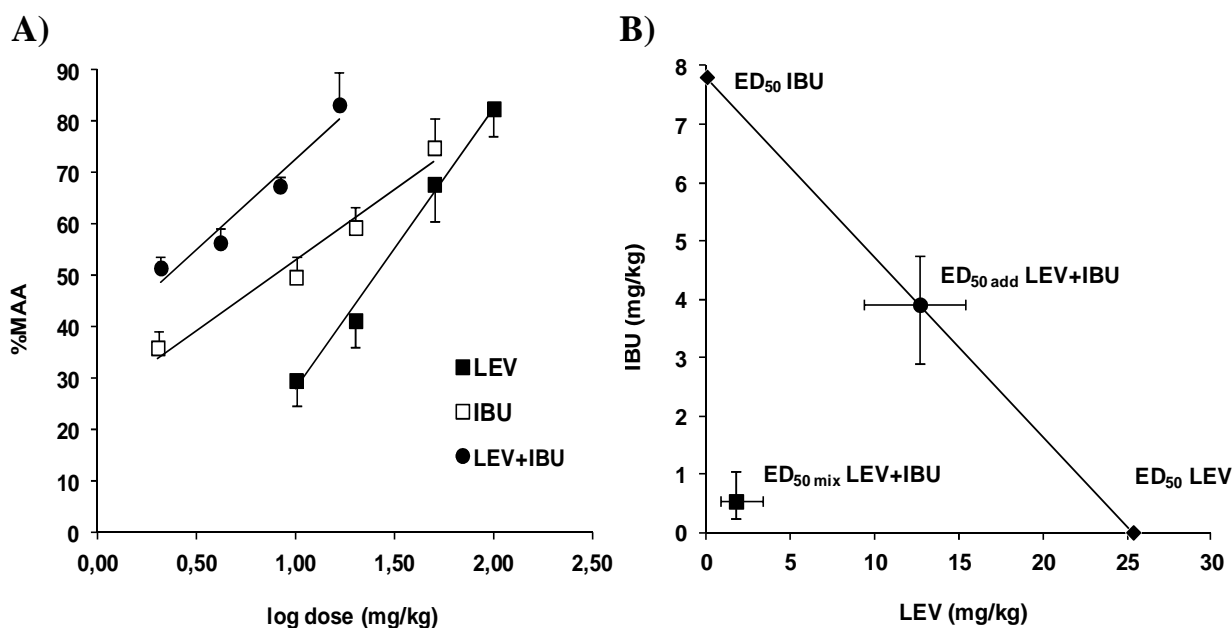
U testu izmicanja repa pod uticajem toplote kod dijabetičnih miševa, levetiracetam i ibuprofen, primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  vrednosti (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2), ostvarili su statistički značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja koja je dobila rastvarač (p.o.) umesto ispitivanih lekova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 46). Maksimumi antinociceptivnog dejstva (%MAA) svih ispitivanih kombinacija doza, postižu se 90 min nakon p.o. primene levetiracetama i ibuprofena uz %MAA od 51,51% (1/16 + 1/16  $ED_{50}$ ; p.o.), 56,41% (1/8 + 1/8  $ED_{50}$ ; p.o.), 67,43% (1/4 + 1/4  $ED_{50}$ ; p.o.) i 83,26% (1/2 + 1/2  $ED_{50}$ ; p.o.) (Slika 46). Kriva odnosa log doza kombinacije levetiracetama i ibuprofena i %MAA u trenutku postizanja maksimalnih efekata ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,975$ ) (Slika 47A).



**Slika 46.** Vremenski tok antinociceptivnog dejstva levetiracetam-ibuprofen (LEV+IBU) kombinacije nakon peroralne primene (p.o.) (obeleženo strelicama) u dijabetičnih miševa, izraženog kao procenat od maksimalne antinociceptivne aktivnosti (%MAA). Antinociceptivno dejstvo mereno je u testu izmicanja repa pod uticajem toplote. LEV i IBU su primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  (1/16=0,0625; 1/8=0,125; 1/4=0,25 i 1/2=0,5). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu miševa.

Tip interakcije između levetiracetama i ibuprofena u dijabetičnoj neuropatiji u miševa određivan je izoblografskom analizom (postupak opisan u poglavlju 3.1.2. Rezultata).  $ED_{50}$  mix kombinacije levetiracetam-ibuprofen značajno je manja od  $ED_{50}$  add ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test) (Tabela 12), što ukazuje da levetiracetam i ibuprofen ostvaruju sinergističku interakciju (Tallarida i sar.,

1997). Na sinergističku interakciju ukazuje i podatak da se 95%-ni intervali poverenja  $ED_{50\text{ mix}}_{LEV+IBU}$  i  $ED_{50\text{ add}}_{LEV+IBU}$  ne preklapaju, prikazano na izobologramu (Slika 47B). Niska vrednost indeksa interakcije ( $\gamma < 1$ ), takođe ide u prilog sinergističkoj interakciji između levetiracetama i ibuprofena u dijabetesnoj neuropatiji u miševa (Tabela 12). Dužina trajanja dejstva pojedinačnih lekova i kombinacije, upoređivana je posredstvom nagiba krivih odnosa maksimalnog antinociceptivnog dejstva (%MAA) i površina ispod krivih (PIK), koji je merilo dužine trajanja dejstva leka/kombinacije lekova. Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika između nagiba krivih za levetiracetam ( $8,93 \pm 0,64$ ) i ibuprofen ( $11,18 \pm 0,66$ ) u odnosu na levetiracetam-ibuprofen kombinaciju ( $11,09 \pm 1,32$ ), što ukazuje na približno istu dužinu trajanja dejstva svih ispitivanih tretmana ( $p > 0,05$ ; test paralelizma). Visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,986$ ) krive odnosa %MAA i PIK (nije prikazano), ukazuje da je dužina trajanja dejstva kombinacije levetiracetam-ibuprofen dozno-zavisna (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 47. A)** Regresione krive odnosa log doze i antinociceptivnog dejstva (%MAA) u trenutku postizanja maksimalnog efekta levetiracetama (LEV), ibuprofena (IBU) i levetiracetam-ibuprofen (LEV+IBU) kombinacije u dijabetesnoj neuropatiji u miševa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 životinja. **B)** Izobologram za LEV+IBU kombinaciju u dijabetesnoj neuropatiji u miševa.  $ED_{50}$  vrednosti pojedinačnih lekova obeležene su na osama. Linija koja povezuje pojedinačne  $ED_{50}$  lekova je teorijska linija aditivnosti, a tačka na njoj je  $ED_{50\text{ add}}$  (teorijska aditivna  $ED_{50}$ ). Između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  (eksperimentalna  $ED_{50}$  za kombinaciju lekova), postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ; t-test), što ukazuje na sinergističku interakciju između levetiracetama i ibuprofena.



**Tabela 12.**  $ED_{50} \pm SEM$  vrednosti (mg/kg) sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) izmereni u trenutku maksimalnog antinociceptivnog efekta nakon p.o. primene levetiracetama, ibuprofena i njihove kombinacije u dijabetesnoj neuropatiji u miševa

Lek/kombinacija lekova	$ED_{50}^a \pm SEM$ (95%-ni intervali poverenja)			
levetiracetam	25,33 $\pm$ 1,52 (19,28 – 34,50)			
ibuprofen	7,82 $\pm$ 1,27 (3,89 – 15,72)			
	maseni odnos doza	$ED_{50\text{ add}}$	$ED_{50\text{ mix}}^d$	$\gamma^b$
levetiracetam+ibuprofen	3,24:1	16,57 $\pm$ 0,99 (12,26 – 20,08)	2,25 $\pm$ 0,45* (1,07 – 4,39)	0,14

<sup>a</sup>  $ED_{50}$  = doza leka koja ostvaruje 50% antinociceptivnog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = ED_{50\text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA IBUPROFENOM}} / ED_{50\text{ LEVETIRACETAM}} + ED_{50\text{ IBUPROFEN U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM}} / ED_{50\text{ IBUPROFEN}}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

<sup>c</sup>  $ED_{50\text{ add}}$  = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

<sup>d</sup>  $ED_{50\text{ mix}}$  = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

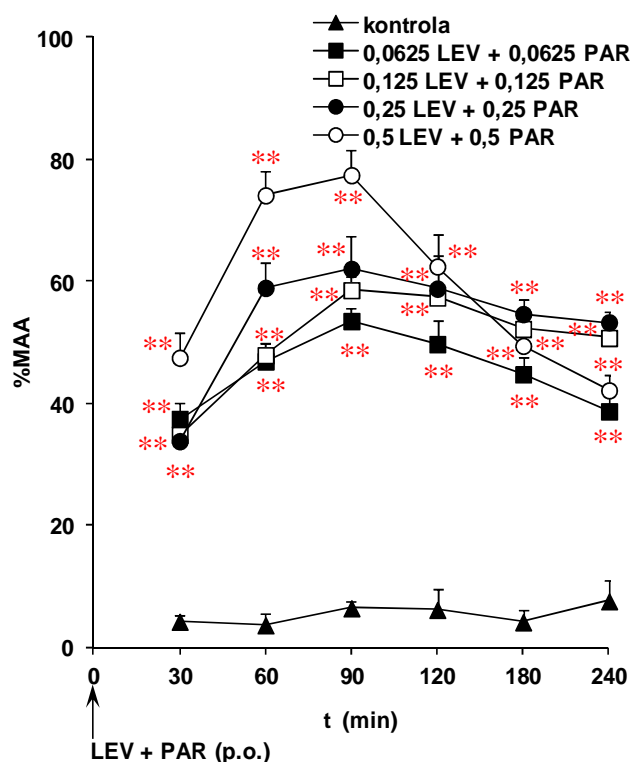
\*  $p < 0,05$  između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  ( $t$ -test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).

### 3.3.4. Efekti kombinovane primene levetiracetama i paracetamola

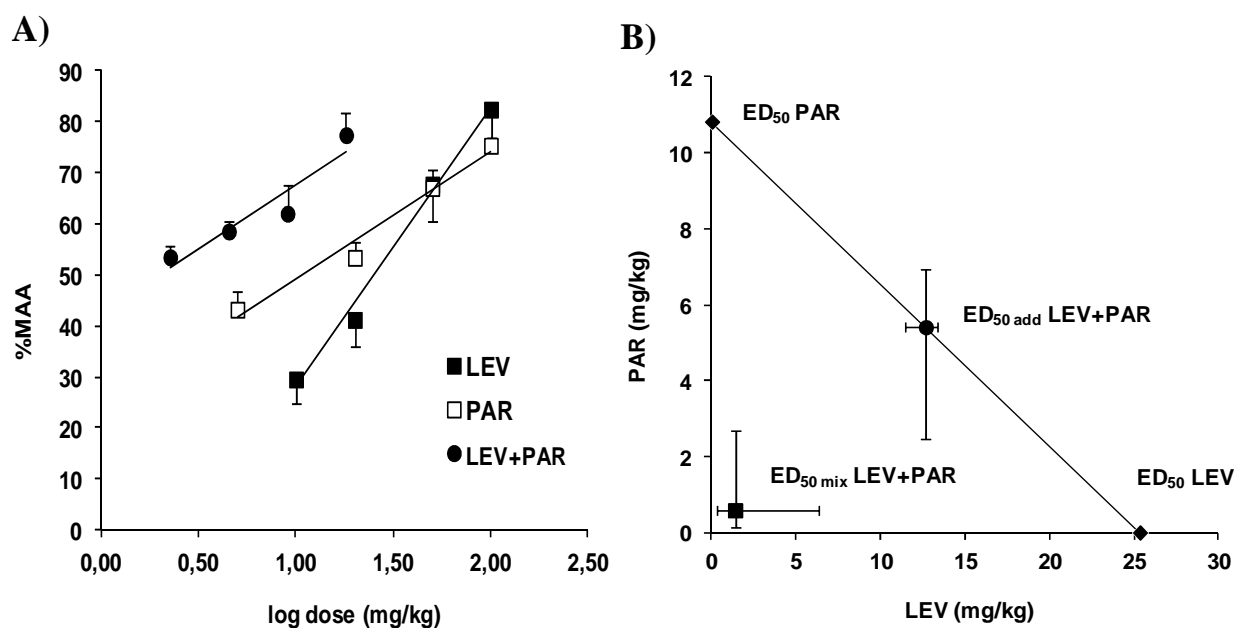
Levetiracetam i paracetamol primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  vrednosti (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2) ostvarili su statistički značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u testu izmicanja repa pod uticajem toplote kod dijabetičnih miševa ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 48). Maksimalno antinociceptivno dejstvo (%MAA) kombinacije levetiracetam-paracetamol postiže se 90 min nakon p.o. primene levetiracetama i paracetamola uz odgovarajuće %MAA od 53,51% (1/16 + 1/16  $ED_{50}$ ; p.o.), 58,58% (1/8 + 1/8  $ED_{50}$ ; p.o.), 62,06% (1/4 + 1/4  $ED_{50}$ ; p.o.) i 77,46% (1/2 + 1/2  $ED_{50}$ ; p.o.) (Slika 48). Kriva odnosa log doza levetiracetam-paracetamol kombinacije i %MAA u trenutku postizanja maksimalnih efekata ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,942$ ) (Slika 49A).

Izoblografska analiza levetiracetam-paracetamol kombinacije u dijabetesnoj neuropatiji u miševa izvedena je na prethodno opisan način (videti Rezultate, poglavlje 3.1.2.).  $ED_{50\text{ mix}}$  ispitivane kombinacije značajno je manja od  $ED_{50\text{ add}}$  ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test) (Tabela 13), što ukazuje da levetiracetam i paracetamol ostvaruju sinergističku interakciju u ovom modelu bola (Tallarida i sar., 1997). Na sinergističku interakciju ukazuje i podatak da se 95%-ni intervali poverenja  $ED_{50\text{ mix LEV+PAR}}$  i  $ED_{50\text{ add LEV+PAR}}$  ne preklapaju (Slika 49B). Niska vrednost indeksa interakcije

( $\gamma < 1$ ), takođe ide u prilog sinergističkoj interakciji između levetiracetama i paracetamola (Tabela 13). Dužine trajanja dejstva levetiracetama, paracetamola i levetiracetam-paracetamol kombinacije upoređivane su posredstvom nagiba krivih odnosa maksimalnog antinociceptivnog efekta (%MAA) i površina ispod krivih (PIK), koji je merilo dužine trajanja dejstva lekova/kombinacija lekova. Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u nagibima krivih za levetiracetam ( $8,93 \pm 0,64$ ) i paracetamol ( $11,60 \pm 1,79$ ) u odnosu na levetiracetam-paracetamol ( $5,74 \pm 2,26$ ) kombinaciju, na bazi čega se može zaključiti da ne postoji značajna razlika u dužini trajanja dejstva levetiracetama, paracetamola i njihove kombinacije ( $p > 0,05$ ; test paralelizma) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a). Vrednost koeficijenta linearne korelacije ( $r = 0,874$ ) krive odnosa %MAA i PIK (nije prikazano), ukazuje da je dužina trajanja dejstva kombinacije levetiracetam-paracetamol u velikoj meri zavisna od doze (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 48.** Vremenski tok antinociceptivnog dejstva levetiracetam-paracetamol (LEV+PAR) kombinacije nakon peroralne primene (p.o.) (obeleženo strelicama) u dijabetičnih miševa, izraženog kao procenat od maksimalne antinociceptivne aktivnosti (%MAA). Antinociceptivno dejstvo mereno je u testu izmicanja repa pod uticajem toplote. LEV i PAR su primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  ( $1/16=0,0625$ ;  $1/8=0,125$ ;  $1/4=0,25$  i  $1/2=0,5$ ). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu miševa.



**Slika 49. A)** Regresione krive odnosa log doze i antinociceptivnog dejstva (%MAA) u trenutku postizanja maksimalnog efekta levetiracetama (LEV), paracetamola (PAR) i levetiracetam-paracetamol (LEV+PAR) kombinacije u dijabetesnoj neuropatiji u miševa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 životinja. **B)** Izobologram za LEV+PAR kombinaciju u dijabetesnoj neuropatiji u miševa. ED<sub>50</sub> vrednosti pojedinačnih lekova obeležene su na osama. Linija koja povezuje pojedinačne ED<sub>50</sub> lekova je teorijska linija aditivnosti, a tačka na njoj je ED<sub>50 add</sub> (teorijska aditivna ED<sub>50</sub>). Između ED<sub>50 add</sub> i ED<sub>50 mix</sub> (eksperimentalna ED<sub>50</sub> za kombinaciju lekova), postoji statistički značajna razlika (p < 0,05; t-test), što ukazuje na sinergističku interakciju između levetiracetama i paracetamola.

**Tabela 13. ED<sub>50</sub>  $\pm$  SEM vrednosti (mg/kg) sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) izmereni u trenutku maksimalnog antinociceptivnog efekta nakon p.o. primene levetiracetama, paracetamola i njihove kombinacije u dijabetesnoj neuropatiji u miševa**

Lek/kombinacija lekova	ED <sub>50</sub> <sup>a</sup> $\pm$ SEM (95%-ni intervali poverenja)			
levetiracetam	25,33 $\pm$ 1,52 (19,28 – 34,50)			
paracetamol	10,83 $\pm$ 1,74 (5,41 – 21,68)			
	maseni odnos doza	ED <sub>50 add</sub>	ED <sub>50 mix</sub> <sup>d</sup>	$\gamma$ <sup>b</sup>
levetiracetam+paracetamol	2,34:1	18,07 $\pm$ 1,16 (13,86 – 20,27)	1,95 $\pm$ 0,69* (0,42 – 9,08)	0,11

<sup>a</sup> ED<sub>50</sub> = doza leka koja ostvaruje 50% antinociceptivnog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = \text{ED}_{50} \text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA PARACETAMOLOM} / \text{ED}_{50} \text{ LEVETIRACETAM} + \text{ED}_{50} \text{ PARACETAMOL U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM} / \text{ED}_{50} \text{ PARACETAMOL}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

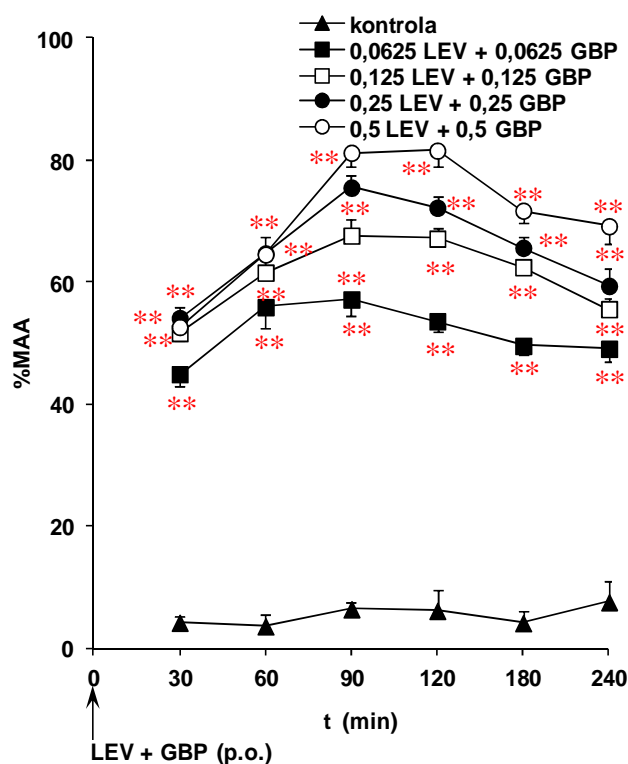
<sup>c</sup> ED<sub>50 add</sub> = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

<sup>d</sup> ED<sub>50 mix</sub> = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

\* p < 0,05 između ED<sub>50 add</sub> i ED<sub>50 mix</sub> (t-test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).

### 3.3.5. Efekti kombinovane primene levetiracetama i gabapentina

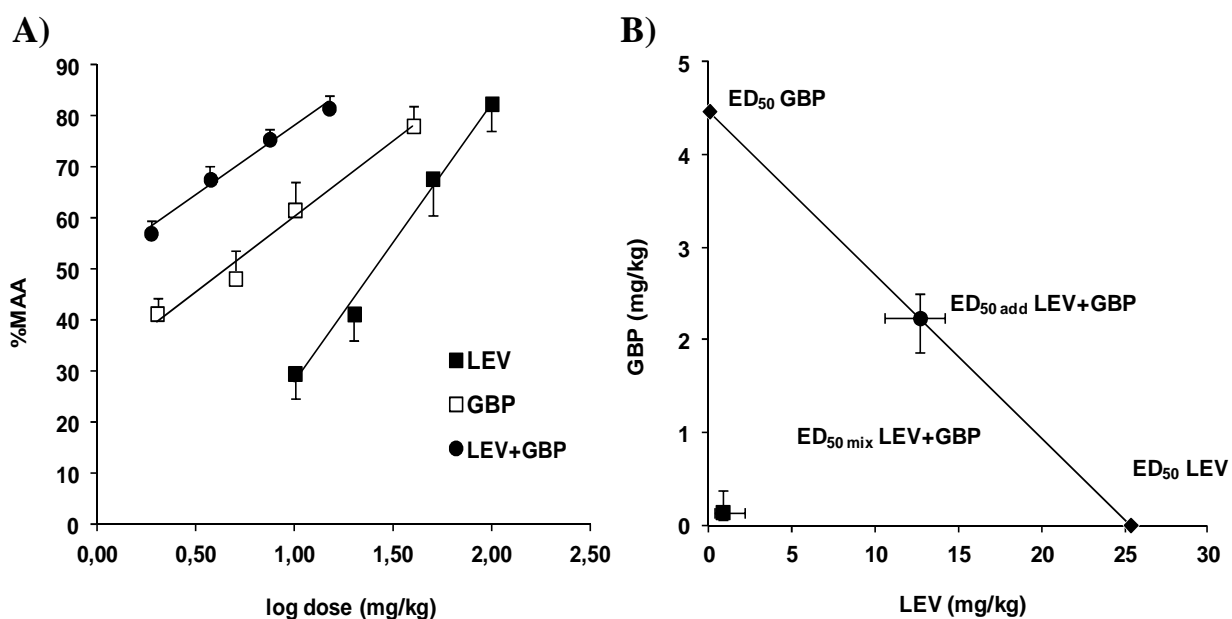
U testu izmicanja repa pod uticajem toplote kod dijabetičnih miševa, kombinacija levetiracetama i gabapentina (primenjeni zajedno u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$ : 1/16, 1/8, 1/4 i 1/2) ostvarila je značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u poređenju sa kontrolnom grupom koja je dobila rastvarač (p.o.) umesto ispitivanih lekova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 50). Maksimumi antinociceptivnog dejstva (%MAA) kombinacije levetiracetam-gabapentin postignuti su 90-120 min nakon p.o. primene levetiracetama i gabapentina. Odgovarajući %MAA iznose 57,18% (1/16 + 1/16  $ED_{50}$ ; p.o.), 67,66% (1/8 + 1/8  $ED_{50}$ ; p.o.), 75,52% (1/4 + 1/4  $ED_{50}$ ; p.o.) i 81,60% (1/2 + 1/2  $ED_{50}$ ; p.o.) (Slika 50). Kriva odnosa log doza levetiracetam-gabapentin kombinacije i %MAA u trenutku maksimalnih efekata ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,992$ ) (Slika 51A).



**Slika 50.** Vremenski tok antinociceptivnog dejstva levetiracetam-gabapentin (LEV+GBP) kombinacije nakon peroralne primene (p.o.) (obeleženo strelicama) u dijabetičnih miševa, izraženog kao procenat od maksimalne antinociceptivne aktivnosti (%MAA). Antinociceptivno dejstvo mereno je u testu izmicanja repa pod uticajem toplote. LEV i GBP su primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  (1/16=0,0625; 1/8=0,125; 1/4=0,25 i 1/2=0,5). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu miševa.

Izoblografaska analiza kombinacije levetiracetama i gabapentina u dijabetesnoj neuropatiji u miševa izvedena je na prethodno opisan način (videti Rezultate, poglavlje 3.1.2.).  $ED_{50 \text{ mix}}$  i  $ED_{50 \text{ add}}$  za kombinaciju levetiracetam-gabapentin se statistički značajno razlikuju, tj.

$ED_{50\text{ mix}}$  je značajno manja od  $ED_{50\text{ add}}$  ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test) (Tabela 14), što ukazuje da levetiracetam i gabapentin ostvaruju sinergističku interakciju (Tallarida i sar., 1997). Sinergistička interakcija je potvrđena time što se 95%-ni intervali poverenja  $ED_{50\text{ mix LEV+GBP}}$  i  $ED_{50\text{ add LEV+GBP}}$  ne preklapaju (Slika 51B). Dodatno, niska vrednost indeksa interakcije ( $\gamma < 1$ ), takođe ide u prilog sinergističkoj interakciji između levetiracetama i gabapentina (Tabela 14). Dužine trajanja dejstva levetiracetama, gabapentina i njihove kombinacije su približno iste, jer ne postoji statistički značajna razlika između nagiba krivih %MAA-PIK za levetiracetam ( $8,93 \pm 0,64$ ), gabapentin ( $12,56 \pm 0,63$ ) i levetiracetam-gabapentin ( $11,09 \pm 1,32$ ) kombinaciju ( $p > 0,05$ ; test paralelizma) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a). Dužina trajanja dejstva ispitivane kombinacije zavisi od primenjene doze, s obzirom da kriva odnosa %MAA-PIK ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,986$ ; nije prikazano) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 51. A)** Regresione krive odnosa log doze i antinociceptivnog dejstva (%MAA) u trenutku postizanja maksimalnog efekta levetiracetama (LEV), gabapentina (GBP) i levetiracetam-gabapentin (LEV+GBP) kombinacije u dijabetesnoj neuropatiji u miševa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 životinja. **B)** Izobologram za LEV+GBP kombinaciju u dijabetesnoj neuropatiji u miševa.  $ED_{50}$  vrednosti pojedinačnih lekova obeležene su na osama. Linija koja povezuje pojedinačne  $ED_{50}$  lekova je teorijska linija aditivnosti, a tačka na njoj je  $ED_{50\text{ add}}$  (teorijska aditivna  $ED_{50}$ ). Između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  (eksperimentalna  $ED_{50}$  za kombinaciju lekova), postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test), što ukazuje na sinergističku interakciju između levetiracetama i gabapentina.

**Tabela 14.**  $ED_{50} \pm SEM$  vrednosti (mg/kg) sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) izmereni u trenutku maksimalnog antinociceptivnog efekta nakon p.o. primene levetiracetama, gabapentina i njihove kombinacije u dijabetesnoj neuropatiji u miševa

Lek/kombinacija lekova	$ED_{50}^a \pm SEM$ (95%-ni intervali poverenja)			
levetiracetam	25,33 $\pm$ 1,52 (19,28 – 34,50)			
gabapentin	4,47 $\pm$ 0,54 (2,66 – 7,52)			
	maseni odnos doza	$ED_{50 \text{ add}}$	$ED_{50 \text{ mix}}^d$	$\gamma^b$
levetiracetam+gabapentin	5,67:1	14,91 $\pm$ 0,81 (12,42 – 16,64)	0,92 $\pm$ 0,15* (0,29 – 2,50)	0,06

<sup>a</sup>  $ED_{50}$  = doza leka koja ostvaruje 50% antinociceptivnog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = ED_{50 \text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA GABAPENTINOM}} / ED_{50 \text{ LEVETIRACETAM}} + ED_{50 \text{ GABAPENTIN U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM}} / ED_{50 \text{ GABAPENTIN}}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

<sup>c</sup>  $ED_{50 \text{ add}}$  = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

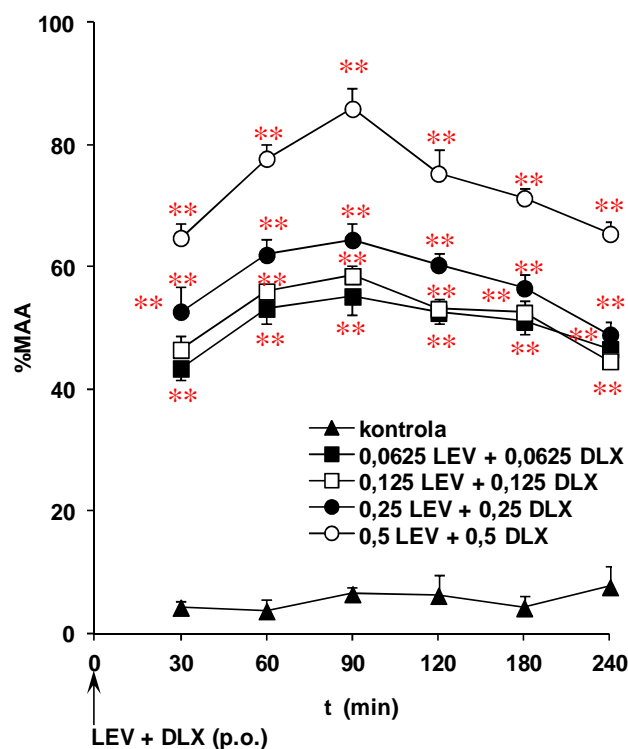
<sup>d</sup>  $ED_{50 \text{ mix}}$  = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

\*  $p < 0,05$  između  $ED_{50 \text{ add}}$  i  $ED_{50 \text{ mix}}$  ( $t$ -test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).

### 3.3.6. Efekti kombinovane primene levetiracetama i duloksetina

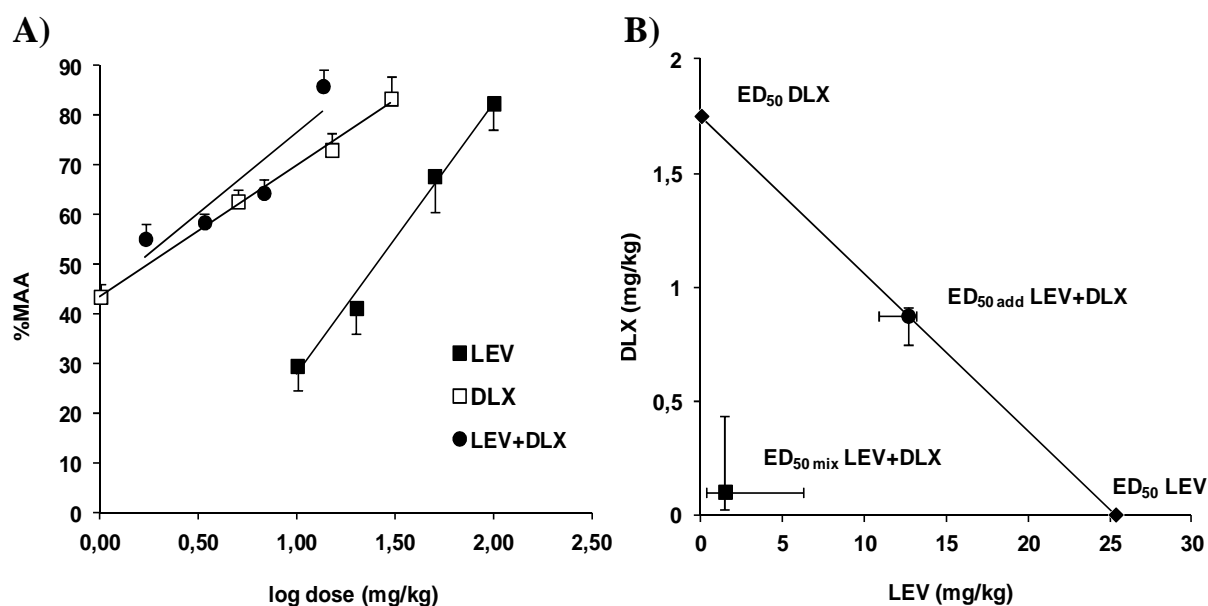
U testu izmicanja repa pod uticajem toplote kod dijabetičnih miševa, levetiracetam i duloksetin, primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  vrednosti (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2), ostvarili su statistički značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja koja je dobila rastvarač (p.o.) umesto ispitivanih lekova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 52). Maksimumi antinociceptivnog dejstva (%MAA) svih ispitivanih kombinacija doza, postižu se 90 min nakon p.o. primene levetiracetama i duloksetina uz %MAA od 55,19% (1/16 + 1/16  $ED_{50}$ ; p.o.), 58,51% (1/8 + 1/8  $ED_{50}$ ; p.o.), 64,44% (1/4 + 1/4  $ED_{50}$ ; p.o.) i 85,94% (1/2 + 1/2  $ED_{50}$ ; p.o.) (Slika 52). Kriva odnosa log doza kombinacije levetiracetama i duloksetina i %MAA u trenutku postizanja maksimalnih efekata ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,917$ ) (Slika 53A).

Tip interakcije između levetiracetama i duloksetina u dijabetesnoj neuropatiji u miševa određivan je izoblografskom analizom (postupak opisan u poglavlju 3.1.2. Rezultata).  $ED_{50 \text{ mix}}$  kombinacije levetiracetam-duloksetin značajno je manja od  $ED_{50 \text{ add}}$  ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test) (Tabela 15), što ukazuje da levetiracetam i duloksetin ostvaruju sinergističku interakciju (Tallarida i sar., 1997).



**Slika 52.** Vremenski tok antinociceptivnog dejstva levetiracetam-duloksetin (**LEV+DLX**) kombinacije nakon peroralne primene (*p.o.*) (obeleženo strelicama) u dijabetičnih miševa, izraženog kao procenat od maksimalne antinociceptivne aktivnosti (%**MAA**). Antinociceptivno dejstvo mereno je u testu izmicanja repa pod uticajem toplote. LEV i DLX su primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  ( $1/16=0,0625$ ;  $1/8=0,125$ ;  $1/4=0,25$  i  $1/2=0,5$ ). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu miševa.

Na sinergističku interakciju ukazuje i podatak da se 95%-ni intervali poverenja  $ED_{50 \text{ mix LEV+DLX}}$  i  $ED_{50 \text{ add LEV+DLX}}$  ne preklapaju, prikazano na izobologramu (Slika 53B), kao i niska vrednost indeksa interakcije ( $\gamma < 1$ ) (Tabela 15). Dužina trajanja dejstva pojedinačnih lekova i kombinacije, upoređivana je posredstvom nagiba krivih odnosa maksimalnog antinociceptivnog dejstva (%MAA) i površina ispod krivih (PIK), koji je merilo dužine trajanja dejstva lekova. Pokazano je da postoji statistički značajna razlika između nagiba krivih za duloksetin ( $11,29 \pm 0,50$ ) i levetiracetam-duloksetin ( $7,95 \pm 0,83$ ) kombinaciju ( $p < 0,05$ ; test paralelizma), ali ne i između nagiba krivih za duloksetin i levetiracetam ( $8,93 \pm 0,64$ ) ( $p > 0,05$ ; test paralelizma). Takođe, nije zabeležena značajna razlika između nagiba krivih za levetiracetam i levetiracetam-duloksetin kombinaciju ( $p > 0,05$ ; test paralelizma). Može se zaključiti da dejstvo duloksetina primenjenog *per se* traje duže od dejstva levetiracetam-duloksetin kombinacije (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a). Visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,989$ ) krive odnosa %MAA i PIK (nije prikazano), ukazuje da je dužina trajanja dejstva kombinacije levetiracetam-duloksetin zavisna od primenjene doze (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 53. A)** Regresione krive odnosa log doze i antinociceptivnog dejstva (%MAA) u trenutku postizanja maksimalnog efekta levetiracetama (LEV), duloksetina (DLX) i levetiracetam-duloksetin (LEV+DLX) kombinacije u dijabetesnoj neuropatiji u miševa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 životinja. **B)** Izobologram za LEV+DLX kombinaciju u dijabetesnoj neuropatiji u miševa.  $ED_{50}$  vrednosti pojedinačnih lekova obeležene su na osama. Linija koja povezuje pojedinačne  $ED_{50}$  lekova je teorijska linija aditivnosti, a tačka na njoj je  $ED_{50\text{ add}}$  (teorijska aditivna  $ED_{50}$ ). Između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  (eksperimentalna  $ED_{50}$  za kombinaciju lekova), postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test), što ukazuje na sinergističku interakciju između levetiracetama i duloksetina.

**Tabela 15.**  $ED_{50} \pm SEM$  vrednosti (mg/kg) sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) izmereni u trenutku maksimalnog antinociceptivnog efekta nakon p.o. primene levetiracetama, duloksetina i njihove kombinacije u dijabetesnoj neuropatiji u miševa

Lek/kombinacija lekova	$ED_{50}^a \pm SEM$ (95%-ni intervali poverenja)			
levetiracetam	25,33 $\pm$ 1,52 (19,28 – 34,50)			
duloksetin	1,75 $\pm$ 0,15 (0,56 – 5,39)			
	maseni odnos doza	$ED_{50\text{ add}}$	$ED_{50\text{ mix}}^d$	$\gamma^b$
levetiracetam+duloksetin	14,47:1	13,51 $\pm$ 0,76 (11,53 – 14,06)	1,55 $\pm$ 0,65* (0,28 – 6,61)	0,11

<sup>a</sup>  $ED_{50}$  = doza leka koja ostvaruje 50% antinociceptivnog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = ED_{50\text{ LEVETIRACETAM}} / ED_{50\text{ DULOKSETIN}} + ED_{50\text{ DULOKSETIN}} / ED_{50\text{ LEVETIRACETAM + DULOKSETIN}}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

<sup>c</sup>  $ED_{50\text{ add}}$  = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

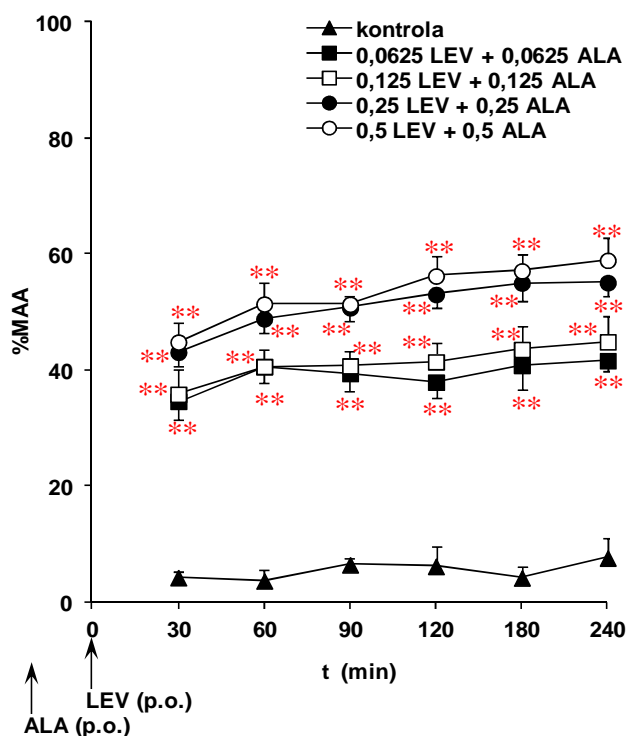
<sup>d</sup>  $ED_{50\text{ mix}}$  = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

\*  $p < 0,05$  između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  ( $t$ -test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).



### 3.3.7. Efekti kombinovane primene levetiracetama i alfa-lipoiinske kiseline

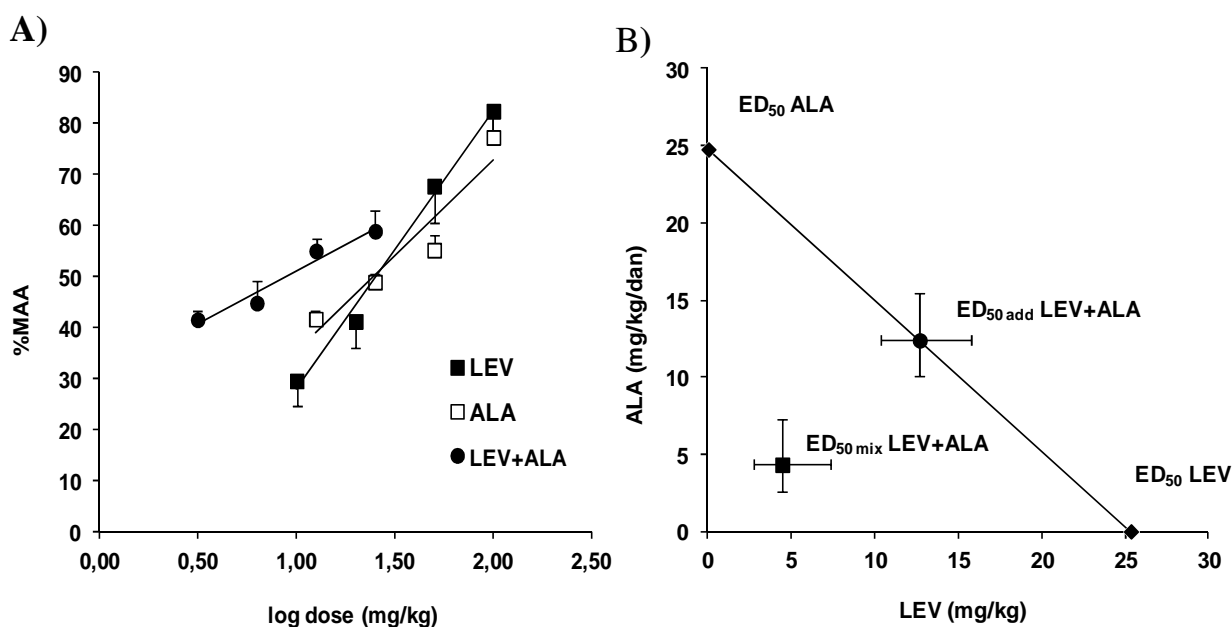
U testu izmicanja repa pod uticajem toplote kod dijabetičnih miševa, levetiracetam i alfa-lipoiinska kiselina (7-dnevna primena), primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  vrednosti (1/16, 1/8, 1/4 i 1/2), ostvarili su statistički značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja koja je dobila rastvarač (p.o.) umesto ispitivanih lekova ( $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA) (Slika 54). Maksimumi antinociceptivnog dejstva (%MAA) kombinacije levetiracetama i alfa-lipoiinske kiseline postignuti na 240. min merenja iznose 41,59% (1/16 + 1/16  $ED_{50}$ ; p.o.), 44,85% (1/8 + 1/8  $ED_{50}$ ; p.o.), 55,08% (1/4 + 1/4  $ED_{50}$ ; p.o.) i 58,93% (1/2 + 1/2  $ED_{50}$ ; p.o.) (Slika 54). Kriva odnosa log doza kombinacije levetiracetama i alfa-lipoiinske kiseline i %MAA u trenutku maksimalnih efekata ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,978$ ) (Slika 55A).



**Slika 54.** Vremenski tok antinociceptivnog dejstva kombinacije levetiracetama i alfa-lipoiinske kiseline (LEV+ALA) nakon peroralne (p.o.) primene LEV i ALA (7-dnevni tretman) (obeleženo strelicama) u dijabetičnih miševa, izraženog kao procenat od maksimalne antinociceptivne aktivnosti (%MAA). Antinociceptivno dejstvo mereno je u testu izmicanja repa pod uticajem toplote. LEV i ALA su primenjeni u fiksnim frakcijama pojedinačnih  $ED_{50}$  (1/16=0,0625; 1/8=0,125; 1/4=0,25 i 1/2=0,5). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 miševa. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; jednofaktorska ANOVA, Tukey HSD test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu miševa.

Izoblografskom analizom (detaljan postupak opisan u poglavlju 3.1.2. Rezultata) procenjeno je da levetiracetam i alfa-lipoiinska kiselina ostvaruju sinergističku interakciju u dijabetesnoj neuropatiji u miševa, jer je vrednost  $ED_{50 \text{ mix}}$  kombinacije značajno manja od  $ED_{50}$

$ED_{50\text{ add}}$  ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test) (Tallarida i sar., 1997), a indeks interakcije ( $\gamma$ ) manji od 1 (Tabela 16). Na izobologramu se može videti da se 95%-ni intervali poverenja  $ED_{50\text{ mix LEV+ALA}}$  i  $ED_{50\text{ add LEV+ALA}}$  ne preklapaju (Slika 55B), što je grafički pokazatelj sinergizma između levetiracetama i alfa-liponske kiseline. Dužine trajanja dejstva levetiracetama, alfa-liponske kiseline i njihove kombinacije su približno iste, jer ne postoji statistički značajna razlika između nagiba krivih %MAA-PIK za levetiracetam ( $8,93 \pm 0,64$ ), alfa-liponsku kiselinu ( $8,93 \pm 0,97$ ) i kombinaciju levetiracetama i alfa-liponske kiseline ( $9,57 \pm 1,14$ ) ( $p > 0,05$ ; test paralelizma) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a). Dužina trajanja dejstva ispitivane kombinacije zavisi od primenjene doze, s obzirom da kriva odnosa %MAA-PIK kombinacije ima visok koeficijent linearne korelacije ( $r = 0,986$ ; nije prikazano) (Yaksh i sar., 1986; Tomić i sar., 2010a).



**Slika 55. A)** Regresione krive odnosa log doze i antinociceptivnog dejstva (%MAA) u trenutku postizanja maksimalnog efekta levetiracetama (LEV), alfa-liponske kiseline (ALA) i kombinacije levetiracetama i alfa-liponske kiseline (LEV+ALA) u dijabetesnoj neuropatiji u miševa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM dobijenu testiranjem 6-10 životinja. **B)** Izobologram za LEV+ALA kombinaciju u dijabetesnoj neuropatiji u miševa.  $ED_{50}$  vrednosti pojedinačnih lekova obeležene su na osama. Linija koja povezuje pojedinačne  $ED_{50}$  lekova je teorijska linija aditivnosti, a tačka na njoj je  $ED_{50\text{ add}}$  (teorijska aditivna  $ED_{50}$ ). Između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  (eksperimentalna  $ED_{50}$  za kombinaciju lekova), postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ;  $t$ -test), što ukazuje na sinergističku interakciju između levetiracetama i alfa-liponske kiseline.

**Tabela 16.**  $ED_{50} \pm SEM$  vrednosti sa 95%-nim intervalima poverenja i indeks interakcije ( $\gamma$ ) izmereni u trenutku maksimalnog antinociceptivnog efekta nakon p.o. primene levetiracetama (mg/kg), alfa-lipoiinske kiseline (mg/kg/dan) i njihove kombinacije u dijabetesnoj neuropatiji u miševa

Lek/kombinacija lekova	$ED_{50}^a \pm SEM$ (95%-ni intervali poverenja)			
levetiracetam	$25,33 \pm 1,52$ (19,28 – 34,50)			
alfa-lipoiinska kiselina	$24,79 \pm 4,90$ (10,57 – 58,14)			
	maseni odnos doza	$ED_{50\text{ add}}$	$ED_{50\text{ mix}}^d$	$\gamma^b$
levetiracetam+ alfa-lipoiinska kiselina	1,02:1	$25,70 \pm 2,08$ (20,12 – 30,81)	$8,75 \pm 1,03^*$ (5,26 – 14,55)	0,35

<sup>a</sup>  $ED_{50}$  = doza leka koja ostvaruje 50% antinociceptivnog efekta

<sup>b</sup>  $\gamma = ED_{50\text{ LEVETIRACETAM U KOMBINACIJI SA ALFA-LIPOINSKOM KISELINOM}} / ED_{50\text{ LEVETIRACETAM}} + ED_{50\text{ ALFA-LIPOINSKA KISELINA U KOMBINACIJI SA LEVETIRACETAMOM}} / ED_{50\text{ ALFA-LIPOINSKA KISELINA}}$ . Vrednosti blizu 1 ukazuju na aditivnu interakciju, vrednosti veće od 1 ukazuju na antagonističku interakciju, a vrednosti manje od 1 na sinergističku (supra-aditivnu) interakciju (Tallarida, 2002)

<sup>c</sup>  $ED_{50\text{ add}}$  = teorijska (aditivna) efektivna doza kombinacije lekova

<sup>d</sup>  $ED_{50\text{ mix}}$  = eksperimentalno dobijena srednja efektivna doza kombinacije

\*  $p < 0,05$  između  $ED_{50\text{ add}}$  i  $ED_{50\text{ mix}}$  ( $t$ -test), postoji sinergistička interakcija (Tallarida i sar., 1997).

### 3.3.8. Rangiranje kombinacija levetiracetama sa ibuprofenom, paracetamolom, gabapentinom, duloksetinom i alfa-lipoiinskom kiselinom prema stepenu sinergizma

U neuropatskom modelu bola (dijabetesna neuropatija) u miševa, levetiracetam je ostvario sinergističku interakciju sa ibuprofenom, paracetamolom, gabapentinom, duloksetinom i alfa-lipoiinskom kiselinom (Slike 47B, 49B, 51B, 53B i 55B). Prema vrednostima indeksa interakcije ( $\gamma$ ), koji opisuje stepen sinergizma između dva leka visoke analgetičke efikasnosti primenjenih u kombinaciji (što je vrednost  $\gamma$  manja, sinergizam/potencijacija među komponentama je veća), ispitivane kombinacije mogu se rangirati na sledeći način:

1. levetiracetam-gabapentin ( $\gamma = 0,06$ )
2. levetiracetam-paracetamol ( $\gamma = 0,11$ ) = levetiracetam-duloksetin ( $\gamma = 0,11$ )
3. levetiracetam-ibuprofen ( $\gamma = 0,14$ )
4. levetiracetam-alfa-lipoiinska kiselina ( $\gamma = 0,35$ ) (Tabele 12, 13, 14, 15 i 16).

#### **4. Uticaj levetiracetama na motornu sposobnost pacova i miševa**

U rotarod testu ispitivan je uticaj antinociceptivnih doza levetiracetama (najvećih ispitivanih sistemskih doza) na motornu spretnost eksperimentalnih životinja. Levetiracetam (200 mg/kg; p.o.) nije uticao na motornu sposobnost pacova i miševa, tj. sve životinje su uspele da ostanu na rotirajućem vretenu zadatih 180 s ( $p > 0,05$ ; Student  $t$ -test).

## V DISKUSIJA

U prvom delu istraživanja ispitano je antinociceptivno dejstvo levetiracetama u eksperimentalnim modelima bola (inflamatornom, visceralnom i neuropatskom).

### **1. Antinociceptivni efekti levetiracetama u modelima inflamatornog, visceralnog i neuropatskog bola u pacova i miševa**

#### ***1.1. Antinociceptivni efekat levetiracetama u modelu inflamatornog bola u pacova***

Kao model inflamatornog bola korišćen je model karageninom izazvane inflamacije zadnje šape pacova, koja je praćena razvojem bolne preosetljivosti - hiperalgezije. Razvoj bolne preosetljivosti i uticaj sistemski i lokalno periferno primenjenog levetiracetama na razvoj bolne preosetljivosti ispitani su u modifikovanom testu pritiska na zadnju šapu pacova.

*Sistemski primenjen levetiracetam* (10-200 mg/kg; p.o.) dozno-zavisno je smanjio razvoj bolne preosetljivosti izazvane intraplantarnom injekcijom karagenina u zadnju šapu pacova u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova (Slika 12). Ovo je prvi dokaz o antihiperalgezijskom dejstvu levetiracetama u eksperimentalnom modelu inflamatorne hiperalgezije. Saglasno našim rezultatima, pokazano je da i drugi antiepileptici (lamotrigin, karbamazepin, okskarbazepin, pregabalin i topiramata) smanjuju razvoj hiperalgezije izazvane proinflamatornim sredstvima u testu pritiska na šapu pacova (Nakamura-Craig i sar., 1995; Tomić i sar., 2004; Yokoyama i sar., 2007; Stepanović-Petrović i sar., 2011a; Paranos i sar., 2013). Suprotno našim rezultatima, Munro i saradnici (2007) nisu zabeležili efikasnost levetiracetama u formalinskom modelu inflamatornog bola u pacova, iako su koristili veće doze levetiracetama u odnosu na naša istraživanja (100-600 mg/kg vs 10-200 mg/kg). Korišćenje različitog proinflamatornog sredstva (formalin vs karagenin, u našoj studiji) moglo bi da bude jedno od objašnjenja izostanka efekta levetiracetama u formalinskom testu. Dodatna objašnjenja mogla bi da budu različit put primene leka (i.p. vs p.o., u našem istraživanju) i/ili različit protokol (profilaktički vs terapijski, u našem istraživanju). Dozni raspon u kome su ispitivani

efekti levetiracetama u našoj studiji sličan je onom koji je korišćen u animalnim modelima epilepsije (De Smedt i sar., 2007), što bi eventualno moglo da ukaže na sličnost između terapijskih doza levetiracetama kao analgetika (potencijalna indikacija) i terapijskih doza levetiracetama kao antiepileptika (zvanična indikacija).

Nakon *lokalne periferne primene, levetiracetam* (200-1000 nmol/šapi; i.pl.) je takođe izazvao značajno i dozno-zavisno smanjenje inflamatorne hiperalgezije izazvane karageninom u modifikovanom testu pritiska na šapu pacova (Slika 13). Ovo je prvi dokaz o lokalnom perifernom antinociceptivnom dejstvu levetiracetama u nekom eksperimentalnom modelu bola. Da je ispoljeni efekat lokalne prirode, potvrđeno je izostankom efekta najveće ispitivane doze levetiracetama (1000 nmol/šapi; i.pl.) aplikovane u zdravu (levu, neinflamiranu) šapu, što je dokaz da nije došlo do resorpcije leka u sistemsku cirkulaciju i ispoljavanja sistemskih efekata (Slika 13). Lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo u eksperimentalnim modelima inflamatornog bola u pacova ostvarili su i drugi antiepileptici (karbamazepin, okskarbazepin, topiramet) (Tomić i sar., 2006; Vučković i sar., 2006b; Paranos i sar., 2013). U svim navedenim radovima, antiepileptici su ispoljili efikasnost u višestruko manjim dozama u odnosu na najmanju ispitivanu sistemsku dozu. I u našem radu, levetiracetam (200-1000 nmol/šapi = 0,034-0,17 mg/pacovu, što odgovara 0,17-0,85 mg/kg) je ostvario efikasnost u dozama koje su 12 do 59 puta manje u odnosu na najmanju ispitivanu sistemsku dozu (10 mg/kg). Na bazi navedenog može se zaključiti da sistemski primenjen levetiracetam može da postigne efektivne koncentracije i na periferiji, te da periferni efekti doprinose ukupnom antihiperalgezijskom dejstvu sistemski primenjenog levetiracetama. Pored toga, lokalna primena lekova omogućava dopremanje optimalne koncentracije leka na mestu gde nastaje bol, uz minimiziranje pojave neželjenih efekata i interakcija lekova, koji su verovatniji nakon sistemske primene lekova.

Eksperimentalni podaci o efikasnosti sistemski i lokalno periferno primenjenog levetiracetama u modelu inflamatornog bola mogli bi da budu osnov za ispitivanje potencijalne kliničke efikasnosti levetiracetama u tretmanu inflamatornih bolnih stanja u ljudi.

### ***1.2. Antinociceptivni efekat levetiracetama u modelu visceralnog bola u miševa***

U testu abdominalnih grčeva u miševa, levetiracetam (1-25 mg/kg; p.o.) je ostvario statistički značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo (Slika 14). Ovo je prvi dokaz o antinociceptivnom dejstvu levetiracetama u modelu visceralnog bola. Saglasno našim rezultatima, pokazano je da i drugi antiepileptici (gabapentin, karbamazepin, okskarbazepin i topiramet) ispoljavaju antinociceptivnu aktivnost u visceralnom modelu bola u miševa (Feng i sar., 2003; Stepanović-Petrović i sar., 2008).

U testu grčeva u miševa sirćetna kiselina aktivira periferne nociceptore na senzornim nervnim vlaknima oslobađanjem proinflamatornih supstanci (Satyanarayana, 2004). Visceralna hiperalgezija nastaje kao posledica smanjivanja praga okidanja receptora “visokog praga” i aktivacije prethodno neosetljivih receptora (*periferna senzitivizacija*) i posledičnih neuroplastičnih promena u centralnom nervnom sistemu u smislu povećane neuralne aktivnosti i ekscitabilnosti (*centralna senzitivizacija*), čime se pojačava efekat bolnih stimulusa koji potiču iz visceralnih organa (Giamberardino, 1999). Dakle, može se reći da levetiracetam ostvaruje efikasnost i u visceralnom inflamatornom modelu bola, pored već dokazane efikasnosti u somatskom inflamatornom bolu.

Podatak da profilaktički primenjen levetiracetam ostvaruje antinociceptivno dejstvo u modelu visceralnog bola u miševa u saglasnosti je sa rezultatima Sliva i sar. (2008), koji su pokazali da profilaktički primenjen levetiracetam značajno smanjuje razvoj bolne preosetljivosti u eksperimentalnom modelu postoperativnog bola u pacova, što može da ukaže na potencijalnu kliničku implikaciju u prevenciji postoperativnog bola nakon abdominalnih hirurških zahvata.

### ***1.3. Antinociceptivni efekat levetiracetama u modelu dijabetesne neuropatije u miševa***

Levetiracetam (10-100 mg/kg; p.o.) je ispoljio statistički značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u modelu dijabetesne neuropatije u miševa, 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom (Slika 15). Rezultati našeg istraživanja su potvrda rezultata prethodnih studija u kojima je pokazana efikasnost levetiracetama u eksperimentalnim modelima dijabetesne neuropatije u pacova (Ardid i sar., 2003) i miševa (Ozcan i sar., 2008). Ardid i sar.

(2003) su pokazali da levetiracetam (17-120 mg/kg; i.p.) ostvaruje dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo u dijabetičnih pacova, 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa streptozotocinom, u testu pritiska na šapu pacova (varijanta testa pritiska na šapu pacova u kome se meri jačina pritiska (g) kada životinja vokalizacijom označi da je postignut prag bola), pri čemu su efekti leka praćeni 90 minuta. Efikasnost levetiracetama (20-200 mg/kg; i.p.) je ispitana i u modelu dijabetesne neuropatije u miševa (Balb/C soj), u testu stavljanja miša na toplu ploču („hot plate” test). Efekti leka praćeni su 75 minuta, sa maksimumom antinociceptivnog dejstva manjim od 20% (Ozcan i sar., 2008). U navedenim radovima (Ardid i sar., 2003; Ozcan i sar., 2008) levetiracetam nije ispoljio antinociceptivno dejstvo u zdravih pacova/miševa, što može da ukaže da levetiracetam nema uticaj na normalno nociceptivno sprovođenje, već da ostvaruje efekte kada postoje promene u bolnom putu, kao što su neuropatske promene u dijabetesu.

Imajući u vidu nisku efikasnost levetiracetama u modelu dijabetesne neuropatije na soju miševa Balb/C (Ozcan i sar., 2008), odlučili smo da ispitamo efekte levetiracetama u modelu dijabetesne neuropatije ali na drugom soju miševa (C57BL/6). Za C57BL/6 soj je pokazano da dobro reaguje na indukciju dijabetesa streptozotocinom uz više vrednosti glikemije i nižu stopu smrtnosti u odnosu na Balb/C soj (Rubinstein i sar., 2013). Pored toga, levetiracetam smo primenjivali peroralnim putem, fiziološki najprihvatljiviji put primene, a efekte leka smo pratili 240 minuta. Značajna antinociceptivna efikasnost levetiracetama u našem istraživanju (Slika 15) u odnosu na znatno nižu efikasnost zabeleženu od strane Ozcan i sar. (2008) uprkos sličnom doznom rasponu, može se objasniti različitim sojem miševa (Balb/C vs C57BL/6, u našem istraživanju) i/ili različitim nociceptivnim testom („hot plate” vs „tail flick”, u našem istraživanju) i/ili različitim putem primene (i.p. vs p.o., u našem istraživanju) i/ili različitim protokolom (eksperimenti su izvođeni 2 nedelje vs 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa, u našem istraživanju).

Podaci o efikasnosti antiepileptika u animalnim modelima dijabetesne neuropatije su brojni (Tomić i sar., 2010b; Zhang i sar., 2013). Antiepileptici su važna linija lečenja dijabetesne neuropatije (BNF 66, 2013), a jedan od limitirajućih faktora njihove hronične primene su neželjena dejstva. Podatak da levetiracetam, antiepileptik sa neuobičajeno povoljnim bezbednosnim profilom, ostvaruje efikasnost u ovom modelu bola mogao bi da unapredi tretman dijabetesne neuropatije.



Na bazi prikazanih rezultata o efikasnosti levetiracetama u animalnim modelima dijabetesne neuropatije, možemo govoriti o potencijalnoj primeni levetiracetama u terapiji bolne dijabetesne neuropatije, s obzirom da kliničke studije na tu temu još uvek nisu sprovedene.

## **2. Mehanizam antihiperalgezijskog efekta levetiracetama u modelu inflamatornog bola u pacova**

Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama ispitan je u inflamatornom modelu bola u pacova, u modifikovanom testu pritiska na zadnju šapu pacova. Model inflamatornog bola je odabran, jer je inflamatorni bol klinički najzastupljenija vrsta bola. Levetiracetam je ostvario statistički značajno i dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo u ovom modelu bola, nakon sistemske (p.o.) i lokalne periferne primene (i.pl.), što je pružilo mogućnost za ispitivanje sistemskih i lokalnih perifernih mehanizama dejstva leka. Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama do sada nije ispitan.

Poznato je da u sistemu prenošenja i modulisanja bolnih signala značajnu ulogu imaju GABA<sub>A</sub>, opioidergički,  $\alpha_2$ -adrenergički, serotonergički i adenozijski receptori (Millan, 2002). Agonisti na ovim receptorima mogu ostvariti analgetički efekat. Primenom antagonista ovih receptora, ispitali smo da li levetiracetam deluje preko GABA<sub>A</sub>, opioidergičkih,  $\alpha_2$ -adrenergičkih, serotonergičkih i adenozijskih receptora. Mesto uticaja levetiracetama na ove receptore (centralni i/ili periferni nervni sistem) utvrdili smo praćenjem efekata nakon sistemske i lokalne primene levetiracetama i odgovarajućih antagonista.

### ***2.1. Inhibitorno dejstvo antagoniste GABA-ergičkih receptora***

U našem istraživanju, *bikukulin*, selektivni antagonist GABA<sub>A</sub> receptora, statistički je značajno i dozno-zavisno inhibirao sistemske, ali ne i lokalne periferne efekte levetiracetama (Slike 16 i 17). Ovaj podatak ukazuje da su GABA<sub>A</sub> receptori, bar delom, uključeni u antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama i to najverovatnije na centralnom nivou, što može da se interpretira na dva načina: levetiracetam može da stupi u interakciju sa GABA<sub>A</sub> receptorima direktno ili indirektno, potenciranjem GABA<sub>A</sub>-ergičke inhibitorne neurotransmisije. Postoje literaturni podaci da levetiracetam nema afinitet vezivanja za centralne GABA<sub>A</sub> receptore

(Gower i sar., 1992; Noyer i sar., 1995). S druge strane, pokazano je da levetiracetam potencira inhibitornu GABA<sub>A</sub>ergičku neurotransmisiju na indirektan način: 1) uticajem na metabolizam i obrt GABA-e u određenim regijama mozga (Löscher i sar., 1996) i 2) smanjenjem osetljivosti GABA<sub>A</sub> receptora na dejstvo negativnih alosternih modulatora, cinka i β-karbolina (Rigo i sar., 2002).

Činjenica da levetiracetam ne stupa u interakciju sa perifernim GABA<sub>A</sub> receptorima u saglasnosti je sa rezultatima nedavnih studija u kojima je pokazano da periferni GABA<sub>A</sub> receptori ne posreduju lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo karbamazepina, okskarbazepina i topiramata u inflamatornom modelu bola u pacova (Stepanović-Petrović i sar., 2008a; Paranos i sar., 2008). Uzevši u obzir sve navedeno, možemo zaključiti da levetiracetam najverovatnije deluje na GABA<sub>A</sub> receptore indirektno, potenciranjem GABA-ergičke inhibitorne neurotransmisije u centralnom nervnom sistemu.

## **2.2. Inhibitorno dejstvo antagonista opioidergičkih receptora**

Učešće opioidergičkog sistema u antihiperalgezijskom dejstvu levetiracetama ispitano je praćenjem uticaja antagonista opioidergičkih receptora, nakon sistemske i lokalne periferne primene levetiracetama i odgovarajućih antagonista.

**Sistemski primenjen nalokson** (1-3 mg/kg; i.p.), neselektivni antagonist opioidergičkih receptora, značajno je i dozno-zavisno smanjio antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) (Slika 18). Ovaj podatak ukazuje da su opioidergički receptori, bar delom, uključeni u antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama. Prema našem saznanju ne postoje podaci o afinitetu levetiracetama za opioidergičke receptore, te ne možemo govoriti o direktnom vezivanju leka za ove receptore. Međutim, u nekoliko *in vitro* studija je pokazano da levetiracetam selektivno blokira N-tip Ca<sup>2+</sup>-kanala, smanjujući provođenje Ca<sup>2+</sup> jona (Niespodziany i sar., 2001; Lukyanetz i sar., 2002). Agonisti opioidergičkih receptora takođe inhibiraju N-tip Ca<sup>2+</sup>-kanala na voltažno-zavisan način (Wu i sar., 2004). Na bazi navedenog možemo pretpostaviti da je blokada N-tipa Ca<sup>2+</sup>-kanala uključena u antinociceptivno dejstvo levetiracetama posredovano opioidergičkim receptorima.

**Nalokson** (75-300 nmol/šapi; i.pl.) je i nakon **lokalne periferne primene** značajno inhibirao antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (1000 nmol/šapi; i.pl.) na dozno-zavisan

način (Slika 19A). Kako je nalokson neselektivni antagonist opioidergičkih receptora, ne možemo znati koji je podtip opioidergičkih receptora uključen u periferno antinociceptivno dejstvo levetiracetama. Imajući u vidu da  $\mu$ -opioidergički receptori prevashodno posreduju antinociceptivne efekte opioidnih agonista na periferiji (Sawynok, 2003), ispitali smo uticaj CTAP-a, selektivnog antagoniste  $\mu$ -opioidergičkih receptora, na lokalno periferno antihiperalgzijsko dejstvo levetiracetama. **CTAP** (1-5 nmol/šapi; i.pl.) je značajno i dozno-zavisno smanjio antihiperalgzijsko dejstvo levetiracetama (1000 nmol/šapi; i.pl.) (Slika 19B), ukazujući da su  $\mu$ -opioidni receptori uključeni u lokalno periferno antihiperalgzijsko dejstvo levetiracetama. Inhibitorno dejstvo naloksona i CTAP-a je lokalne prirode, s obzirom da primena najvećih ispitivanih doza naloksona i CTAP-a u kontralateralnu (levu, neinflamiranu) šapu nije značajno uticala na antihiperalgzijsko dejstvo levetiracetama (Slike 19A i B), time je isključena mogućnost ispoljavanja sistemskih efekata antagonista nakon resorpcije sa mesta primene. Podatak da su  $\mu$ -opioidergički receptori uključeni u antihiperalgzijsko dejstvo levetiracetama, može da se protumači na 2 načina. Interakcija levetiracetama sa  $\mu$ -opioidergičkim receptorima može da se ostvari direktno, vezivanjem leka za receptore ili indirektno, posredstvom endogenog opioidnog sistema. Poznato je da inflamacija povećava dostupnost (dolazi do prekida perineuralne barijere) i ekspresiju opioidergičkih receptora na perifernom senzornom neuronu, kao i oslobađanje opioidnih peptida iz imunih ćelija (limfocita, makrofaga i mast ćelija) (Marvizon i sar., 2010). Oslobođeni opioidni peptidi su endogeni ligandi opioidnih receptora. Antinociceptivno dejstvo  $\mu$ -opioidnih agonista u inflamaciji rezultat je njihovog dejstva na senzorne nerve (Sawynok, 2003). Za sada nema raspoloživih podataka o afinitetu levetiracetama za periferne opioidne receptore. Kao što je već navedeno, levetiracetam selektivno inhibira N-tip  $\text{Ca}^{2+}$ -kanala i smanjuje sprovođenje  $\text{Ca}^{2+}$  jona (Niespodziany i sar., 2001; Lukyanetz i sar., 2002), baš kao i agonisti  $\mu$ -opioidergičkih receptora (Wu i sar., 2004). *In vitro* studije su pokazale da periferni senzorni neuroni sadrže  $\text{Ca}^{2+}$ -kanale N-tipa u velikom broju (Scroggs i Fox, 1992). Periferna lokalna primena blokatora N-tipa  $\text{Ca}^{2+}$ -kanala ostvaruje antinociceptivno dejstvo u pacova sa hiperalgzijom nakon oštećenja perifernog nerva (podvezivanje *n. ischiadicus*-a), ali ne i u zdravih pacova (White i Cousins, 1998). Smatra se da oštećenje nerava prouzrokuje senzitivaciju perifernih nerava, koja između ostalog podrazumeva promene u provodljivosti, funkciji i ekspresiji  $\text{Ca}^{2+}$ -kanala N-tipa (Xie i sar., 1993; White i Cousins, 1998). Na bazi navedenog, mogli bismo da zaključimo da je blokada  $\text{Ca}^{2+}$ -kanala N-tipa na perifernom

senzornom neuronu odgovorna za  $\mu$ -opioidnim receptorima posredovano antinociceptivno dejstvo levetiracetama na periferiji.

### ***2.3. Inhibitorno dejstvo antagonista adrenergičkih receptora***

**Johimbin** (1-3 mg/kg; i.p.), selektivni antagonist  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora, značajno je i dozno-zavisno inhibirao antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) (Slika 20). Ovaj podatak ukazuje da su  $\alpha_2$ -adrenergički receptori uključeni u antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama. Levetiracetam bi mogao direktno (vezivanjem za receptore) i/ili indirektno (potenciranjem noradrenergičke neurotransmisije) da stupi u interakciju sa navedenim receptorima. Za sada nema podataka o vezivanju levetiracetama za  $\alpha_2$ -adrenergičke receptore, niti o eventualnom uticaju na endogene nivoe noradrenalina.  $\alpha_2$ -Adrenergički receptori su široko rasprostranjeni kako u centralnom, tako i u perifernom nervnom sistemu, a mogu posredovati antinociceptivne ili pronociceptivne efekte, u zavisnosti od toga koji se podtip  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora aktivira i na kom nivou sistema za modulaciju bola (Millan, 2002; Sawynok, 2003). Antinociceptivne efekte noradrenalina i  $\alpha_2$ -adrenergičkih agonista posreduju  $\alpha_2$ -adrenergički receptori locirani na perifernim i centralnim terminalnim završecima primarnog senzornog neurona, na nivou spinalnih dorzalnih neurona i unutar nekoliko jedara moždanog stabla (Petrovaara, 2006; Chen i sar., 2007). Nakon systemske primene levetiracetama, interakcija sa  $\alpha_2$ -adrenergičkim receptorima može da se ostvari na svim tim nivoima, direktno ili indirektno. Kako bismo, barem delimično, razjasnili mesto interakcije levetiracetama i  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora, ispitali smo uticaj lokalno periferno primenjenih antagonista  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora na lokalne periferne antihiperalgezijske efekte levetiracetama.

**Johimbin** (130-520 nmol/šapi; i.pl.) je i nakon **lokalne periferne primene** značajno smanjio antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (1000 nmol/šapi; i.pl.) na dozno-zavisan način (Slika 21A), ukazujući na učešće perifernih  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora u perifernom antihiperalgezijskom dejstvu levetiracetama. Periferni  $\alpha_2$ -adrenergički receptori su lokalizovani na perifernim terminalima primarnog aferentnog neurona i simpatičkom postganglijskom neuronu, a mogu posredovati i analgeziju i hiperalgeziju u zavisnosti od aktiviranog podtipa receptora. Tokom inflamacije dolazi do interakcije (tzv. kuplovanja) između simpatičkog i primarnog senzornog neurona, koja je praćena pupljenjem simpatičkog vlakna, promenom u

ekspresiji i/ili osetljivosti određenih podtipova  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora i povećanim oslobađanjem noradrenalina i drugih medijatora koji modulišu aktivnost oba tipa vlakana (Petrovaara, 2006). Pretpostavlja se da je pronociceptivno dejstvo noradrenalina i  $\alpha_2$ -adrenergičkih agonista posredovano  $\alpha_{2B}$ -adrenergičkim receptorima, a antinociceptivno dejstvo  $\alpha_{2C}$ - i  $\alpha_{2A}$ -adrenergičkim receptorima (za  $\alpha_{2A}$ -adrenergičke receptore postoje podaci da mogu posredovati i pronociceptivne efekte) (Sawynok, 2003; Petrovaara, 2006). S obzirom da johimbin ne pruža dovoljno preciznu informaciju o tome koji je podtip  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora uključen u antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama, ispitan je uticaj selektivnih antagonista  $\alpha_{2A}$ -adrenergičkih (BRL 44408) i  $\alpha_{2C}$ -adrenergičkih (MK-912) receptora na periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama. **BRL 44408** (50-200 nmol/šapi; i.pl.) i **MK-912** (5-20 nmol/šapi; i.pl.) su statistički značajno i dozno-zavisno antagonizovali periferne efekte levetiracetama (1000 nmol/šapi; i.pl.) (Slika 21B i C), na bazi čega se može zaključiti da su  $\alpha_{2A}$ - i  $\alpha_{2C}$ -adrenergički receptori uključeni u lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama. Ovaj podatak može da se interpretira dvojako, levetiracetam može direktno da aktivira periferne  $\alpha_2$ -adrenergičke receptore ili indirektno, posredstvom povećanog lokalnog oslobađanja noradrenalina. Za sada nema raspoloživih podataka o afinitetu levetiracetama za periferne  $\alpha_2$ -adrenergičke receptore, niti o eventualnom uticaju na lokalne nivoe noradrenalina. Potrebne su dodatne studije kako bi se preciznije odredio karakter interakcije levetiracetama i  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora.

U eksperimentima ispitivanja uticaja lokalno periferno primenjenih antagonista  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora, isključena je mogućnost ispoljavanja sistemskih efekata antagonista nakon apsorpcije sa mesta primene, s obzirom da su inhibitorski efekti izostali nakon primene najvećih ispitivanih doza johimbina, BRL 44408 i MK-912 u zdravu šapu (Slike 21A, B i C).

#### **2.4. Inhibitorsko dejstvo antagonista serotonergičkih receptora**

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) ima kompleksnu ulogu (inhibicija i facilitacija) u procesu nastanka i transmisije bolnih impulsa. Različiti 5-HT receptori distribuirani širom centralnog i perifernog nervnog sistema posreduju ove efekte (Kayser i sar., 2010). Elektrofiziološke studije su pokazale da je aktivacija 5-HT<sub>1</sub> receptora uglavnom odgovorna za

antinociceptivne, a aktivacija 5-HT<sub>2</sub> receptora za pronociceptivne efekte 5-HT i 5-HT agonista, kako na centralnom tako i na perifernom nivou bolnog puta (Millan, 2002; Lopez-Garsia, 2006).

Nakon *sistemske primene metizergida* (0,25-1 mg/kg; i.p.), neselektivnog antagoniste 5-HT receptora (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>5-7</sub>), došlo je do značajnog smanjenja antihiperalgezijskog dejstva levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) na dozno-zavisan način (Slika 22). Nema podataka o afinitetu levetiracetama za 5-HT receptore, kao ni o eventualnom uticaju na oslobađanje i metabolizam serotonina. Na bazi prikazanih rezultata, možemo zaključiti da su 5-HT receptori, najverovatnije 5-HT<sub>1</sub> podtipa, uključeni u antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama.

Kako bismo ispitali na kom nivou levetiracetam ostvaruje interakciju sa 5-HT receptorima, u sledećem koraku pratili smo uticaj *lokalno periferno primenjenog metizergida* (10-100 nmol/šapi; i.pl.) na lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (1000 nmol/šapi; i.pl.). Zabeleženo je da i lokalno primenjeni metizergid statistički značajno i dozno-zavisno inhibira periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (Slika 23A). Ovaj podatak ukazuje da su periferni 5-HT receptori, barem delimično, uključeni u periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama. Postoje podaci da periferni 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptori posreduju antinociceptivne efekte u inflamatornim bolnim stanjima (Bingham i sar., 2001; Granados-Soto i sar., 2010). Imajući ovo u vidu, ne iznenađuje podatak da je *lokalno periferno primenjeni GR 127935*, selektivni 5-HT<sub>1B/1D</sub> antagonist, (50-200 nmol/šapi; i.pl.) značajno inhibirao lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (1000 nmol/šapi; i.pl.) (Slika 23B). Lokalna priroda inhibitornog uticaja 5-HT antagonista, potvrđena je izostankom efekta najvećih ispitivanih doza metizergida i GR 127935 primenjenih u zdravu (levu, neinflamiranu) šapu, što je dokaz da nije došlo do resorpcije antagonista u sistemsku cirkulaciju i ispoljavanja sistemskih efekata (Slika 23A i B). Prema našem saznanju nema dokaza o afinitetu levetiracetama za periferne 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptore, niti o njegovom uticaju na lokalno oslobađanje i metabolizam serotonina. Na periferiji, triptani (agonisti 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptora) preveniraju ili blokiraju neurogenu inflamaciju, barem delimično, inhibicijom oslobađanja supstance P i CGRP iz primarnog aferentnog neurona (Buzzi i sar., 1991). Uzimajući u obzir sve navedeno, možemo zaključiti da su 5-HT receptori, najverovatnije 5-HT<sub>1B/1D</sub> podtipa, na indirektan način uključeni u periferno antinociceptivno dejstvo levetiracetama.

## 2.5. Inhibitorno dejstvo antagonista adenozijskih receptora

**Kofein** je statistički značajno i dozno-zavisno antagonizovao sistemske i lokalne periferne antihiperalgezijske efekte levetiracetama (Slike 24A, 25A). Podatak da je **sistemski primenjen kofein** (1-5 mg/kg; i.p.), neselektivni antagonist adenozijskih A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> i A<sub>2B</sub> receptora, značajno inhibirao antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) (Slika 24A) ukazuje da su adenozijski receptori uključeni u njegovo dejstvo. Međutim, kako je kofein neselektivni antagonist adenozijskih receptora, nije moguće precizirati koji je podtip receptora odgovoran za antinociceptivno dejstvo levetiracetama. Imajući u vidu da eksperimentalni podaci ukazuju da prevashodno A<sub>1</sub> receptori (centralni i periferni) posreduju antinociceptivne efekte (Sawynok, 2003; Sawynok, 2007), pretpostavili smo da su u antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama uključeni A<sub>1</sub> receptori. Ovo je potvrđeno time što je **1,3-dipropil-8-ciklopentilksantin (DPCPX)**, selektivni A<sub>1</sub> antagonist (0,1-0,8 mg/kg; i.p.), inhibirao efekte levetiracetama (100 mg/kg; p.o.) (Slika 24B). Ovaj podatak može da se protumači na dva načina: interakcija levetiracetama sa adenozijskim A<sub>1</sub> receptorima može da se ostvari direktno, vezivanjem leka za receptor ili indirektno, pospešivanjem adenozijske neurotransmisije. Eksperimentalne *in vitro* studije su utvrdile da levetiracetam nema afinitet za kortikalne A<sub>1</sub> receptore pacova, kao ni za A<sub>2</sub> receptore u striatumu pacova (Noyer i sar., 1995). Iako se ne može sasvim isključiti mogućnost da se levetiracetam vezuje za adenozijske receptore (u drugim delovima mozga ili na periferiji), čini se da je verovatnija indirektna interakcija sa adenozijskim receptorima, augmentacijom adenozijske neurotransmisije. Poznato je da adenozijski receptori učestvuju u modulaciji bola na svim nivoima bolnog puta. Kičmena moždina i periferija su mesta na kojima agonisti A<sub>1</sub> receptora ostvaruju antinociceptivne efekte u inflamatornim bolnim stanjima (Sawynok i Liu, 2003). Nakon sistemske primene levetiracetama i antagonista adenozijskih receptora, nije moguće utvrditi na kom nivou se dešava interakcija leka sa adenozijskim receptorima, zato smo sprovedli eksperimente u kojima su levetiracetam i kofein/DPCPX primenjivani lokalno periferno u zadnju šapu pacova.

**Lokalno periferno primenjeni** antagonisti adenozijskih receptora, **kofein** (500-1500 nmol/šapi; i.pl.) i **DPCPX** (3-30 nmol/šapi; i.pl.) značajno su i dozno-zavisno inhibirali lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (1000 nmol/šapi; i.pl.) (Slika 25A i B). Ovaj podatak ukazuje da su periferni A<sub>1</sub> receptori uključeni u lokalno periferno antihiperalgezijsko

dejstvo levetiracetama. Primenjeni u najvećoj ispitivanoj dozi kontralateralno (u zdravu šapu pacova) antagonisti adenozijskih receptora, kofein i DPCPX, nisu uticali na antinociceptivno dejstvo levetiracetama (Slika 25A i B), čime se isključuje mogućnost apsorpcije antagonista sa mesta primene i ispoljavanja sistemskih efekata. Ovaj podatak je u saglasnosti sa našim prethodnim ispitivanjima, u kojima je pokazano da antiepileptici, karbamazepin i okskarbazepin ostvaruju periferno antinociceptivno dejstvo u inflamatornom modelu bola u pacova, posredovano perifernim  $A_1$  receptorima (Tomić i sar., 2006; Vučković i sar., 2006b). Pored toga, periferna primena agonista  $A_1$  receptora smanjuje razvoj mehaničke i termičke hiperalgezije nakon oštećenja nerava (Sawynok i Liu, 2003). Prisustvo adenozijskih  $A_1$  receptora na primarnom senzornom neuronu dokazano je imunohistohemijski (Schulte i sar., 2003). Za sada ne postoje podaci o vezivanju levetiracetama za periferne  $A_1$  receptore, te možemo samo spekulirati da je periferno antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama posredovano indirektnom aktivacijom perifernih  $A_1$  receptora.

Imajući u vidu da je periferno antinociceptivno dejstvo levetiracetama, između ostalog, posredovano  $\mu$ -opioidergičkim,  $\alpha_2$ -adrenergičkim i  $A_1$ -adenozijskim receptorima, kao i saznanje Aley i Lewine (1997) da se pomenuti periferni receptori izgleda ne aktiviraju nezavisno, već kao kompleks od tri receptora, možemo pretpostaviti da levetiracetam aktivira na periferiji ovaj trojni receptorni kompleks i ostvaruje periferno antinociceptivno dejstvo.

Pokazali smo da je antinociceptivno sistemsko/lokalno periferno dejstvo levetiracetama posredovano  $GABA_A$ ergičkim, opioidergičkim,  $\alpha_2$ -adrenergičkim, serotonergičkim i adenozijskim receptorima. Descendentna inhibitorna kontrola bola podrazumeva svojevrsnu interakciju između opioidergičkog,  $\alpha_2$ -adrenergičkog, serotonergičkog i adenozijskog sistema (Millan, 2002). Visoka efikasnost levetiracetama u inflamatornom modelu bola u pacova se upravo može objasniti njegovim dejstvom na veći broj receptorskih sistema uključenih u descendentnu inhibitornu modulaciju bola. Od značaja je napomenuti da se funkcionalni status opioidergičkih (Zollner i sar., 2003),  $\alpha_2$ -adrenergičkih (Vanegas i Schaible, 2004), serotonergičkih (Zhang i sar., 2002) i adenozijskih (Sawynok i Liu, 2003) receptora menja nakon periferne inflamacije. Konkretno, može doći do povećanja broja i/ili osetljivosti ovih receptora, što se odražava na antinociceptivne efekte lekova koji deluju putem njih. Saglasno sa ovim je i podatak da Ardid i sar. (2003) nisu zabeležili efikasnost levetiracetama u akutnim nociceptivnim testovima. Činjenica da levetiracetam aktivira i centralne  $GABA_A$  receptore, može



da ukaže na dodatno potenciranje descendente inhibicije bolne transmisije, s obzirom da su Jasmin i sar. (2003) ustanovili da stimulacija GABA<sub>A</sub> receptora u cerebralnom korteksu dovodi do analgezije putem augmentacije descendencijalnih inhibicijalnih mehanizama.

### **3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelima inflamatornog, visceralnog i neuropatskog bola u pacova i miševa**

Levetiracetam do sada nije ispitan u interakcijama sa drugim analgeticima. Imajući u vidu izuzetno povoljan bezbednosni profil levetiracetama, sprovedeni su eksperimenti u kojima su ispitivani efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u različitim eksperimentalnim modelima bola.

#### **3.1. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelu inflamatornog bola u pacova**

##### **3.1.1. Sinergizam između levetiracetama i ibuprofena**

U našoj studiji, levetiracetam (10-200 mg/kg; p.o.) i ibuprofen (12,5-100 mg/kg; p.o.) primenjeni *per se*, ostvarili su značajno i dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo u modelu inflamatornog bola u pacova (Slike 12 i 26A), približno iste maksimalne efikasnosti (Slika 29A) i jačine dejstva (Tabela 5). Dužine trajanja dejstva levetiracetama i ibuprofena takođe su slične. Iako postoje ograničenja prilikom ekstrapolacije rezultata sa životinja na ljude, ovaj podatak bi eventualno mogao da ukaže na poredbenu efikasnost levetiracetama i ibuprofena u terapiji inflamatornih bolnih stanja u ljudi.

Levetiracetam i ibuprofen primenjeni u kombinaciji, u odgovarajućim frakcijama srednjih efektivnih doza, takođe su ostvarili značajno i dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo u istom modelu bola (Slika 28). Izoblografskom analizom okarakterisana je sinergistička interakcija između levetiracetama i ibuprofena (Slika 29B, Tabela 5). Zabeleženo je 11-ostruko smanjenje doza pojedinačnih lekova primenjenih u kombinaciji u poređenju sa onim dozama koje su pri pojedinačnoj primeni izazvale efekat istog intenziteta (27,59 mg/kg levetiracetama *per se*

nasuprot 2,52 mg/kg kada je primenjen u kombinaciji i 27,43 mg/kg ibuprofena *per se* nasuprot 2,50 mg/kg, kada je primenjen u kombinaciji), što može imati klinički značaj. Kao što je već navedeno, interakcije levetiracetama sa analgeticima do sada nisu ispitivane. Međutim, pokazano je da drugi antiepileptici (okskarbazepin, gabapentin) ostvaruju sinergističku interakciju sa ibuprofenom (Yoon i Yaksh, 1999; Stepanović-Petrović i sar., 2011a) u modelima/testovima lokalizovane inflamacije izazvane karageninom ili formalinom. U kontekstu sinergizma između lekova, bilo bi zanimljivo napomenuti da je levetiracetam ostvario sinergističku interakciju sa drugim antiepilepticima u animalnim modelima epilepsije (De Smedt i sar., 2007).

Generalno posmatrano, vrsta interakcije između dva leka primenjenih u kombinaciji može se objasniti promenama u kinetici jednog leka pod uticajem drugog (farmakokinetička interakcija) i/ili različitim mehanizmima dejstva lekova (farmakodinamska interakcija). Farmakokinetičke interakcije između levetiracetama i ibuprofena nisu bile predmet naše studije, te se ne mogu isključiti. Ipak, izgleda da je farmakokinetička interakcija između levetiracetama i ibuprofena malo verovatna iz najmanje 2 razloga. Levetiracetam se ne vezuje za proteine plazme i ne metaboliše se preko mikrozomalnih enzima jetre, te je njegov potencijal da stupa u farmakokinetičke interakcije minimalan (Patsalos, 2004; De Smedt i sar., 2007). Drugi razlog je u vezi sa našim eksperimentalnim rezultatima u kojima je pokazano da je dužina trajanja dejstva kombinacije nepromenjena u odnosu na dužinu trajanja dejstva pojedinačnih lekova, a kod farmakokinetičke interakcije se očekuje produženje trajanja dejstva kombinacije.

Sinergističku interakciju između levetiracetama i ibuprofena možemo pre svega objasniti različitim mehanizmima/mestima dejstva pojedinačnih lekova. U analizi ove interakcije najpre ćemo prodiskutovati karakteristike karageninske inflamacije, a potom i mehanizme/mesta dejstva pojedinačnih lekova u inflamatornom bolu.

Lokalna primena karagenina dovodi do oslobađanja različitih medijatora zapaljenja, između ostalog i prostaglandina. Lokalno oslobađanje prostaglandina (naročito E serije) na mestu zapaljenja dovodi do razvoja hiperalgezije (Morris, 2003). Pokazano je da periferna injekcija karagenina dovodi i do oslobađanja prostaglandina na nivou kičmene moždine, što doprinosi razvoju centralne senzitivizacije (Yaksh i sar., 2001). Sintezu prostaglandina nakon aplikacije karagenina kontroliše enzim ciklooksigenaza-2 (COX-2), kako na perifernom tako i u centralnom nivou (Yaksh i sar., 2001; Grosser i sar., 2011). Na osnovu iznetih činjenica, antihiperalgezijsko dejstvo ibuprofena, neselektivnog COX-1/COX-2 inhibitora, u

karageninskom modelu inflamatornog bola može se objasniti inhibicijom COX-2 na perifernom i spinalnom nivou (Dirig i sar., 1998; Yaksh i sar., 2001). Inhibicija COX-1 od strane ibuprofena, takođe može doprineti njegovom antihiperlgezijskom dejstvu, s obzirom da je zabeleženo da periferna COX-1 učestvuje u produkciji prostaglandina u inflamaciji (Siqueira-Junior i sar., 2003; Grosser i sar., 2011).

Mehanizam analgetičkog dejstva levetiracetama ispitivan je od strane naše istraživačke grupe i to upravo u inflamatornom modelu bola u pacova. Ustanovili smo da je antihiperlgezijsko dejstvo levetiracetama u inflamatornom bolu u pacova posredovano, barem delimično,  $\mu$ -opioidergičkim,  $\alpha_2$ -adrenergičkim, 5-HT i adenozijskim  $A_1$  receptorima, kako na perifernom tako i na centralnom nivou, kao i  $GABA_A$  receptorima na centralnom nivou sistema za modulaciju bola.

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da je sinergizam u antihiperlgezijskom dejstvu između levetiracetama i ibuprofena najverovatnije posledica farmakodinamskih interakcija.

### **3.1.2. Sinergizam između levetiracetama i celekoksiba**

Celekoksib (3,75-30 mg/kg; p.o.) je ispoljio značajan, dozno-zavisan antinociceptivni efekat u modelu inflamatornog bola u pacova (Slika 26B). Efikasnost celekoksiba i levetiracetama u ovom modelu bola je slična (Slika 31A), s tim da je celekoksib više od 3 puta potentniji lek od levetiracetama (Tabela 6). Primenjeni u kombinaciji, levetiracetam i celekoksib, ostvarili su značajan i dozno-zavisan antinociceptivni efekat (Slika 30). Izoblografskom analizom je procenjeno da je interakcija sinergistička (Slika 31B), uz smanjenje doza pojedinačnih lekova primenjenih u kombinaciji u poređenju sa dozama koje su pri pojedinačnoj primeni izazvale efekat istog stepena. U našem eksperimentu, zabeleženo je 9-ostruko smanjenje doza (27,59 mg/kg levetiracetama *per se* nasuprot 3,09 mg/kg kada je primenjen u kombinaciji i 8,09 mg/kg celekoksiba *per se* nasuprot 0,91 mg/kg, kada je primenjen u kombinaciji), što je podatak od kliničkog značaja. Poznato je da mnogi antiepileptici ostvaruju sinergističku interakciju sa nesteroidnim antiinflamatornim lekovima (NSAIL) u modelima/testovima inflamatornog bola (Yoon i Yaksh, 1999; Hurley i sar., 2002; Stepanović-Petrović i sar., 2011a). Konkretno, interakcije antiepileptika i celekoksiba u eksperimentalnim modelima inflamatornog

bola nisu ispitivane, ali je sprovedena jedna klinička studija (otvorena studija; 118 pacijenata) u kojoj je zabeležena efikasnost kombinacije gabapentina i celekoksiba u terapiji postoperativnog bola (Parsa i sar., 2009), što otvara mogućnost kliničke primene naših eksperimentalnih rezultata.

Sinergizam između levetiracetama i celekoksiba može biti posledica farmakokinetičke i/ili farmakodinamske interakcije između lekova. Potencijal levetiracetama da stupa u farmakokinetičke interakcije sa drugim lekovima je mali (Patsalos, 2004; De Smedt i sar., 2007), što se ne bi moglo reći za celekoksib, koji se obilno metaboliše u jetri (dominantno preko CYP2C9) (Gong i sar., 2012). Naši eksperimentalni podaci o približno istoj dužini trajanja dejstva kombinacije levetiracetam-celekoksib i pojedinačnih lekova, ukazuju da komponente najverovatnije ne stupaju u farmakokinetičke interakcije. Literaturni i eksperimentalni podaci navode na činjenicu da su farmakokinetičke interakcije između komponenti malo verovtne, mada se ne mogu isključiti, s obzirom da nisu bile predmet istraživanja naše studije.

Kao i u slučaju interakcije levetiracetam-ibuprofen, u prilog sinergističkoj interakciji između levetiracetama i celekoksiba ide njihova različita farmakodinamika. Celekoksib, selektivni COX-2 inhibitor, ostvaruje antihiperalgezijsko dejstvo u karageninskom modelu inflamatornog bola inhibicijom COX-2 na perifernom i centralnom nivou sistema za obradu bola (Yaksh i sar., 2001; Yoshino i sar., 2005), čime se smanjuje sinteza prostaglandina i mogućnost nastanka periferne i centralne senzitivacije. U istom modelu bola, pokazano je da su u analgetičko dejstvo celekoksiba uključeni endogeni opioidni i kanabinoidni mehanizmi na centralnom nivou, s obzirom da su intracerebroventrikularno primenjeni selektivni antagonisti  $\mu$ - i  $\delta$ -opioidnih i CB-1 kanabinoidnih receptora inhibirali analgetičko dejstvo celekoksiba (Rezende i sar., 2012).

Pokazali smo da su u antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama, barem delimično, uključeni centralni i periferni  $\mu$ -opioidergički,  $\alpha_2$ -adrenergički, 5-HT i adenoziński A<sub>1</sub> receptori, kao i centralni GABA<sub>A</sub> receptori.

Konačno, sinergistička interakcija između levetiracetama i celekoksiba mogla bi da se objasni različitim mehanizmima i mestima na kojima ostvaruju antihiperalgezijsko dejstvo u inflamatornom modelu bola u pacova. Sinergistička interakcija je nešto izraženija u kombinaciji levetiracetama sa ibuprofenom u odnosu na kombinaciju levetiracetama sa celekoksibom, procenjeno na bazi vrednosti odgovarajućih indeksa interakcije (Tabele 5 i 6), verovatno usled činjenica da ibuprofen pored COX-2 inhibira i COX-1.

### 3.1.3. Sinergizam između levetiracetama i paracetamola

U ovoj studiji, levetiracetam (10-200 mg/kg; p.o.) i paracetamol (50-200 mg/kg; p.o.) primenjeni *per se*, ostvarili su značajno i dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo u modelu inflamatornog bola u pacova (Slike 12 i 26C). Rezultati ukazuju da je levetiracetam efikasniji (Slika 33A) i potentniji lek (otprilike 3 puta) od paracetamola u ovom modelu bola (Tabela 7).

Levetiracetam i paracetamol, primenjeni u odgovarajućim frakcijama srednjih efektivnih doza, izazvali su značajan, dozno-zavisan antinociceptivni efekat u modelu inflamatornog bola u pacova (Slika 32). Prema položaju teorijske i eksperimentalne srednje efektivne vrednosti (Slika 33B), rezultatima izoblografske analize i vrednostima indeksa interakcije (Tabela 7), između levetiracetama i paracetamola ostvarena je sinergistička interakcija uz 7-ostruko smanjenje doza primenjenih lekova u kombinaciji (27,59 mg/kg vs 3,78 mg/kg za levetiracetam primenjen *per se* vs u kombinaciji; 99,90 mg/kg vs 13,69 mg/kg za paracetamol primenjen *per se* vs u kombinaciji), što je podatak od kliničkog značaja. Nedavno je pokazano da su oksakarbazepin i paracetamol ostvarili sinergističku interakciju u modelu lokalizovane inflamacije izazvane karageninom (Tomić i sar., 2010a). Pored toga, paracetamol je ostvario sinergizam u antinociceptivnom dejstvu sa drugim NSAIL-ima u modelu lokalizovane inflamacije izazvane formalinom (Miranda i sar., 2007).

Kao što je prethodno diskutovano, sinergistička interakcija između levetiracetama i paracetamola može se prevashodno objasniti različitim, komplementernim mehanizmima antihiperalgezijskog dejstva pojedinačnih lekova. Mehanizam analgetičkog dejstva paracetamola još uvek nije razjašnjen u potpunosti, iako je decenijama u širokoj upotrebi kao analgetik. Literaturni podaci ukazuju da se paracetamol vezuje za različita ciljna mesta (COX, vaniloidni TRPV1 receptor) i da stupa u interakciju sa brojnim sistemima za modulaciju bola (serotonergički, opioidergički i endokanabinoidni) (Mallet i sar., 2008; Mallet i sar., 2010a; Mallet i Eschalier, 2010b; Toussaint i sar., 2010). U modelu lokalizovane inflamacije izazvane Freund-ovim adjuvansom, paracetamol je smanjio nivo PGE<sub>2</sub> u cerebrospinalnoj tečnosti (Bianchi i sar., 2007). U modelu lokalizovane inflamacije izazvane karageninom, paracetamol je ispoljio antihiperalgezijsko dejstvo nakon sistemske, ali ne i lokalne periferne primene (Rezende i sar., 2008). U istom radu je pokazano da paracetamol aktivira centralne opioidne mehanizme u ostvarivanju antihiperalgezijskog efekta. U modelu lokalizovane inflamacije izazvane

formalinom, zabeleženo je antinociceptivno dejstvo paracetamola, kako nakon sistemske, tako i nakon lokalne periferne primene (Liu i sar., 2013). Antinociceptivno dejstvo paracetamola posredovano je spinalnim 5-HT<sub>7</sub> i perifernim i spinalnim A<sub>1</sub> receptorima (Liu i sar., 2013). Izučavanjem mehanizma dejstva paracetamola u zdravih dobrovoljaca, ustanovljeno je inhibitorno dejstvo pre svega na COX-2 (periferno i centralno) i izneta pretpostavka da bi ovo mogao da bude glavni mehanizam analgetičkog i antiinflamatornog dejstva paracetamola u humanoj primeni (Hinz i sar., 2008). Levetiracetam ostvaruje antihiperalgezijsko dejstvo u modelu lokalizovane inflamacije izazvane karageninom posredstvom centralnih i perifernih  $\mu$ -opioidergičkih,  $\alpha_2$ -adrenergičkih, 5-HT i adenozijskih A<sub>1</sub> receptora, kao i centralnih GABA<sub>A</sub> receptora. Prema tome, sinergizam između levetiracetama i paracetamola u inflamatornom modelu bola u pacova pre bi se mogao objasniti farmakodinamskom, nego farmakokinetičkom interakcijom. U prilog ovoj tvrdnji ide i naš eksperimentalni nalaz da kombinacija levetiracetam-paracetamol nema duže trajanje dejstva u odnosu na dužinu trajanja dejstva pojedinačnih lekova, što bi se moglo očekivati u slučaju farmakokinetički posredovane potencijacije dejstva.

Supra-aditivna interakcija između levetiracetama i paracetamola pokazana u ovoj studiji može imati klinički značaj u terapiji inflamatornih bolnih stanja, jer se davanjem lekova u kombinaciji može postići optimalna analgezija, a smanjiti neželjeni efekti.

#### **3.1.4. Sinergizam između levetiracetama i ceftriaksona**

Analgetička svojstva ceftriaksona, beta-laktamskog antibiotika, nedavno su prepoznata. U našoj studiji po prvi put je pokazana efikasnost ceftriaksona (10-200 mg/kg/dan; i.p.), nakon 7-dnevne primene, u somatskom modelu inflamatornog bola u pacova (Slika 27A). Prethodno je pokazano da ceftriakson, takođe nakon 7-dnevne primene, ostvaruje efikasnost u neuropatskom i visceralnom modelu bola (Hu i sar., 2010; Lin i sar., 2009; 2011b; Yang i sar., 2011).

Primenjeni u kombinaciji levetiracetam (p.o.) i ceftriakson (i.p., 7-dnevni tretman) ispoljili su značajno i dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo (Slika 34). Izoblografskom analizom procenjeno je da levetiracetam i ceftriakson ostvaruju sinergističku interakciju, uz 10-ostruku redukciju doza pojedinačnih lekova primenjenih u kombinaciji (27,59 mg/kg vs 2,80 mg/kg za levetiracetam primenjen *per se* vs u kombinaciji; 31,96 mg/kg vs 3,14 mg/kg za ceftriakson primenjen *per se* vs u kombinaciji) (Slika 35B; Tabela 8). Ovaj podatak može biti od

značaja za tretman inflamatornog bola u ljudi. Ispitana je interakcija ceftriaksona sa minociklinom, tetraciklinskim antibiotikom, u neuropatskom bolu u pacova, pri čemu je zabeležena potencijacija antinociceptivnog efekta (Amin i sar., 2012), dok interakcije u modelima inflamatornog bola do sada nisu ispitivane.

Lokalna primena karagenina pored toga što dovodi do oslobađanja različitih medijatora zapaljenja (naročito PGE<sub>2</sub>) koji doprinose nastanku periferne i centralne hiperalgezije (Yaksh i sar., 2001; Morris, 2003), izaziva i oslobađanje glutamata sa primarnih senzornih završetaka i ekscitatornih interneurona u zadnjim rogovima kičmene moždine, koji dodatno doprinose razvoju inflamatorne hiperalgezije (Carlton, 2001; Basbaum i sar., 2009; Millan, 2002). Od značaja je i podatak da je karageninom izazvana hiperalgezija posredovana oslobađanjem pro-inflamatornih citokina, TNF $\alpha$  i interleukina, iz imunih i glija ćelija (Watkins i Maier, 2002). Za ceftriakson je pokazano da dovodi do ushodne ekspresije transportera za glutamat 1 (GLT-1), uz posledično smanjenje nivoa sinaptičkog glutamata (Rothstein i sar., 2005). GLT-1 je prisutan u centralnom (Chen i sar., 2004) i perifernom (Carozzi i sar., 2008) nervnom sistemu. Dakle, antihiperalgezijsko dejstvo ceftriaksona u somatskom inflamatornom modelu bola moglo bi da se objasni njegovim selektivnim dejstvom na GLT-1 i smanjenjem nivoa ekscitatornog glutamata pre svega na nivou kičmene moždine, kao i perifernim senzornim terminalima. Amin i sar. (2012) su pokazali da ceftriakson, nakon 7-dnevne primene, u doznom rasponu sličnom onom koji je korišćen u našoj studiji, snačajno smanjuje spinalne nivoe TNF $\alpha$  i interleukina, čime se takođe može objasniti antihiperalgezijsko dejstvo ceftriakona u modelu somatske inflamatorne hiperalgezije.

Pokazali smo da je antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama u somatskom inflamatornom bolu u pacova posredovano, barem delimično, centralnim GABA<sub>A</sub>, centralnim i perifernim opioidergičkim, serotonergičkim,  $\alpha_2$ -adrenergičkim i adenozijskim A<sub>1</sub> receptorima. Na bazi navedenog možemo zaključiti da različiti mehanizmi doprinose razvoju i održavanju inflamatornog somatskog bola, te se kombinacijom levetiracetama i ceftriaksona, koji deluju različitim i komplementarnim mehanizmima antihiperalgezijski, postiže efikasno suprimiranje ovog bolnog stanja. Odnosno, farmakodinamske interakcije najverovatnije leže u osnovi sinergizma ispitivane kombinacije. Farmakokinetičke interakcije između levetiracetama i ceftriaksona su izgleda manje verovatne, imajući u vidu da je dužina trajanja dejstva kombinacije lekova nepromenjena, u odnosu na dužinu trajanja dejstva pojedinačno primenjenih lekova.

Pored toga, farmakokinetički profil levetiracetama je takav da je mogućnost interakcija na nivou metabolizma i/ili distribucije lekova minimalna (Patsalos, 2004; De Smedt i sar., 2007). Ipak, farmakokinetičke interakcije između levetiracetama i ceftriaksona se ne mogu sasvim isključiti.

Prikazani rezultati mogli bi da budu od značaja za lečenje inflamatornih bolnih stanja kao što je postoperativni bol, gde se ceftriakson inače daje kao perioperativna profilaksa ili terapija postoperativnih infekcija. Primenom kombinacije koja je ostvarila izražen sinergizam, moguće je postići optimalnu analgeziju uz značajno niže doze pojedinačnih lekova, čime se povećava bezbednost primene.

### **3.1.5. Potencijacija antihiperalgezijskog efekta levetiracetama kofeinom**

Kofein u farmakološkim ispitivanjima može imati dvojaku funkciju, može se koristiti za ispitivanje učešća adenzinskih receptora u antinociceptivnom dejstvu lekova, ali i kao adjuvantni analgetik kojim je moguće potencirati antinociceptivno dejstvo primarnog konstituenta (Sawynok, 2011a; 2011b). U našoj studiji, kofein je ispitan u oba konteksta. Kofein kao farmakološko sredstvo za ispitivanje mehanizma dejstva lekova smo već komentarisali. U ovom delu diskusije biće reči o kofeinu kao adjuvantnom analgetiku.

U našoj studiji, kofein (15-100 mg/kg; i.p.) je ostvario dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo, ali relativno male efikasnosti u modelu lokalizovane inflamacije izazvane karageninom (Slika 27B). Maksimalna efikasnost kofeina iznosila je 46,79%AH (u dozi od 100 mg/kg; i.p.), stoga ED<sub>50</sub> kofeina nije mogla da se odredi. Veće doze kofeina nisu ispitivane zbog mogućnosti ispoljavanja toksičnih efekata (150 mg/kg izaziva konvulzije, a 200 mg/kg uginuće kod većine testiranih pacova) (Fredholm i sar., 1999; Tavares i sar., 2008). Iako su podaci o antinociceptivnoj aktivnosti kofeina nekonzistentni, naš nalaz je u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija u kojima je potvrđena efikasnost kofeina u modelima/testovima lokalizovane inflamacije izazvane kvascem ili formalinom (Seegers i sar., 1981; Sawynok i sar., 1995).

Kofein primenjen u fiksnoj, sub-efektivnoj dozi (10 mg/kg; i.p.) značajno je potencirao antihiperalgezijsko dejstvo levetiracetama (1-50 mg/kg; p.o.) u inflamatornom modelu bola u pacova (Slika 36). Zabeleženo je 11-ostruko smanjenje ED<sub>50</sub> levetiracetama u prisustvu kofeina u odnosu na ED<sub>50</sub> levetiracetama primenjenog *per se*. Potencijacija antihiperalgezijskog dejstva levetiracetama kofeinom jasno je izražena pri dozama levetiracetama koje su ostvarile efekte ≤



50%AH (Slika 37). Sličan profil potencijacije kofeinom (primenjen u sub-efektivnoj dozi) zabeležen je sa NSAIL-ima (Granados-Soto i sar., 1999). Autori ističu da je kofein u najvećoj meri potencirao antinociceptivno dejstvo NSAIL u dozama koje su u blizini njihovih ED<sub>50</sub> (Granados-Soto i sar., 1999). Prikazani rezultati ukazuju na to da kofein deluje kao adjuvantni analgetik uz levetiracetam i da njihova kombinacija može biti efikasna u tretmanu inflamatornih bolnih stanja.

Antinociceptivna aktivnost kofeina može se objasniti na više načina: antagonizmom na nivou adenzinskih A<sub>2</sub> receptora koji posreduju pronociceptivne efekte, potencijacijom inhibitorne noradrenergičke neurotransmisije, inhibicijom COX i sinteze PGE<sub>2</sub> (Sawynok, 2011a; 2011b). Antagonist adenzinskih A<sub>2</sub> receptora ostvario je antinociceptivno dejstvo u drugoj fazi formalinskog testa (Hussey i sar., 2007), u kojoj dolazi do razvoja centralne i periferne senzitivacije nakon periferne inflamacije (Tjølsen i sar., 1992; Barrot, 2012), kao i u našem modelu. Interakcija sa A<sub>2</sub> receptorima mogla je da se ostvari na perifernom i/ili centralnom nivou sistema za transmisiju/modulaciju bola, imajući u vidu da periferni A<sub>2</sub> receptori na terminalima senzornog neurona posreduju pronociceptivne efekte adenzina, a da centralni A<sub>2</sub> receptori mogu učestvovati u facilitaciji bola (Sawynok, 2007; Sawynok, 2011b). U istom testu, kofein je ostvario antinociceptivno dejstvo nakon sistemske, ali ne i nakon lokalne periferne primene, uz učešće centralnih noradrenergičkih mehanizama (Sawynok i sar., 1995). U mikroglialnim ćelijama pacova, kofein je inhibirao sintezu COX-2 i produkciju PGE<sub>2</sub> (Fiebich i sar., 2000). Što se tiče levetiracetama, pokazali smo da je njegovo antihiperalgezijsko dejstvo u inflamatornom modelu bola u pacova posredovano, barem delimično,  $\mu$ -opioidergičkim,  $\alpha_2$ -adrenergičkim, 5-HT i adenzinskim A<sub>1</sub> receptorima, kako na perifernom tako i na centralnom nivou, kao i GABA<sub>A</sub> receptorima na centralnom nivou sistema za modulaciju bola. Nameće se zaključak da je izrazita potencijacija antihiperalgezijskog dejstva levetiracetama od strane kofeina posledica njihove različite farmakodinamike u inflamatorim bolnim stanjima. Upravo na farmakodinamskoj interakciji utemeljena je terapijska primena kofeina kao adjuvantnog analgetika uz NSAIL-e (Sawynok, 2011b).

Farmakokinetičke interakcije između levetiracetama i kofeina su izgleda manje verovatne, imajući u vidu farmakokinetički profil levetiracetama (Patsalos, 2004; De Smedt i sar., 2007), kao i dužinu trajanja dejstva levetiracetama u prisustvu kofeina koja je ostala nepromenjena u odnosu na dužinu trajanja dejstva samog levetiracetama.

### 3.1.6. Poređenje kombinacija levetiracetama sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom, ceftriaksonom i kofeinom

U ovoj studiji, ispitana su antihiperalgezijska dejstva kombinovane primene levetiracetama sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom, ceftriaksonom i kofeinom u inflamatornom modelu bola u pacova. Sve kombinacije ostvarile su značajno i dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo (Slike 28, 30, 32, 34 i 36). Odgovarajućom analizom ustanovljeno je da levetiracetam ostvaruje sinergističku interakciju sa svim ispitivanim lekovima i kofeinom. Interakcije levetiracetama sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom i ceftriaksonom analizirane su izoblografskom analizom (Slike 29B, 31B, 33B i 35B; Tabele 5-8), a njihovo poređenje je izvršeno na osnovu vrednosti indeksa interakcije ( $\gamma$ ) i prema stepenu redukcije doza lekova primenjenih u kombinaciju u odnosu na doze lekova primenjenih *per se* potrebnih za postizanje ekvi-analgetičkog efekta. Interakciju levetiracetama sa kofeinom moguće je rangirati samo na osnovu stepena smanjenja ED<sub>50</sub> levetiracetama u prisustvu kofeina u odnosu na ED<sub>50</sub> levetiracetama primenjenog *per se*, s obzirom da je korišćena druga metoda za analizu interakcije.

Prema navedenim kriterijumima ispitivane interakcije mogli bismo da rangiramo na sledeći način: levetiracetam-ibuprofen = levetiracetam-koferin > levetiracetam-ceftriakson > levetiracetam-celekoksib > levetiracetam-paracetamol. Ovaj podatak praktično znači da je najveća redukcija doza postignuta u kombinacijama levetiracetam-ibuprofen i levetiracetam-koferin (redukcija doza se ne odnosi na kofein, jer je primenjivan u fiksnoj dozi), a najmanja u kombinaciji levetiracetam-paracetamol. Smanjenje doza lekova primenjenih u kombinaciji značajno je sa aspekta smanjenja incidence i intenziteta neželjenih dejstava. Poznavajući profil neželjenih dejstava levetiracetama (pospanost, slabost, vrtoglavica), ibuprofena (gastrointestinalne (GIT) smetnje, krvarenje, oštećenje bubrega), celekoksiba (GIT smetnje, raš i potencijalno fatalni kardiovaskularni događaji), paracetamola (hepatotoksičnost) i ceftriaksona (GIT smetnje, alergijske reakcije) (Martindale, 2011; Sawynok, 2011a; BNF 66, 2013) možemo zaključiti da se ona međusobno razlikuju i da se ne očekuje njihova adicija/potencijacija. Vezano za kombinaciju levetiracetam-koferin, izvesna neželjena dejstva se mogu potirati (pospanost izazvana levetiracetamom i budnost izazvanu kofeinom) (De Smedt i sar., 2007; Sawynok,

2011a). Sveukupno, može se očekivati bolja podnošljivost i veća bezbednost primene ispitivanih kombinacija u odnosu na odgovarajuće monoterapije.

### ***3.2. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelu visceralnog bola u miševa***

#### ***3.2.1. Sinergizam između levetiracetama i paracetamola***

U našoj studiji, levetiracetam (1-25 mg/kg; p.o.) i paracetamol (5-150 mg/kg; p.o.) izazvali su značajno smanjenje broja grčeva izazvanih rastvorom sirćetne kiseline u miševa (Slike 14 i 38). Levetiracetam i paracetamol ostvarili su sličnu efikasnost u testu grčeva (Slika 41A), koji reprezentuje visceralni model bola, s tim da je levetiracetam 8 puta potentniji analgetik (Tabela 9). Iako postoje ograničenja prilikom ekstrapolacije rezultata sa životinja na ljude, ovaj podatak bi eventualno mogao da ukaže na poredbenu efikasnost levetiracetama i paracetamola u terapiji visceralnog bola.

Levetiracetam i paracetamol primenjeni u kombinaciji, u odgovarajućim frakcijama srednjih efektivnih doza, ostvarili su značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u visceralnom modelu bola (Slika 40). Izoblografskom analizom okarakterisana je sinergistička interakcija između levetiracetama i paracetamola (Slika 41B, Tabela 9), uz 7-ostruko smanjenje doza pojedinačnih lekova primenjenih u kombinaciji u poređenju sa monoterapijskim dozama koje su ostvarile ekvi-analgetički efekat (6,03 mg/kg levetiracetama *per se* nasuprot 0,88 mg/kg kada je primenjen u kombinaciji i 48,43 mg/kg paracetamol *per se* nasuprot 7,13 mg/kg, kada je primenjen u kombinaciji). Interakcije levetiracetama sa analgeticima do sada nisu ispitivane. Nedavno je pokazano da oksakarbazepin ostvaruje sinergističku interakciju sa paracetamolom u istom modelu bola (Tomić i sar., 2010a), što je saglasno sa našim rezultatima. Miranda i sar. (2006) su zabeležili sinergističku interakciju između paracetamola i različitih NSAIL-a (diklofenak, ibuprofen, metamizol, meloksikam, nimesulid, parekoksib i dr.) u visceralnom modelu bola u miševa. Podatak o sinergizmu između paracetamola i NSAIL-a mogao bi da ukaže na eventualne razlike u njihovom mehanizmu antinociceptivnog dejstva, s obzirom da se supra-aditivna interakcija očekuje između lekova različitog mehanizma dejstva.

Test grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom se često koristi za ispitivanje visceralne nocicepcije i uticaja različitih tretmana na visceralnu hipersenzitivnost. Sirćetna kiselina ubrizgana intraperitonealno izaziva visceralnu hiperalgeziju koja nastaje smanjenjem praga okidanja receptora “visokog praga” i aktivacijom prethodno neosetljivih receptora, pod dejstvom oslobođenih PG i citokina (*periferna senzitivizacija*). Zbog ovoga dolazi do neuroplastičnih promena u smislu povećanog oslobađanja glutamata i citokina na nivou kičmene moždine (centralna senzitivizacija) (Deraedt i sar., 1980; Giamberardino, 1999; Le Bars, 2001). Pokazano je da paracetamol inhibira COX-2 na perifernom i centralnom nivou bolnog puta (Botting i Ayoub, 2005; Hinz i sar., 2008). Aktivacija descendentnih opioidergičkih i serotonergičkih mehanizama od strane paracetamola mogla bi da doprinese antinociceptivnom dejstvu paracetamola u testu grčeva (Bonfont i sar., 2003; Rezende i sar., 2008). Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama u visceralnom modelu bolu nije bio predmet naše studije. Međutim, na osnovu sličnosti između karageninske inflamacije i inflamacije izazvane sirćetnom kiselinom, mogli bismo da pretpostavimo da levetiracetam sličnim mehanizmima ostvaruje antinociceptivno dejstvo u visceralnom modelu bolu, kao i u somatskom modelu bola.

Na osnovu ranije izloženih podataka o mehanizmima/mestima analgetičkog dejstva levetiracetama i pretpostavljenog mehanizma analgetičkog dejstva paracetamola u modelu visceralnog bola, možemo pretpostaviti da su za sinergističku interakciju između levetiracetama i paracetamola u modelu visceralnog bola odgovorni višestruki i različiti mehanizmi dejstva, odnosno farmakodinamske interakcije. Kako je levetiracetam poznat po neuobičajeno povoljnim farmakokinetičkim osobinama (ne vezuje se za proteine plazme, ne metaboliše se u jetri), mogućnost za farmakokinetičke interakcije između levetiracetama i paracetamola je mala (Patsalos, 2004; De Smedt i sar., 2007).

Levetiracetam i paracetamol ostvarili su značajnu sinergističku interakciju, približno istog stepena, u eksperimentalnim modelima somatskog i visceralnog inflamatornog bola. Ovaj podatak može biti od značaja za kliničku praksu, s obzirom da mnoga inflamatorna bolna stanja uključuju i somatsku i visceralnu komponentu.

### 3.2.2. Sinergizam između levetiracetama i ceftriaksona

Ceftriakson (25-200 mg/kg/dan; i.p.) je nakon 7-dnevne primene ispoljio značajnu efikasnost u visceralnom modelu bola u miševa (Slika 39). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija u kojima je ceftriakson takođe ostvario antinociceptivno dejstvo u animalnim modelima visceralne nocicepcije (Lin i sar., 2011b; Yang i sar., 2011). U poređenju sa levetiracetamom zabeležena je slična efikasnost, s tim da je levetiracetam 12 puta potentniji lek u visceralnom modelu bola u miševa (Slika 43A, Tabela 10).

Primenjeni u kombinaciji levetiracetam (p.o.) i ceftriakson (i.p., 7-dnevni tretman) ispoljili su značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u visceralnom modelu bola u miševa (Slika 42). Izoblografskom analizom procenjeno je da levetiracetam i ceftriakson ostvaruju sinergističku interakciju, uz čak 17-ostruko smanjenje doza pojedinačnih lekova primenjenih u kombinaciji (6,03 mg/kg vs 0,35 mg/kg za levetiracetam primenjen *per se* vs u kombinaciji; 69,32 mg/kg vs 4,03 mg/kg za ceftriakson primenjen *per se* vs u kombinaciji) (Slika 43B; Tabela 10). Ovaj podatak bi možda mogao biti od značaja za tretman bolova visceralnog porekla u humanoj medicini. Interakcije levetiracetama sa standardnim i alternativnim analgeticima do sada nisu ispitivane, dok je ceftriakson ispitan u kombinaciji sa minociklinom, tetraciklinskim antibiotikom, u neuropatskom bolu u pacova, pri čemu je zabeležena potencijacija antinociceptivnog dejstva (Amin i sar., 2012).

Sinergističku interakciju između levetiracetama i ceftriaksona, u modelu visceralnog bola u miševa, možemo objasniti njihovim pretpostavljenim različitim mehanizmima antinociceptivnog dejstva, jer nismo ispitivali mehanizama antinociceptivnog dejstva ovih lekova u visceralnom modelu bola. Intraperitonealna injekcija sirćetne kiseline dovodi do oslobađanja PG (Deraedt i sar., 1980; Le Bars, 2001), citokina (TNF $\alpha$  i interleukini) (Ribeiro i sar., 2000) i glutamata (Giamberardino, 1999), što je praćeno razvojem periferne i centralne senzitivacije. Lin i sar. (2011b) su pokazali da ceftriakson (7-dnevni tretman) u modelu visceralne nocicepcije u miševa, dovodi do ushodne regulacije GLT-1 i smanjenja nivoa glutamata u sinapsi. S obzirom da je GLT-1 zastupljen i u centralnom i perifernom nervnom sistemu (Chen i sar., 2004; Carozzi i sar., 2008), možemo pretpostaviti da ceftriakson ostvaruje antinociceptivno dejstvo u testu grčeva smanjujući nivo ekscitatornog glutamata i na periferiji. Amin i sar. (2012) su pokazali da ceftriakson, nakon 7-dnevne primene, u doznom rasponu sličnom onom koji je korišćen u našoj

studiji, značajno smanjuje spinalne nivoe TNF $\alpha$  i interleukina, čime se dodatno može objasniti antinociceptivno dejstvo ceftriakona u modelu visceralnog bola u miševa.

Mehanizam analgetičkog dejstva levetiracetama ispitivan je samo od strane naše istraživačke grupe i to u modelu somatskog inflamatornog bola u pacova (karageninom-izazvana inflamacija). Pokazali smo da je analgetičko dejstvo levetiracetama posredovano, barem delimično, centralnim GABA<sub>A</sub>, centralnim i perifernim opioidergičkim, serotonergičkim,  $\alpha_2$ -adrenergičkim i adenzoskim A<sub>1</sub> receptorima u somatskom inflamatornom modelu bola. S obzirom da mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama u modelu visceralnog inflamatornog bola nije ispitivan, možemo samo pretpostaviti da su slični mehanizmi odgovorni za smanjenje visceralne nocicepcije, imajući u vidu sličnosti između ova dva modela inflamatornog bola (hemijski indukovana inflamacija, razvoj periferne i centralne senzitivacije).

Na bazi navedenog možemo zaključiti da farmakodinamske interakcije najverovatnije leže u osnovi sinergizma između levetiracetama i ceftriaksona. Farmakokinetičke interakcije između levetiracetama i ceftriaksona su manje verovatne, imajući u vidu izuzetno povoljan farmakokinetički profil levetiracetama (Patsalos, 2004; De Smedt i sar., 2007), ali se ne mogu sasvim isključiti.

Podatak o značajnom sinergizmu između levetiracetama i ceftriaksona u eksperimentalnim modelima somatskog i visceralnog inflamatornog bola može biti od značaja za kliničku praksu, s obzirom da mnoga inflamatorna bolna stanja uključuju i somatsku i visceralnu komponentu, npr, postoperativni bol, gde ceftriakson inače nalazi primenu u peri-operativnoj profilaksi i/ili terapiji postoperativnih infekcija.

### **3.2.3. Poređenje kombinacija levetiracetama sa paracetamolom i ceftriaksonom**

U ovoj studiji, ispitana su antinociceptivna dejstva kombinovane primene levetiracetama sa paracetamolom i ceftriaksonom u modelu visceralnog bola u miševa. Obe kombinacije ostvarile su značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo (Slike 40 i 42). Izoblografskom analizom ustanovljeno je da levetiracetam ostvaruje sinergističku interakciju sa paracetamolom i ceftriaksonom (Slike 41B i 42B; Tabele 9 i 10). Njihovo poređenje moguće je izvršiti na osnovu vrednosti indeksa interakcije ( $\gamma$ ) i prema stepenu redukcije doza lekova primenjenih u kombinaciju u odnosu na doze lekova primenjenih *per se* potrebnih za postizanje ekvi-

analgetičkog efekta. U tom smislu kombinacija levetiracetam-ceftriakson ostvarila je veći stepen sinergizma uz veću redukciju doza u odnosu na levetiracetam-paracetamol kombinaciju. Smanjenje doza lekova primenjenih u kombinaciji značajno je sa aspekta smanjenja incidence i intenziteta neželjenih dejstava. Uzevši u obzir profil neželjenih dejstava levetiracetama (pospanost, slabost, vrtoglavica), paracetamola (hepatotoksičnost) i ceftriaksona (GIT smetnje, alergijske reakcije) (Martindale, 2011; BNF 66, 2013) možemo zaključiti da se ona međusobno razlikuju i da se ne očekuje njihova adicija/potencijacija. Zbog svega navedenog, mogla bi se očekivati bolja podnošljivost i veća bezbednost primene ispitivanih kombinacija u odnosu na odgovarajuće monoterapije.

### ***3.3. Efekti kombinovane primene levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika u modelu dijabetesne neuropatije u miševa***

Bolna dijabetesna neuropatija javlja se u 16% pacijenata sa dijabetesom. Terapija bolne dijabetesne neuropatije podrazumeva simptomatsku terapiju bola, uz optimalnu kontrolu glikemije. U farmakoterapiji ove neuropatije primenjuju se različite grupe lekova: NSAIL-i (ibuprofen i paracetamol), antiepileptici (gabapentin, pregabalin), antidepresivi (duloksetin, amitriptilin), opioidi, antioksidansi (alfa-lipoinna kiselina) i topikalni agensi. Rezultati dobro dizajniranih kliničkih studija ukazuju da antiepileptici imaju veoma povoljan odnos korist/rizik u ovoj vrsti bola (Bril i sar, 2011). Često se u terapiji bolne dijabetesne neuropatije empirijski poseže za kombinacijom analgetika. Zbog toga smo u našem istraživanju ispitali efekte kombinovane primene levetiracetama, antiepileptika novijeg datuma, i lekova koji već nalaze primenu u terapiji bolne dijabetesne neuropatije. Eksperimentalni dokazi o efikasnosti izvesnih kombinacija analgetika mogu poslužiti kao osnova za njihovu potencijalnu kliničku primenu, a sve sa namerom da se unapredi terapija bolne dijabetesne neuropatije.

#### ***3.3.1. Sinergizam između levetiracetama i ibuprofena***

U modelu dijabetesne neuropatije u miševa, levetiracetam (10-100 mg/kg; p.o.) i ibuprofen (2-50 mg/kg; p.o.) ostvarili su značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo (Slike 15 i 44A). Levetiracetam i ibuprofen ispoljili su sličnu maksimalnu efikasnost (Slika

47A), s tim da je ibuprofen 3 puta jači lek od levetiracetama (Tabela 12). Njihove dužine trajanja dejstva približno su iste. Ovo je prvi dokaz efikasnosti ibuprofena u eksperimentalnom modelu dijabetesne neuropatije, dok je antinociceptivno dejstvo levetiracetama u modelu dijabetesne neuropatije u pacova (Ardid i sar., 2003) i miševa (Ozcan i sar., 2008) prethodno potvrđeno.

Levetiracetam i ibuprofen, primenjeni u odgovarajućim frakcijama  $ED_{50}$ , izazvali su značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u modelu dijabetesne neuropatije u miševa (Slika 46). Izoblografskom analizom procenjeno je da levetiracetam i ibuprofen ostvaruju sinergističku interakciju u ovom modelu bola, uz 15-ostruko smanjenje doza pojedinačnih lekova primenjenih u kombinaciji u poređenju sa onim dozama koje su u monoterapiji izazvale efekat istog stepena (25,33 mg/kg levetiracetama *per se* nasuprot 1,72 mg/kg kada se primeni u kombinaciji; 7,82 mg/kg ibuprofena *per se* nasuprot 0,53 mg/kg kada se primeni u kombinaciji) (Slika 47B; Tabela 12). Ovaj podatak može biti od značaja za terapiju bolne dijabetesne neuropatije.

Nije u potpunosti razjašnjeno na koji način streptozotocinom-izazvana hiperglikemija dovodi do razvoja bolne neuropatije u eksperimentalnih životinja. Predloženi su različiti mehanizmi: povećana aktivnost aldoza-reduktaze, protein kinaze C i COX-2, oksidativni stres, ekscitotoksičnost glutamata i dr. Kod životinja se bolna dijabetesna neuropatija može manifestovati kroz razvoj termičke i mehaničke hiperalgezije (u ranijim fazama bolesti, kasnije se obično javlja hipoalgezija) i mehaničke alodinije. Kako će se manifestovati neuropatija zavisi od vrste/soja eksperimentalne životinje, vremena koje je proteklo od indukcije dijabetesa, doze streptozotocina, nociceptivnog testa i dr.

Efikasnost ibuprofena, kao i mehanizam antinociceptivnog dejstva u animalnom modelu dijabetesne neuropatije nisu ispitani. Međutim, postoje podaci o antinociceptivnoj aktivnosti i mehanizmima dejstva ibuprofena u drugim animalnim modelima perifernog neuropatskog bola. Tako je pokazano da ibuprofen smanjuje razvoj mehaničke alodinije i termičke hiperalgezije u neuropatskom bolu nastalom podvezivanjem *n. ischiadicus*-a u pacova (Wang i sar., 2010). Autori su utvrdili da ibuprofen, kao inhibitor COX-1/2, smanjuje oslobađanje  $PGE_2$ , i da se na taj način može objasniti njegova efikasnost u neuropatskim bolnim stanjima, s obzirom da je povećano oslobađanje  $PGE_2$  nakon oštećenja nerava uključeno u patogenezu neuropatskog bola (Wang i sar., 2010). Na ovo su prethodno ukazali O'Rielly i Loomis (2006), posebno naglašavajući ulogu spinalnih prostaglandina u ranoj fazi razvoja neuropatskog bola u



eksperimentalnim uslovima. Dalje, ibuprofen je smanjio razvoj mehaničke alodinije i termičke hiperalgezije u neuropatskom bolu u pacova i nakon lokalne primene (u zadnju šapu) (Guindon i Beaulieu, 2006). Ovim mehanizmima ibuprofen, najverovatnije, ostvaruje antinociceptivno dejstvo i u modelu dijabetesne neuropatije u miševa.

Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama u neuropatskom bolu nije ispitivan. Pretpostavlja se da bi levetiracetam mogao da ostvari antinociceptivno dejstvo u neuropatskom bolu, selektivnom blokadom voltažno-zavisnih  $Ca^{2+}$  kanala N-tipa (Niespodziany i sar., 2001; Lukyanetz i sar., 2002), s obzirom da su ovi kanali značajni za razvoj neuropatskog bola (Saegusa i sar., 2001). U prilog ovome govori podatak da blokatori  $Ca^{2+}$  kanala N-tipa smanjuju hiperalgeziju u neuropatskom bolu (Yamamoto i Takahara, 2009; Kukkar i sar., 2013). Pored toga, antinociceptivni efekat levetiracetama u neuropatskim bolnim stanjima može biti posledica hiperpolarizacije ćelijskih membrana u zadnjim rogovima kičmene moždine, posredstvom  $K^+$  kanala (De Smedt i sar., 2007; Ozcan i sar., 20012).

Na osnovu izloženih podataka o mehanizmima kojima bi se moglo objasniti antinociceptivno dejstvo ibuprofena i levetiracetama u modelu dijabetesne neuropatije u miševa, može se konstatovati da su oni višestruki i međusobno različiti. Sinergizam između ova dva leka bi se mogao objasniti upravo njihovim različitim pretpostavljenim mehanizmima antinociceptivnog dejstva. Malo je verovatno da u potencijaciji antinociceptivnih efekata između levetiracetama i ibuprofena učestvuju i farmakokinetičke interakcije, imajući u vidu ograničen potencijal levetiracetama da stupa u interakcije sa drugim lekovima (Patsalos, 2004; De Smedt i sar., 2007). Naši rezultati ukazuju na približno istu dužinu trajanja dejstva pojedinačno primenjenih lekova i njihove kombinacije, dok se u slučaju farmakokinetičke potencijacije očekuje produženje dejstva kombinacije.

Sinergistička interakcija između levetiracetama i ibuprofena pokazana u ovoj studiji mogla bi biti od potencijalnog je kliničkog značaja za terapiju bolne dijabetesne neuropatije, jer se kombinovanom primenom analgetika može postići optimalna analgezija, uz smanjenje incidence i intenziteta neželjenih efekata.

### 3.3.2. Sinergizam između levetiracetama i paracetamola

U ovoj studiji, paracetamol (5-100 mg/kg; p.o.) je izazvao značajno i dozno-zavisno smanjenje hiperalgezije u dijabetičnih miševa, detektovane 3 nedelje nakon indukcije dijabetesa (Slika 44B). U poređenju sa levetiracetamom, paracetamol je ispoljio poredbenu efikasnost (Slika 49A) i dužinu trajanja dejstva, s tim da je 2 puta potentniji lek (Tabela 13) u dijabetesnoj neuropatiji u miševa.

Levetiracetam i paracetamol, primenjeni u odgovarajućim frakcijama pojedinačnih ED<sub>50</sub>, izazvali su značajan, dozno-zavisan antinociceptivni efekat u modelu dijabetesne neuropatije u miševa (Slika 48). Prema položaju teorijske i eksperimentalne ED<sub>50</sub> na odgovarajućem izobologramu (Slika 49B) i vrednostima indeksa interakcije (Tabela 13), možemo zaključiti da je između levetiracetama i paracetamola ostvarena sinergistička interakcija, uz čak 19-ostruko smanjenje doza lekova primenjenih u kombinaciji u odnosu na doze koje pri pojedinačnoj primeni izazivaju ekvi-analgetički efekat (25,33 mg/kg vs 1,37 mg/kg za levetiracetam primenjen *per se* vs u kombinaciji; 10,83 mg/kg vs 0,58 mg/kg za paracetamol primenjen *per se* vs u kombinaciji), što može imati klinički značaj. Interakcije levetiracetama u dijabetesnoj neuropatiji do sada nisu ispitivane. Što se tiče paracetamola, postoje ubedljivi dokazi o efikasnosti njegove kombinacije sa tramadolom u dijabetesnoj neuropatiji iz pretkliničkih (Gong i sar., 2011) i kliničkih studija (Ko i sar., 2010).

Kao što je prethodno navedeno, ukoliko dva leka ostvaruju analgetički efekat posredstvom različitih mehanizama dejstva i na različitim nivoima bolnog puta, vrlo je verovatno da će njihova kombinovana primena rezultirati sinergističkom interakcijom. Mehanizam analgetičkog dejstva paracetamola još uvek nije rasvetljen, mada su predloženi brojni mehanizmi. Postoje dokazi da je antinociceptivno dejstvo paracetamola u neuropatskom bolu posredovano centralnim (Hama i Sagen, 2010) i perifernim (Dani i sar., 2007) kanabinoidnim receptorima (najverovatnije CB(1) tipa). Ovaj podatak je delimično očekivan, imajući u vidu da se paracetamol metabolizmom (deacetilacijom i konjugacijom sa arahidonskom kiselinom) prevodi u aktivni metabolit koji aktivira kanabinoidne receptore i inhibira preuzimanje endokanabinoida (Dani i sar., 2007). Mehanizam antinociceptivnog dejstva paracetamola u neuropatskim modelima bola dalje nije ispitivan. Međutim, postoje podaci iz animalnih modela bola ne-neuropatske etiologije da je antinociceptivno dejstvo paracetamola posredovano

spinalnim 5-HT<sub>7</sub>, perifernim i spinalnim A<sub>1</sub> (Dogrul i sar., 2012; Liu i sar., 2013), supraspinalnim  $\mu$ -opioidergičkim receptorima (Sandrini i sar., 2007), inhibicijom spinalnih NMDA receptora (Björkman, 1995), kao i inhibicijom spinalnih NO-zavisnih mehanizama (Björkman, 1995). U kontekstu razumevanja brojnih mehanizama antinociceptivnog dejstva paracetamola, bilo bi zanimljivo citirati Dogrul i sar. (2012) koji su pretpostavili da paracetamol posredstvom supraspinalnog endogenog opioidnog i/ili kanabinoidnog sistema aktivira descendente serotonergičke puteve i spinalne 5-HT<sub>7</sub> receptore i na taj način ostvaruje antinociceptivno/antihiperalgezijsko dejstvo. Pretpostavku su izneli na bazi podataka da antagonisti spinalnih 5-HT<sub>7</sub> receptora inhibiraju antinociceptivne efekte opioida i kanabinoida (Dogrul i Seyrek, 2006; Dogrul i sar., 2012)

Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama u neuropatskom bolu nije ispitivan. Postoje pretpostavke da je antinociceptivno dejstvo levetiracetama u neuropatskom bolu posledica blokade voltažno-zavisnih Ca<sup>2+</sup> kanala N-tipa (Niespodziany i sar., 2001; Lukyanetz i sar., 2002), s obzirom da su ovi kanali značajni za razvoj neuropatskog bola (Saegusa i sar., 2001). U prilog ovome govori podatak da blokatori Ca<sup>2+</sup> kanala N-tipa smanjuju bolnu preosetljivost u neuropatskom bolu (Yamamoto i Takahara, 2009; Kukkar i sar., 2013). Dodatno, antinociceptivno dejstvo levetiracetama u neuropatskim bolnim stanjima može biti posredovano K<sup>+</sup> kanalima i posledičnom hiperpolarizacijom ćelijskih membrana spinalnih neurona (De Smedt i sar., 2007; Ozcan i sar., 2012).

Različiti i komplementarni mehanizmi/mesta dejstva levetiracetama i paracetamola korektno su objašnjenje sinergizma između ova dva leka u modelu dijabetesne neuropatije u miševa. Kako, farmakokinetičke interakcije nisu bile predmet naše studije, ne možemo ih isključiti.

### ***3.3.3. Sinergizam između levetiracetama i gabapentina***

U modelu dijabetesne neuropatije u miševa, gabapentin (2-40 mg/kg; p.o.) je ispoljio značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo (Slika 45A). Ukoliko uporedimo efikasnost, jačinu i dužinu trajanja dejstva levetiracetama i gabapentina, možemo uočiti sličnost po pitanju maksimalne efikasnosti i dužine trajanja dejstva, s tim da je gabapentin oko 6 puta potentniji lek od levetiracetama (Slika 51A; Tabela 14). Ovaj podatak bi mogao biti od kliničkog značaja, jer

ukazuje da bi levetiracetam mogao da bude terapijska alternativa gabapentinu u lečenju bolne dijabetesne neuropatije. Činjenica da je gabapentin jači lek (ostvaruje isti efekat u manjoj dozi) ne umanjuje terapijski potencijal levetiracetama.

Levetiracetam i gabapentin, primenjeni u odgovarajućim frakcijama  $ED_{50}$ , izazvali su značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u modelu dijabetesne neuropatije u miševa (Slika 50). Izoblografskom analizom procenjeno je da levetiracetam i gabapentin ostvaruju sinergističku interakciju u ovom modelu bola, uz čak 32-ostruko smanjenje doza pojedinačnih lekova primenjenih u kombinaciji u poređenju sa onim dozama koje su u monoterapiji izazvale efekat istog stepena (25,33 mg/kg levetiracetama *per se* nasuprot 0,78 mg/kg kada se primeni u kombinaciji; 4,47 mg/kg gabapentina *per se* nasuprot 0,14 mg/kg kada se primeni u kombinaciji) (Slika 51B; Tabela 14). Ovaj podatak može biti od značaja za terapiju bolne dijabetesne neuropatije, jer višestruko smanjenje doza pojedinačnih lekova primenjenih u kombinaciji, značajno povećava bezbednost primene kombinacije uz optimalnu analgeziju. Interakcije levetiracetama sa drugim analgeticima u eksperimentalnim modelima dijabetesne neuropatije do sada nisu ispitivane. S druge strane, gabapentin je ostvario sinergističku interakciju sa okskarbazepinom i aditivnu interakciju sa amitriptilinom u modelu dijabetesne neuropatije u miševa (Tomić i sar., 2010b). Zanimljivo je napomenuti da je interakcija levetiracetama i gabapentina ispitivana u modelu epilepsije u miševa i da je ostvaren sinergizam u antikonvulzivnom dejstvu (Dudra-Jastrzebska i sar., 2009).

Sinergistička interakcija između dva leka može se objasniti postojanjem farmakodinamskih i/ili farmakokinetičkih interakcija. U prilog farmakodinamskim interakcijama između levetiracetama i gabapentina idu različiti mehanizmi antinociceptivnog dejstva ovih antiepileptika. O mehanizmu antinociceptivnog dejstva gabapentina u neuropatskom bolu ima dosta podataka (Kukkar i sar., 2013), što je i očekivano, s obzirom na široku primenu u terapiji perifernog neuropatskog bola, između ostalog i dijabetesne neuropatije (BNF 66, 2013). Izgleda da je za antinociceptivno dejstvo gabapentina najznačajnija blokada voltažno-zavisnih  $Ca^{2+}$  kanala (T- i/ili N-tipa) na nivou kičmene moždine, jer je poznato da se visokim afinitetom vezuje za  $\alpha_2\delta-1$  subjedinicu ovih kanala (Taylor, 2009; Kukkar i sar., 2013). Postoje podaci o povećanoj ekspresiji i aktivnosti  $Ca^{2+}$  kanala T-tipa u dijabetesnoj neuropatiji, te da se smatraju odgovornim za povećanu ekscitabilnost senzornih neurona. Blokatori ovih kanala smanjuju mehaničku i termičku hiperosetljivost u modelu dijabetesne neuropatije u miševa (Latham i sar., 2009). Stoga,

moguće je da upravo ovaj mehanizam dejstva gabapentina učestvuje u smanjenju termičke hiperalgezije kod dijabetičnih miševa u našoj studiji. Pored toga, gabapentin ostvaruje antialodinijsko dejstvo u modelu dijabetesne neuropatije u pacova, barem delimično, smanjenjem aktivnosti mikroglijalnih ćelija na nivou kičmene moždine, čija se povećana aktivnost takođe dovodi u vezu sa razvojem dijabetesne neuropatije (Wodarski i sar., 2009). Dalje, pokazano je da kontinuirana primena gabapentina smanjuje mehaničku alodiniju i termičku hiperalgeziyu u modelu dijabetesne neuropatije u pacova, smanjenjem ekspresije Nav1.7 proteina (Na-kanali) na neuronima dorzalnog spinalnog ganglion, čija je ekscitabilnost povećana u dijabetesu zbog ushodne regulacija Nav1.7 proteina (Zhang i sar., 2013). Postoje dokazi da gabapentin moduliše aktivnost NMDA receptora, protein kinaze C i inflamatornih citokina, čime se dodatno može objasniti njegovo antinociceptivno dejstvo u dijabetesnoj neuropatiji (Kukkar i sar., 2013).

Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama u neuropatskom bolu nije ispitivan. Pretpostavlja se da bi levetiracetam mogao da ostvari antinociceptivno dejstvo u neuropatskom bolu, selektivnom blokadom voltažno-zavisnih  $Ca^{2+}$  kanala N-tipa, najverovatnije na centralnom nivou (Niespodziany i sar., 2001; Lukyanetz i sar., 2002), s obzirom da su ovi kanali značajni za razvoj neuropatskog bola (Saegusa i sar., 2001). U prilog ovome govori podatak da blokatori  $Ca^{2+}$  kanala N-tipa smanjuju hiperalgeziyu u neuropatskom bolu (Yamamoto i Takahara, 2009; Kukkar i sar., 2013). Pored toga, antinociceptivni efekat levetiracetama u neuropatskim bolnim stanjima može biti posledica hiperpolarizacije ćelijskih membrana u zadnjim rogovima kičmene moždine, posredstvom  $K^+$  kanala (De Smedt i sar., 2007; Ozcan i sar., 2012).

Na osnovu navedenog možemo zaključiti da je sinergizam između levetiracetama i gabapentina najverovatnije posledica njihove različite farmakodinamike. Farmakokinetičke interakcije se ne mogu isključiti, tim pre što su Dudra-Jastrzebska i sar. (2009) pokazali da levetiracetam povećava koncentraciju gabapentina u mozgu miševa sa epilepsijom, doduše samo pri jednom masenom odnosu (1:4 – gabapentin:levetiracetam). Analizom dužine trajanja dejstva nije došlo do produženja dejstva kombinaije lekova u odnosu na dužinu trajanja pojedinačno primenjenih lekova, što bi se moglo očekivati u slučaju farmakokinetičke potencijacije dejstva. Na kraju, u našoj studiji maseni odnos između gabapentina i levetiracetama bio je 5,67:1, što nije bio slučaj u eksperimentalnom protokolu gde je zabeležena farmakokinetička interakcija.

### 3.3.4. Sinergizam između levetiracetama i duloksetina

U ovoj studiji, duloksetin (1-30 mg/kg; p.o.) je ostvario značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo kod dijabetičnih miševa, u testu izmicanja repa pod uticajem toplote (Slika 45B). U poređenju sa levetiracetamom, duloksetin je ispoljio približno istu maksimalnu efikasnost (Slika 53A) i dužinu trajanja dejstva, s tim da je čak 14 puta potentniji lek (Tabela 15) u dijabetesnoj neuropatiji u miševa. Potentnost (jačina) leka nije parametar od većeg kliničkog značaja, jer ukazuje na količinu leka koju je potrebno primeniti za ostvarivanje terapijskog efekta, a ne i na moć analgetika da kupira bol. Zato podatak da je duloksetin jači lek, ne umanjuje potencijalni klinički značaj levetiracetama.

Kombinacija levetiracetama i duloksetina, primenjenih u odgovarajućim frakcijama pojedinačnih srednjih efektivnih doza, ostvarila je značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u modelu dijabetesne neuropatije u miševa (Slika 52). Prema položaju teorijske i eksperimentalne srednje efektivne doze kombinacije na izobologramu (Slika 53B) i vrednostima indeksa interakcije (Tabela 15), možemo zaključiti da je između levetiracetama i duloksetina ostvarena sinergistička interakcija, uz čak 18-ostruko smanjenje doza lekova primenjenih u kombinaciji u odnosu na doze koje pri pojedinačnoj primeni izazivaju ekvi-analgetički efekat (25,33 mg/kg vs 1,45 mg/kg za levetiracetam primenjen *per se* vs u kombinaciji; 1,75 mg/kg vs 0,10 mg/kg za duloksetin primenjen *per se* vs u kombinaciji), što može imati klinički značaj. Interakcije levetiracetama i duloksetina sa drugim analgeticima u eksperimentalnim modelima dijabetesne neuropatije do sada nisu ispitivane. Za duloksetin postoje podaci o sinergističkoj interakciji sa pregabalinom i morfinom u drugom modelu perifernog neuropatskog bola (Miyazaki i Yamamoto, 2012).

Na koji način će reagovati dva leka primenjena u kombinaciji, nije uvek jednostavno predvideti. Ukoliko dva leka ostvaruju isti efekat posredstvom različitih mehanizama/mesta dejstva, vrlo je verovatno da će njihova kombinovana primena rezultirati sinergističkom interakcijom. Upravo to je slučaj sa kombinacijom levetiracetam-duloksetin, koja je u modelu dijabetesne neuropatije u miševa ostvarila značajan stepen sinergizma. Kako bismo ovo potvrdili, analiziraćemo njihove mehanizme antinociceptivnog dejstva u modelima neuropatskog bola. Mehanizam antinociceptivnog dejstva duloksetina, inhibitora ponovnog preuzimanja serotonina i noradrenalina, u modelu neuropatskog bola (podvezivanje L5/L6 spinalnih nerava)

prvi put je ispitivan od strane Iyengar i sar. (2004). Oni su pokazali da duloksetin ostvaruje antialodinijsko dejstvo, potenciranjem serotonergičke i noradrenergičke inhibitorne neurotransmisije na centralnom nivou (Iyengar i sar., 2004), što je zajednički mehanizam antinociceptivnog dejstva antidepresiva (Micó i sar., 2006). Kasnije su stigli podaci o mehanizmima antinociceptivnog dejstva duloksetina u dijabetesnoj neuropatiji. Najpre su Kuhad i sar. (2009) utvrdili da duloksetin ostvaruje dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u modelu dijabetesne neuropatije u miševa, barem delimično, povećanjem cerebralnih nivoa adenzina. Kasnije je utvrđeno da duloksetin ispoljava antialodinijsko dejstvo u modelu dijabetesne neuropatije u pacova nakon sistemske i intratekalne primene, posredstvom spinalnih 5-HT<sub>2A</sub> receptora (Mixcoatl-Zecuatl i Jolival, 2011).

Iako mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama u neuropatskom bolu nije ispitivan, postoje pretpostavke da je njegovo antinociceptivno dejstvo u neuropatskom bolu posledica blokade voltažno-zavisnih Ca<sup>2+</sup>-kanala N-tipa, najverovatnije na centralnom nivou (Niespodziany i sar., 2001; Lukyanetz i sar., 2002), s obzirom da su ovi kanali značajni za razvoj neuropatskog bola (Saegusa i sar., 2001). S tim u vezi, pokazano je da blokatori Ca<sup>2+</sup>-kanala N-tipa smanjuju hiperalgeziju u neuropatskom bolu (Yamamoto i Takahara, 2009; Kukkar i sar., 2013). Antinociceptivno dejstvo levetiracetama u neuropatskim modelima bola može, takođe, biti posredovano K<sup>+</sup>-kanalima i posledičnom hiperpolarizacijom ćelijskih membrana spinalnih neurona (De Smedt i sar., 2007; Ozcan i sar., 2012).

Različitim i komplementarnim mehanizmima dejstva levetiracetama i duloksetina može se objasniti sinergizam između ova dva leka u modelu dijabetesne neuropatije u miševa. Farmakokinetičke interakcije nisu bile predmet naše studije, te ih ne možemo isključiti, ali nadovezujući se na prethodne analize kombinacija možemo kazati da su manje verovatne. Pritom je uzet u obzir izuzetno povoljan farmakokinetički profil levetiracetama (Patsalos, 2004; De Smedt i sar., 2007) i podatak da nije došlo do produženja dejstva ispitivane kombinacije, čak je došlo do skraćenja trajanja dejstva kombinacije u odnosu na dužinu trajanja dejstva duloksetina, što ne ide u prilog farmakokinetički posredovanoj potencijaciji dejstva.

### 3.3.5. Sinergizam između levetiracetama i alfa-lipoinske kiseline

U ovoj studiji, alfa-lipoinska kiselina (12,5-100 mg/kg/dan; p.o.) je ostvarila značajno antinociceptivno dejstvo u modelu dijabetesne neuropatije u miševa na dozno-zavisan način (Slika 45C). U poređenju sa levetiracetamom, alfa-lipoinska kiselina je ostvarila sličnu efikasnost (Slika 55A), jačinu (Tabela 16) i dužinu trajanja dejstva u dijabetesnoj neuropatiji u miševa. Ovaj podatak bi mogao da ima klinički značaj u smislu predstavljanja novih terapijskih rešenja za tretman bolne dijabetesne neuropatije.

Levetiracetam i alfa-lipoinska kiselina, primenjeni u odgovarajućim frakcijama pojedinačnih ED<sub>50</sub>, izazvali su značajan i dozno-zavisan antinociceptivni efekat u modelu dijabetesne neuropatije u miševa (Slika 54). Izoblografskom analizom procenjeno je da levetiracetam i alfa-lipoinska kiselina ostvaruju sinergističku interakciju u modelu dijabetesne neuropatije u miševa (Slika 55B; Tabela 16). Zabeleženo je 6-ostruko smanjenje doza lekova primenjenih u kombinaciji u odnosu na doze koje pri pojedinačnoj primeni izazivaju ekvivalentni efekat (25,33 mg/kg vs 4,42 mg/kg za levetiracetam primenjen *per se* vs u kombinaciji; 24,79 mg/kg vs 4,33 mg/kg za alfa-lipoinsku kiselinu primenjenu *per se* vs u kombinaciji), što može imati klinički značaj. Interakcije levetiracetama i alfa-lipoinske kiseline sa analgeticima u animalnim modelima neuropatskog bola do sada nisu ispitivane.

Nije jednostavno objasniti sinergizam između levetiracetama i alfa-lipoinske kiseline u dijabetesnoj neuropatiji, s obzirom da su njihovi mehanizmi antinociceptivnog dejstva samo delimično razjašnjeni. Alfa-lipoinska kiselina je supstanca sa antioksidativnim svojstvima koja se sintetiše u organizmu. Svojim antioksidativnim delovanjem poboljšava funkcionalnost perifernih nerava, čime se objašnjava njena primena u profilaksi i terapiji dijabetesne polineuropatije (SmPC; Alims, 2013; Registar lekova, 2013). Takođe, postoje literaturni podaci o analgetičkim svojstvima alfa-lipoinske kiseline. Ukoliko ovome dodamo i veliku bezbednost primene, može se zaključiti da alfa-lipoinska kiselina ima značajan potencijal u monoterapiji i kombinovanoj terapiji dijabetesne neuropatije. U prilog neuroprotektivnom dejstvu alfa-lipoinske kiseline govore rezultati sledećih studija. U radu Coppey i sar. (2003), pokazano je da alfa-lipoinska kiselina smanjuje formiranje superoksida i peroksinitrita u dijabetičnih pacova, čiji se nivo povećava nakon indukcije dijabetesa, izazivajući oštećenje epineuralnih arteriola *n. ischiadicus*-a. Dalje, alfa-lipoinska kiselina je ispoljila neuroprotektivno dejstvo u dijabetičnih



pacova inhibicijom oksidativnog stresa (povećava nivo glutationa i smanjuje stepen lipidne peroksidacije) i suprimiranjem reaktivne glioze (infiltracija mikroglijalnih ćelija, koje postaju hiperaktivne nakon indukcije dijabetesa) (Baydas i sar., 2004). Antinociceptivno dejstvo i mehanizmi antinociceptivnog dejstva alfa-lipoiinske kiseline bili su predmet istraživanja svega nekoliko studija. Najpre su Lee i sar. (2009) pokazali da alfa-lipoiinska kiselina ostvaruje efikasnost nakon jednokratne, lokalne primene u šapu pacova u akutnim nociceptivnim testovima. Ovo dejstvo je posledica selektivne inhibicije Ca(V)<sub>3.2</sub> T-tipa i njima posredovane hiperekscitabilnosti senzornih neurona (Lee i sar., 2009). Potom su Morgado i sar. (2011) pokazali da primena alfa-lipoiinske kiseline (100 mg/kg/dan; i.p.; 14 dana) kod dijabetičnih pacova smanjuje neuralnu hiperaktivnost na spinalnom nivou. Ovaj efekat je, barem delimično, posredovan KCC2 transporterima (eng. *potassium chloride co-transporter 2*) (Morgado i sar., 2011) koji održavaju nisku koncentraciju Cl<sup>-</sup> jona u ćeliji, što je neophodno za inhibitornu GABAergičku i glicinergičku neurotransmisiju (Acton i sar., 2012).

Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama u neuropatskom bolu nije ispitivan. Iznete su pretpostavke da bi antinociceptivno dejstvo levetiracetama u neuropatskom bolu moglo biti posledica blokade voltažno-zavisnih Ca<sup>2+</sup>-kanala N-tipa (Niespodziany i sar., 2001; Lukyanetz i sar., 2002). Ovi kanali značajni su za razvoj neuropatskog bola (Saegusa i sar., 2001), a blokatori ovih kanala smanjuju bolnu preosetljivost u neuropatskom bolu (Yamamoto i Takahara, 2009; Kukkar i sar., 2013). Antinociceptivno dejstvo levetiracetama u neuropatskim bolnim stanjima može biti posredovano K<sup>+</sup>-kanalima i posledičnom hiperpolarizacijom ćelijskih membrana spinalnih neurona (De Smedt i sar., 2007; Ozcan i sar., 2012).

Na kraju možemo zaključiti da, različiti i komplementarni mehanizmi/mesta dejstva levetiracetama i alfa-lipoiinske kiseline najverovatnije leže u osnovi sinergizma između ova dva leka u modelu dijabetesne neuropatije u miševa. Farmakokinetičke interakcije nisu bile predmet naše studije, te se ne mogu isključiti.

### 3.3.6. Poređenje kombinacija levetiracetama sa ibuprofenom, paracetamolom, gabapentinom, duloksetinom i alfa-lipoinskom kiselinom

U ovoj studiji, ispitana su antinociceptivna dejstva kombinovane primene levetiracetama i ibuprofena/paracetamola/gabapentina/duloksetina/alfa-lipoiniske kiseline u modelu dijabetesne neuropatije u miševa. Sve kombinacije ostvarile su značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo (Slike 46, 48, 50, 52 i 54). Izoblografskom analizom je procenjeno da levetiracetam ostvaruje sinergističku interakciju sa svim ispitivanim lekovima (Slike 47B, 49B, 51B, 53B i 55B; Tabele 12-16). Njihovo poređenje moguće je izvršiti na osnovu vrednosti indeksa interakcije ( $\gamma$ ) i prema stepenu redukcije doza lekova primenjenih u kombinaciju u odnosu na doze lekova primenjenih *per se* potrebnih za postizanje ekvi-analgetičkog efekta. Prema navedenim kriterijumima ispitivane interakcije mogu se rangirati na sledeći način: levetiracetam-gabapentin > levetiracetam-paracetamol = levetiracetam-duloksetin > levetiracetam-ibuprofen > levetiracetam-alfa-lipoiniska kiselina. Ovaj podatak praktično znači da je najveća redukcija doza postignuta u kombinaciji levetiracetam-gabapentin, a najmanja u kombinaciji levetiracetam-alfa-lipoiniska. Smanjenje doza lekova primenjenih u kombinaciji značajno je sa aspekta smanjenja incidence i intenziteta neželjenih dejstava. Osvrtom na profil neželjenih dejstava levetiracetama (pospanost, slabost, vrtoglavica), ibuprofena (GIT smetnje, krvarenje, oštećenje bubrega), paracetamola (hepatotoksičnost), gabapentina (gastrointestinalne smetnje, porast telesne mase, vrtoglavica), duloksetina (GIT smetnje, suva usta, palpitacije, insomnija) i alfa-lipoiniske kiseline (retka pojava neželjenih dejstava) (Martindale, 2011; BNF 66, 2013; Registar lekova, 2013) možemo uvideti da se ona delimično razlikuju, te da ne postoji mogućnost njihove adicije/potencijacije. Međutim, kada se uzme u obzir višestruko (6-32 puta) smanjenje doza pri kombinovanoj primeni levetiracetama i ibuprofena, paracetamola, gabapentina, duloksetina i alfa-lipoiniske kiseline, možemo očekivati bolju podnošljivost i veću bezbednost primene ispitivanih kombinacija u odnosu na odgovarajuće monoterapije.

#### 4. Bezbednost primene levetiracetama

Bezbednost primene levetiracetama ispitana je u rotarod testu u pacova i miševa. Ovaj test je izveden sa namerom da se utvrdi da li antinociceptivne doze levetiracetama narušavaju motornu spretnost eksperimentalnih životinja. Naši rezultati ukazuju da levetiracetam, primenjen u najvećim ispitivanim dozama, ne narušava motornu spretnost eksperimentalnih životinja, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su takođe ukazali na dobar bezbednosni profil levetiracetama:

- TD<sub>50</sub> za pacove 1060 mg/kg (Klitgaard i sar., 1998), što je oko 38 puta veća doza od srednje efektivne doze levetiracetama u somatskom inflamatornom modelu bola u pacova
- TD<sub>50</sub> za miševe iznosi 1600 mg/kg (Luszczki i sar., 2005), što je oko 267 odnosno 63 puta veća doza od srednje efektivne doze levetiracetama u neuropatskom i visceralnom modelu bola u miševa, redom.

Na osnovu naših eksperimentalnih rezultata i raspoloživih literaturnih podataka, možemo zaključiti da je levetiracetam bezbedan za primenu u dozama u kojima ispoljava antinociceptivno dejstvo.

## VI ZAKLJUČCI

### Antinociceptivno dejstvo levetiracetama u eksperimentalnim modelima bola

- U modelu somatskog inflamatornog bola u pacova, levetiracetam je ostvario dozno-zavisno antihiperalgezijsko dejstvo nakon sistemske i lokalne periferne primene. Ovaj podatak ukazuje da levetiracetam može biti efikasan u terapiji inflamatornih bolnih stanja, kao i da se u tu svrhu može primenjivati sistemski, ali i lokalno. Lokalna primena lekova omogućava dopremanje optimalne koncentracije leka na mestu gde nastaje bol, uz minimiziranje pojave neželjenih efekata i interakcija lekova.
- U modelu visceralnog bola u miševa, levetiracetam je ispoljio značajno antinociceptivno dejstvo na dozno-zavisan način. Ovaj podatak ukazuje da levetiracetam može biti potencijalno efikasan u terapiji visceralnih bolova. Podatak da levetiracetam ostvaruje efikasnost u somatskom i visceralnom inflamatornom modelu bola je od kliničkog značaja, s obzirom da mnoga inflamatorna bolna stanja uključuju i somatsku i visceralnu komponentu.
- Levetiracetam je ostvario efikasnost u neuropatskom modelu bola u miševa, u dijabetesnoj neuropatiji. Ovaj podatak ukazuje na potencijalnu primenu levetiracetama u terapiji bolne dijabetesne neuropatije.

### Mehanizam antinociceptivnog dejstva levetiracetama

- Levetiracetam ostvaruje antinociceptivno dejstvo u modelu somatskog inflamatornog bola u pacova posredstvom centralnih GABA<sub>A</sub>, centralnih i perifernih  $\mu$ -opioidergičkih,  $\alpha_{2A/C}$ -adrenergičkih, 5-HT<sub>1B/1D</sub> i adenozijskih A<sub>1</sub> receptora.
- Levetiracetam stupa u interakciju sa navedenim receptorima najverovatnije indirektno, s obzirom da su *in vitro* istraživanja pokazala da se levetiracetam ne vezuje za uobičajena ciljna mesta vezivanja antiepileptika.

### Interakcije levetiracetama i standardnih/alternativnih analgetika

- Kombinovana primena levetiracetama sa ibuprofenom, celekoksibom, paracetamolom, ceftriaksonom i kofeinom ostvarila je sinergizam u antinociceptivnom dejstvu u somatskom inflamatornom modelu bola u pacova. Prema stepenu sinergizma, kombinacije se mogu rangirati na sledeći način: levetiracetam-ibuprofen = levetiracetam-koferin > levetiracetam-ceftriakson > levetiracetam-celekoksib > levetiracetam-paracetamol. Sinergizam između lekova je najverovatnije posledica farmakodinamskih interakcija, tj. različitih i komplementarnih mehanizama/mestima dejstva lekova. Podatak o značajnom sinergizmu između ispitivanih lekova može biti od kliničkog značaja, jer se redukcijom doza pri kombinovanoj primeni postiže smanjenje incidence i intenziteta neželjenih efekata, uz postizanje optimalne analgezije.
- Levetiracetam ostvaruje sinergističku interakciju sa paracetamolom/ceftriaksonom u visceralnom modelu bola u miševa. Kombinacija levetiracetam-ceftriakson ostvarila je veći stepen sinergizma uz veću redukciju doza u odnosu na levetiracetam-paracetamol. Supra-aditivna interakcija između levetiracetama i paracetamola/ceftriaksona je najverovatnije rezultat različite farmakodinamike, odnosno različitih mehanizama/mesta dejstva lekova. Ovaj podatak može imati klinički značaj, jer se značajnom redukcijom doza pri kombinovanoj primeni, mogu umanjiti neželjeni efekti, uz postizanje optimalne analgezije.
- Kao rezultat kombinovane primene levetiracetama sa ibuprofenom, paracetamolom, gabapentinom, duloksetinom i alfa-lipoinskom kiselinom, u modelu dijabetesne neuropatije u miševa, ostvaren je sinergizam u antinociceptivnom dejstvu. Prema stepenu sinergizma kombinacije se mogu rangirati na sledeći način: levetiracetam-gabapentin > levetiracetam-paracetamol = levetiracetam-duloksetin > levetiracetam-ibuprofen > levetiracetam-alfa-lipoinska kiselina. Sinergistička interakcija između ovih lekova je najverovatnije rezultat farmakodinamske interakcije tj., posledica je različitih mehanizama antinociceptivnog dejstva pojedinačnih lekova koji se međusobno dopunjuju. Podatak o sinergističkoj interakciji između levetiracetama i ibuprofena/paracetamola/gabapentina/duloksetina/alfa-lipoinске kiseline može imati

klinički značaj u terapiji bolne dijabetesne neuropatije, jer se značajnom redukcijom doza pri kombinovanoj primeni, mogu umanjiti neželjeni efekti, uz postizanje optimalne analgezije.

### **Bezbednost primene levetiracetama**

- Antinociceptivne doze levetiracetama ne narušavaju motornu spretnost eksperimentalnih životinja u rotarod testu, te možemo zaključiti da je levetiracetam bezbedan za primenu u dozama u kojima ispoljava antinociceptivno dejstvo.

---

**VII LITERATURA**

1. Acton BA, Mahadevan V, Mercado A, Uvarov P, Ding Y, Pressey J, Airaksinen MS, Mount DB, Woodin MA. Hyperpolarizing GABAergic transmission requires the KCC2 C-terminal ISO domain. *J Neurosci* 2012; 32: 8746-51.
2. Agrawal RP, Goswami J, Jain S, Kochar DK. Management of diabetic neuropathy by sodium valproate and glyceryl trinitrate spray: a prospective double-blind randomized placebo-controlled study. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 83: 371-8.
3. Aley KO, Levine JD. Multiple receptors involved in peripheral alpha 2, mu, and A1 antinociception, tolerance, and withdrawal. *J Neurosci* 1997; 17: 735-44.
4. ALIMS, SmPC za alfa-lipoinsku kiselinu:  
<http://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpc/515-01-4586-11-001.pdf>
5. Amin B, Hajhashemi V, Hosseinzadeh H, Abnous Kh. Antinociceptive evaluation of ceftriaxone and minocycline alone and in combination in a neuropathic pain model in rat. *Neuroscience* 2012; 224: 15-25.
6. Aoki M, Tsuji M, Takeda H, Harada Y, Nohara J, Matsumiya T, Chiba H. Antidepressants enhance the antinociceptive effects of carbamazepine in the acetic acid-induced writhing test in mice. *Eur J Pharmacol* 2006; 550: 78-83.
7. Archer DP, Lamberty Y, Wang B, Davis MJ, Samanani N, Roth SH. Levetiracetam reduces anesthetic-induced hyperalgesia in rats. *Anesth Analg* 2007; 104: 180-185.
8. Ardid D, Lamberty Y, Alloui A, Coudore-Civiale MA, Klitgaard H, Eschalier A. Antihyperalgesic effect of levetiracetam in neuropathic pain models in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 473: 27-33.
9. Ashrafi MR, Shabani R, Zamani GR, Mahfelati F. Sodium Valproate versus Propranolol in paediatric migraine prophylaxis. *Eur J Paediatr Neurol* 2005; 9: 333-8.
10. Backonja MM. Use of anticonvulsants for treatment of neuropathic pain. *Neurology* 2002; 59(5 Suppl 2): S14-7.
11. Bair MJ, Sanderson TR. Coanalgesics for chronic pain therapy: a narrative review. *Postgrad Med* 2011; 123: 140-50.

12. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 2012; 211: 39-50.
13. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D: Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009; 139:267-84.
14. Baydas G, Donder E, Kiliboz M, Sonkaya E, Tuzcu M, Yasar A, Nedzvetskii VS. Neuroprotection by alpha-lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes. *Biochemistry (Mosc)* 2004; 69: 1001-5.
15. Berrocoso E, Mico JA. In vivo effect of venlafaxine on locus coeruleus neurons: role of opioid, alpha(2)-adrenergic, and 5-hydroxytryptamine(1A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322: 101-7.
16. Bianchi M, Martucci C, Ferrario P, Franchi S, Sacerdote P. Increased tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2 concentrations in the cerebrospinal fluid of rats with inflammatory hyperalgesia: the effects of analgesic drugs. *Anesth Analg* 2007; 104: 949-54.
17. Birse F, Derry S, Moore RA. Phenytoin for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 5:CD009485.
18. Bingham S, Davey PT, Sammons M, Raval P, Overend P, Parsons AA. Inhibition of inflammation-induced thermal hypersensitivity by sumatriptan through activation of 5-HT(1B/1D) receptors. *Exp Neurol* 2001; 167: 65-73.
19. Björkman R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1995; 103: 1-44.
20. Bone M, Critchley P, Buggy DJ. Gabapentin in postamputation phantom limb pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Reg Anesth Pain Med* 2002; 27: 481-6.
21. Bonnefont J, Alloui A, Chapuy E, Clottes E, Eschalier A. Orally administered paracetamol does not act locally in the rat formalin test: evidence for a supraspinal, serotonin-dependent antinociceptive mechanism. *Anesthesiology* 2003; 99: 976-81.
22. Botting R, Ayoub SS. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 72: 85-7.



23. Brighina F, Palermo A, Aloisio A, Francolini M, Giglia G, Fierro B. Levetiracetam in the prophylaxis of migraine with aura: a 6-month open-label study. *Clin Neuropharmacol* 2006; 29: 338-42.
24. Bril V, England J, Franklin GM, Backonja M, Cohen J, Del Toro D, Feldman E, Iverson DJ, Perkins B, Russell JW, Zochodne D. Evidence-based guideline: Treatment of painful diabetic neuropathy: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 2011; 76: 1758-65.
25. British National Formulary (BNF), Number 66. London: British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 2013.
26. Burnstock G, Sawynok J. Adenosine Triphosphate and Adenosine Receptors and Pain. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, eds. *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press, 2010: 303-327.
27. Buzzi MG, Carter WB, Shimizu T, Heath H 3rd., Moskowitz MA. Dihydroergotamine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neuropharmacology* 1991; 30: 1193-200.
28. Campbell FG, Graham JG, Zilkha KJ. Clinical trial of carbamazepine (tegretol) in trigeminal neuralgia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1966; 29: 265-7.
29. Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci Lett* 1995; 197: 25-8.
30. Carlton SM, Zhou S, Coggeshall RE. Peripheral GABA(A) receptors: evidence for peripheral primary afferent depolarization. *Neuroscience* 1999; 93: 713-22.
31. Carlton SM. Peripheral excitatory amino acids. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 52-6.
32. Carozzi VA, Canta A, Oggioni N, Ceresa C, Marmioli P, Konvalinka J, Zoia C, Bossi M, Ferrarese C, Tredici G, Cavaletti G: Expression and distribution of 'high affinity' glutamate transporters GLT1, GLAST, EAAC1 and of GCPII in the rat peripheral nervous system. *J Anat* 2008; 213: 539-46.
33. Chen SR, Pan HM, Richardson TE, Pan HL. Potentiation of spinal alpha(2)-adrenoceptor analgesia in rats deficient in TRPV1-expressing afferent neurons. *Neuropharmacology* 2007; 52: 1624-30.

34. Chen W, Mahadomrongkul V, Berger UV, Bassan M, DeSilva T, Tanaka K, Irwin N, Aoki C, Rosenberg PA. The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci* 2004; 24: 1136-48.
35. Cho JR, Koo DL, Joo EY, Yoon SM, Ju E, Lee J, Kim DY, Hong SB. Effect of levetiracetam monotherapy on background EEG activity and cognition in drug-naïve epilepsy patients. *Clin Neurophysiol* 2012; 123: 883-91.
36. Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Yorek MA. Preventing superoxide formation in epineurial arterioles of the sciatic nerve from diabetic rats restores endothelium-dependent vasodilation. *Free Radic Res* 2003; 37: 33-40.
37. Crofford LJ, Rowbotham MC, Mease PJ, Russell IJ, Dworkin RH, Corbin AE, Young JP Jr, LaMoreaux LK, Martin SA, Sharma U; Pregabalin 1008-105 Study Group. Pregabalin for the treatment of fibromyalgia syndrome: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1264-73.
38. Dani M, Guindon J, Lambert C, Beaulieu P. The local antinociceptive effects of paracetamol in neuropathic pain are mediated by cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol* 2007; 573: 214-5.
39. De Smedt T, Raedt R, Vonck K, Boon P. Levetiracetam: the profile of a novel anticonvulsant drug-part I: preclinical data. *CNS Drug Rev* 2007; 13: 43-56.
40. Deraedt R, Jouquey S, Delevallée F, Flahaut M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *Eur J Pharmacol* 1980; 61: 17-24.
41. Diener HC, Tfelt-Hansen P, Dahlöf C, Láinez MJ, Sandrini G, Wang SJ, Neto W, Vijapurkar U, Doyle A, Jacobs D; MIGR-003 Study Group. Topiramate in migraine prophylaxis--results from a placebo-controlled trial with propranolol as an active control. *J Neurol* 2004; 251: 943-50.
42. Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL. Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 1031-8.
43. Dogrul A, Seyrek M. Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT7, but not 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the spinal cord. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 498-505.

44. Dogrul A, Seyrek M, Akgul EO, Cayci T, Kahraman S, Bolay H. Systemic paracetamol-induced analgesic and antihyperalgesic effects through activation of descendingserotonergic pathways involving spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 2012; 677: 93-101.
45. Dudra-Jastrzebska M, Andres-Mach MM, Sielski M, Ratnaraj N, Patsalos PN, Czuczwar SJ, Luszczki JJ. Pharmacodynamic and pharmacokinetic interaction profiles of levetiracetam in combination with gabapentin, tiagabine and vigabatrin in the mouse pentylenetetrazole-induced seizure model: an isobolographic analysis. *Eur J Pharmacol* 2009; 605: 87-94.
46. Eisenberg E, Lurie Y, Braker C, Daoud D, Ishay A. Lamotrigine reduces painful diabetic neuropathy: a randomized, controlled study. *Neurology* 2001; 57: 505-9.
47. Falah M, Madsen C, Holbech JV, Sindrup SH. A randomized, placebo-controlled trial of levetiracetam in central pain in multiple sclerosis. *Eur J Pain* 2012; 16: 860-9.
48. Feng Y, Cui M, Willis WD. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology* 2003; 98: 729-33.
49. Fiebich BL, Lieb K, Hüll M, Aicher B, van Ryn J, Pairet M, Engelhardt G. Effects of caffeine and paracetamol alone or in combination with acetylsalicylic acid on prostaglandin E(2) synthesis in rat microglial cells. *Neuropharmacology* 2000; 39: 2205-2213.
50. Finnegan TF, Li DP, Chen SR, Pan HL. Activation of mu-opioid receptors inhibits synaptic inputs to spinally projecting rostral ventromedial medulla neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309: 476-83.
51. Francischi JN, Chaves CT, Moura AC, Lima AS, Rocha OA, Ferreira-Alves DL, Bakhle YS: Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 837-44.
52. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 83-133.
53. Gangadharan V, Agarwal N, Brugger S, Tegeder I, Bettler B, Kuner R, Kurejova M. Conditional gene deletion reveals functional redundancy of GABAB receptors in peripheral nociceptors in vivo. *Mol Pain* 2009; 5: 68.
54. Giamberardino MA. Recent and forgotten aspects of visceral pain. *Eur J Pain* 1999; 3: 77-92.

- 
55. Gilron I, Max MB. Combination pharmacotherapy for neuropathic pain: current evidence and future directions. *Expert Rev Neurother* 2005; 5: 823-30.
  56. Gong L, Thorn CF, Bertagnolli MM, Grosser T, Altman RB, Klein TE. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22: 310-8.
  57. Gong YH, Yu XR, Liu HL, Yang N, Zuo PP, Huang YG. Antinociceptive effects of combination of tramadol and acetaminophen on painful diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 2011; 49: 16-20.
  58. Gower AJ, Noyer M, Verloes R, Gobert J, Wülfert E. ucb L059, a novel anticonvulsant drug: pharmacological profile in animals. *Eur J Pharmacol* 1992; 222: 193-203.
  59. Granados-Soto V, Argüelles CF, Rocha-González HI, Godínez-Chaparro B, Flores-Murrieta FJ, Villalón CM. The role of peripheral 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> and 5-HT<sub>1F</sub> serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience* 2010; 165: 561-568.
  60. Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G. A review of the pharmacokinetic and pharmacodynamic factors in the potentiation of the antinociceptive effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by caffeine. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1999; 42: 67-72.
  61. Gray AM, Spencer PS, Sewell RD. The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 669-74.
  62. Grosser T, Smyth EM, FitzGerald GA. Anti-inflammatory, Antipyretic, and Analgesic Agents; Pharmacotherapy of Gout. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, eds. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12th edition. New York, Chicago, San Francisco: The McGraw-Hill Companies, 2011: 959-1004.
  63. Guindon J, Beaulieu P. Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2006; 50: 814-23.
  64. Hahm TS, Ahn HJ, Ryu S, Gwak MS, Choi SJ, Kim JK, Yu JM. Combined carbamazepine and pregabalin therapy in a rat model of neuropathic pain. *Br J Anaesth* 2012; 109: 968-74.

- 
65. Hahn K, Arendt G, Braun JS, von Giesen HJ, Husstedt IW, Maschke M, Straube ME, Schielke E; German Neuro-AIDS Working Group. A placebo-controlled trial of gabapentin for painful HIV-associated sensory neuropathies. *J Neurol* 2004; 251: 1260-6.
  66. Hama AT, Sagen J. Cannabinoid receptor-mediated antinociception with acetaminophen drug combinations in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Neuropharmacology* 2010; 58: 758-66.
  67. Hinz B, Cheremina O, Brune K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. *FASEB J* 2008; 22: 383-390.
  68. Holbeck JV, Otto M, Bach FW, Jensen TS, Sindrup SH. The anticonvulsant levetiracetam for the treatment of pain in polyneuropathy: a randomized, placebo-controlled, cross-over trial. *Eur J Pain* 2011; 15: 608-14.
  69. Hu Y, Li W, Lu L, Cai J, Xian X, Zhang M, Li Q, Li L. An anti-nociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. *Pain* 2010; 148: 284-301.
  70. Hurley RW, Chatterjea D, Rose Feng M, Taylor CP, Hammond DL. Gabapentin and pregabalin can interact synergistically with naproxen to produce antihyperalgesia. *Anesthesiology* 2002; 97: 1263-73.
  71. Hussey MJ, Clarke GD, Ledent C, Hourani SM, Kitchen I. Reduced response to the formalin test and lowered spinal NMDA glutamate receptor binding in adenosine A2A receptor knockout mice. *Pain* 2007; 129: 287-94.
  72. Ivanović Lj. ur. Registar lekova 2013. Beograd; BB Soft, 2013.
  73. Iyengar S, Webster AA, Hemrick-Luecke SK, Xu JY, Simmons RM. Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor in persistent pain models in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 576-84.
  74. Jänig W, Levine JD, Michaelis M. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res* 1996; 113: 161-84.
  75. Jasmin L, Rabkin SD, Granato A, Boudah A, Ohara PT. Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. *Nature* 2003; 424: 316-320.
  76. Jia H, Xie YF, Xiao DQ, Tang JS. Involvement of GABAergic modulation of the nucleus submedius (Sm) morphine-induced antinociception. *Pain* 2004; 108: 28-35.
  77. Johannessen Landmark C. Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders: relations between mechanisms of action and clinical efficacy. *CNS Drugs* 2008; 22: 27-47.

- 
78. Jorns TP, Johnston A, Zakrzewska JM. Pilot study to evaluate the efficacy and tolerability of levetiracetam (Keppra) in treatment of patients with trigeminal neuralgia. *Eur J Neurol* 2009; 16: 740-744.
  79. Jungehulsing GJ, Israel H, Safar N, Taskin B, Nolte CH, Brunecker P, Wernecke KD, Villringer A. Levetiracetam in patients with central neuropathic post-stroke pain - a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Neurol* 2013; 20: 331-7.
  80. Kaminski RM, Gillard M, Klitgaard H. Targeting SV2A for Discovery of Antiepileptic Drugs. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, eds. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012
  81. Kayser V, Bourgoin S, Viguier F, Michot B, Michel Hamon M. Toward Deciphering the Respective Roles of Multiple 5-HT Receptors in the Complex Serotonin-Mediated Control of Pain. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, eds. *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press, 2010: 185-207.
  82. Keil GJ 2nd, Delander GE. Time-dependent antinociceptive interactions between opioids and nucleoside transport inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 1387-92.
  83. Kesim M, Duman EN, Kadioglu M, Yaris E, Kalyoncu NI, Erciyes N. The different roles of 5-HT(2) and 5-HT(3) receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice. *J Pharmacol Sci* 2005; 97: 61-6.
  84. Khalefa BI, Shaqura M, Al-Khrasani M, Fürst S, Mousa SA, Schäfer M. Relative contributions of peripheral versus supraspinal or spinal opioid receptors to the antinociception of systemic opioids. *Eur J Pain* 2012; 16: 690-705.
  85. Kimura M, Obata H, Saito S. Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain. *Anesth Analg* 2012; 115: 443-9.
  86. Klitgaard H, Matagne A, Gobert J, Wülfert E. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur J Pharmacol* 1998; 353: 191-206.
  87. Ko SH, Kwon HS, Yu JM, Baik SH, Park IB, Lee JH, Ko KS, Noh JH, Kim DS, Kim CH, Mok JO, Park TS, Son HS, Cha BY. Comparison of the efficacy and safety of tramadol/acetaminophen combination therapy and gabapentin in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Diabet Med* 2010; 27: 1033-40.

- 
88. Kochar DK, Garg P, Bumb RA, Kochar SK, Mehta RD, Beniwal R, Rawat N. Divalproex sodium in the management of post-herpetic neuralgia: a randomized double-blind placebo-controlled study. *QJM* 2005; 98: 29-34.
  89. Kuhad A, Bishnoi M, Chopra K. Anti-nociceptive effect of duloxetine in mouse model of diabetic neuropathic pain. *Indian J Exp Biol* 2009; 47: 193-7.
  90. Kukkar A, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. *Arch Pharm Res* 2013; 36: 237-51.
  91. Lampl C, Katsarava Z, Diener HC, Limmroth V. Lamotrigine reduces migraine aura and migraine attacks in patients with migraine with aura. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1730-2.
  92. Latham JR, Pathirathna S, Jagodic MM, Choe WJ, Levin ME, Nelson MT, Lee WY, Krishnan K, Covey DF, Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V. Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes* 2009; 58: 2656-65.
  93. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 597-652.
  94. Lee WY, Orestes P, Latham J, Naik AK, Nelson MT, Vitko I, Perez-Reyes E, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. Molecular mechanisms of lipoic acid modulation of T-type calcium channels in pain pathway. *J Neurosci* 2009; 29: 9500-9.
  95. Leijon G, Boivie J. Central post-stroke pain--a controlled trial of amitriptyline and carbamazepine. *Pain* 1989; 36: 27-36.
  96. Lesser H, Sharma U, LaMoreaux L, Poole RM. Pregabalin relieves symptoms of painful diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. *Neurology* 2004; 63: 2104-10.
  97. Lin Y, Tian G, Roman K, Handy C, Travers JB, Lin CL, Stephens RL Jr. Increased glial glutamate transporter EAAT2 expression reduces visceral nociceptive response in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G129-34.
  98. Lin SY, Chang WJ, Lin CS, Huang CY, Wang HF, Sun WH. Serotonin receptor 5-HT<sub>2B</sub> mediates serotonin-induced mechanical hyperalgesia. *J Neurosci* 2011a; 31: 1410-8.
  99. Lin Y, Roman K, Foust KD, Kaspar BK, Bailey MT, Stephens RL. Glutamate Transporter GLT-1 Upregulation Attenuates Visceral Nociception and Hyperalgesia via Spinal

- Mechanisms Not Related to Anti-Inflammatory or Probiotic Effects. *Pain Res Treat* 2011b; 2011: 507029.
100. Ling B, Coudoré F, Decalonne L, Eschalier A, Authier N. Comparative antiallodynic activity of morphine, pregabalin and lidocaine in a rat model of neuropathic pain produced by one oxaliplatin injection. *Neuropharmacology* 2008; 55: 724-8.
  101. Liu J, Reid AR, Sawynok J. Antinociception by systemically-administered acetaminophen (paracetamol) involves spinal serotonin 5-HT<sub>7</sub> and adenosine A<sub>1</sub> receptors, as well as peripheral adenosine A<sub>1</sub> receptors. *Neurosci Lett* 2013; 536: 64-8.
  102. Lopes LS, Pereira SS, Silva LL, Figueiredo KA, Moura BA, Almeida FR, Sousa FC. Antinociceptive effect of topiramate in models of acute pain and diabetic neuropathy in rodents. *Life Sci* 2009; 84: 105-10.
  103. Lopez-Garsia JA. Serotonergic modulation of spinal sensory circuits. *Curr Top Med Chem* 2006; 6: 1987-1996.
  104. Löscher W, Hönack D, Bloms-Funke P. The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) induces alterations in GABA metabolism and turnover in discrete areas of rat brain and reduces neuronal activity in substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 1996; 735: 208–216.
  105. Lukyanetz EA, Shkryl VM, Kostyuk PG. Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam. *Epilepsia* 2002; 43: 9–18.
  106. Luszczki JJ, Andres MM, Czuczwar P, Cioczek-Czuczwar A, Wojcik-Cwikla J, Ratnaraj N, Patsalos PN, Czuczwar SJ. Levetiracetam selectively potentiates the acute neurotoxic effects of topiramate and carbamazepine in the rotarod test in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005; 15: 609-16.
  107. Maione S, de Novellis V, Cappellacci L, Palazzo E, Vita D, Luongo L, Stella L, Franchetti P, Marabese I, Rossi F, Grifantini M. The antinociceptive effect of 2-chloro-2'-C-methyl-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine (2'-Me-CCPA), a highly selective adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist, in the rat. *Pain* 2007; 131: 281-92.
  108. Mallet C, Daulhac L, Bonnefont J, Ledent C, Etienne M, Chapuy E, Libert F, Eschalier A. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain* 2008; 139: 190-200.



- 
109. Mallet C, Barrière DA, Ermund A, Jönsson BA, Eschalier A, Zygmunt PM, Högestätt ED. TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. *PLoS One* 2010a; 5(9).
  110. Mallet C, Eschalier A. Pharmacology and Mechanism of Action of Acetaminophen. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, eds. *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press, 2010b: 65-85.
  111. Mao J, Gold MS, Backonja MM. Combination drug therapy for chronic pain: a call for more clinical studies. *J Pain* 2011; 12: 157-66.
  112. Marchand S. Applied Pain Neurophysiology. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, eds. *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press, 2010: 3-27.
  113. Martindale: The Complete Drug Reference. 37th ed. Electronic version, 2011.
  114. Marvizon JC, Ma Yao-Ying, Charles AC, Walwyn W, Evans CJ. Pharmacology of Opioid System. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, eds. *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press, 2010: 87-111.
  115. Mathew NT, Rapoport A, Saper J, Magnus L, Klapper J, Ramadan N, Stacey B, Tepper S. Efficacy of gabapentin in migraine prophylaxis. *Headache* 2001; 41: 119-28.
  116. Micó JA, Ardid D, Berrocoso E, Eschalier A. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 348-54.
  117. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002; 66: 355-474.
  118. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999; 57: 1-164.
  119. Miranda HF, Puig MM, Prieto JC, Pinaridi G. Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain* 2006; 121: 22-8.
  120. Miranda HF, Puig MM, Dursteler C, Prieto JC, Pinaridi G. Dexketoprofen-induced antinociception in animal models of acute pain: synergy with morphine and paracetamol. *Neuropharmacology* 2007; 52: 291-6.
  121. Mishra S, Bhatnagar S, Goyal GN, Rana SP, Upadhyaya SP. A comparative efficacy of amitriptyline, gabapentin, and pregabalin in neuropathic cancer pain: a prospective randomized double-blind placebo-controlled study. *Am J Hosp Palliat Care* 2012; 29: 177-82.
  122. Mixcoatl-Zecuatl T, Jolivald CG. A spinal mechanism of action for duloxetine in a rat model of painful diabetic neuropathy. *Br J Pharmacol* 2011; 164: 159-69.

- 
123. Miyazaki R, Yamamoto T. The efficacy of morphine, pregabalin, gabapentin, and duloxetine on mechanical allodynia is different from that on neuroma pain in the rat neuropathic pain model. *Anesth Analg* 2012; 115: 182-8.
  124. Morgado C, Pereira-Terra P, Tavares I.  $\alpha$ -lipoic acid normalizes nociceptive neuronal activity at the spinal cord of diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13: 736-41.
  125. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In: Winyard PG, Willoughby DA, eds. *Inflammation Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Vol 225. New Jersey, Totowa: Humana Press Inc, 2003: 115-123.
  126. Munro G, Erichsen HK, Mirza NR. Pharmacological comparison of anticonvulsant drugs in animal models of persistent pain and anxiety. *Neuropharmacology* 2007; 53: 609–618.
  127. Nakamura-Craig M, Follenfant RL. Effect of lamotrigine in the acute and chronic hyperalgesia induced by PGE2 and in the chronic hyperalgesia in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Pain* 1995; 63: 33-7.
  128. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th edition, National Academies Press (US), Washington (DC), 2011.
  129. Niespodziany I, Klitgaard H, Margineanu DG. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated  $Ca^{2+}$  current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 2001; 306: 5-8.
  130. Noyer M, Gillard M, Matagne A, Hénichart JP, Wülfert E. The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) appears to act via a specific binding site in CNS membranes. *Eur J Pharmacol* 1995; 286: 137-146.
  131. Ohashi-Doi K, Gale JD, Kurebayashi Y. Pregabalin inhibits accelerated defecation and decreased colonic nociceptive threshold in sensitized rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 643: 107-12.
  132. O'Rielly DD, Loomis CW. Increased expression of cyclooxygenase and nitric oxide isoforms, and exaggerated sensitivity to prostaglandin E2, in the rat lumbar spinal cord 3 days after L5-L6 spinal nerve ligation. *Anesthesiology* 2006; 104: 328-37.
  133. Ortega-Varela LF, Herrera JE, Caram-Salas NL, Rocha-González HI, Granados-Soto V. Isobolographic analyses of the gabapentin-metamizol combination after local peripheral, intrathecal and oral administration in the rat. *Pharmacology* 2007; 79: 214-22.

134. Ossipov MH. The perception and endogenous modulation of pain. *Scientifica* 2012; Article ID 561761, 25 pages.
135. Otto M, Bach FW, Jensen TS, Sindrup SH. Valproic acid has no effect on pain in polyneuropathy: a randomized, controlled trial. *Neurology* 2004; 62: 285-8.
136. Ozcan M, Ayar A, Canpolat S, Kutlu S. Antinociceptive efficacy of levetiracetam in a mice model for painful diabetic neuropathy. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52: 926-30.
137. Ozcan M, Ayar A. Modulation of action potential and calcium signaling by levetiracetam in rat sensory neurons. *J Recept Signal Transduct Res* 2012; 32: 156-62.
138. Pakalnis A, Kring D, Meier L. Levetiracetam prophylaxis in pediatric migraine-an open-label study. *Headache* 2007; 47: 427-30.
139. Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 2008; 117: 141-61.
140. Pappagallo M. Newer antiepileptic drugs: possible uses in the treatment of neuropathic pain and migraine. *Clin Ther* 2003; 25: 2506-38.
141. Paranos SLj, Tomić MA, Micov AM, Stepanović-Petrović RM. The mechanism of antihyperalgesic effect of topiramate in a rat model of inflammatory hyperalgesia. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27: 319-28.
142. Parsa AA, Sprouse-Blum AS, Jackowe DJ, Lee M, Oyama J, Parsa FD. Combined preoperative use of celecoxib and gabapentin in the management of postoperative pain. *Aesthetic Plast Surg* 2009; 33: 98-103.
143. Patsalos PN. Clinical pharmacokinetics of levetiracetam. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 707-24.
144. Petrovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol* 2006; 80: 53-83.
145. Picazo A, Castañeda-Hernández G, Ortiz MI. Examination of the interaction between peripheral diclofenac and gabapentin on the 5% formalin test in rats. *Life Sci* 2006; 79: 2283-7.
146. Pinardi G, Sierralta F, Miranda HF. Adrenergic mechanisms in antinociceptive effects of non steroidal anti-inflammatory drugs in acute thermal nociception in mice. *Inflamm Res* 2002; 51: 219-22.

- 
147. Pizza V, Busillo V, Agresta A, Bisogno A, Capasso A. Elderly patients with migraine: an open-label study on prophylaxis therapy with levetiracetam. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2011; 11: 31-4.
  148. Raffa RB. Pharmacology of oral combination analgesics: rational therapy for pain. *J Clin Pharm Ther* 2001; 26: 257-64.
  149. Rahman W, Bauer CS, Bannister K, Vonsy JL, Dolphin AC, Dickenson AH. Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. *Mol Pain* 2009; 5: 45.
  150. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957; 111: 409-419.
  151. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK, urednici. *Farmakologija*, 5. izdanje (1. srpsko izdanje). Beograd: Data Status, 2005: 562-584.
  152. Rao RD, Michalak JC, Sloan JA, Loprinzi CL, Soori GS, Nikcevich DA, Warner DO, Novotny P, Kutteh LA, Wong GY; North Central Cancer Treatment Group. Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial (N00C3). *Cancer* 2007; 110: 2110-8.
  153. Raskin P, Donofrio PD, Rosenthal NR, Hewitt DJ, Jordan DM, Xiang J, Vinik AI; CAPSS-141 Study Group. Topiramate vs placebo in painful diabetic neuropathy: analgesic and metabolic effects. *Neurology* 2004; 63: 865-73.
  154. Reichl S, Augustin M, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Peripheral and spinal GABAergic regulation of incisional pain in rats. *Pain* 2012; 153: 129-41.
  155. Reis GM, Duarte ID. Baclofen, an agonist at peripheral GABAB receptors, induces antinociception via activation of TEA-sensitive potassium channels. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 733-9.
  156. Ren K, Dubner R. Glutamate and GABA Receptors in Pain Transmission. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, eds. *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press, 2010: 207-241.
  157. Rezende RM, França DS, Menezes GB, dos Reis WG, Bakhle YS, Francischi JN. Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyron in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 760-8.

- 
158. Rezende RM, Paiva-Lima P, Dos Reis WG, Camêlo VM, Faraco A, Bakhle YS, Francischi JN. Endogenous opioid and cannabinoid mechanisms are involved in the analgesic effects of celecoxib in the central nervous system. *Pharmacology* 2012; 89: 127-36.
  159. Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 387: 111-8.
  160. Rice AS, Maton S; Postherpetic Neuralgia Study Group. Gabapentin in postherpetic neuralgia: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Pain* 2001; 94: 215-24.
  161. Rigo JM, Hans G, Nguyen L, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Leprince P, Moonen G, Selak I, Matagne A, Klitgaard H. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 659-72.
  162. Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med* 2004; 10: 685-92.
  163. Rossi S, Mataluni G, Codecà C, Fiore S, Buttari F, Musella A, Castelli M, Bernardi G, Centonze D. Effects of levetiracetam on chronic pain in multiple sclerosis: results of a pilot, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Neurol* 2009; 16: 360-6.
  164. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB: Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 2005; 433: 73-7.
  165. Rowbotham MC, Manville NS, Ren J. Pilot tolerability and effectiveness study of levetiracetam for postherpetic neuralgia. *Neurology* 2003; 61: 866-7.
  166. Rubinstein MR, Genaro AM, Wald MR. Differential effect of hyperglycaemia on the immune response in an experimental model of diabetes in BALB/cByJ and C57Bl/6J mice: participation of oxidative stress. *Clin Exp Immunol* 2013; 171: 319-29.
  167. Rull JA, Qibrera R, González-Millán H, Lozano Castañeda O. Symptomatic treatment of peripheral diabetic neuropathy with carbamazepine (Tegretol): double blind crossover trial. *Diabetologia* 1969; 5: 215-8.
  168. Rylander D, Recchia A, Mela F, Dekundy A, Danysz W, Cenci MA. Pharmacological modulation of glutamate transmission in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia:

- effects on motor behavior and striatal nuclear signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 330: 227-235.
169. Saadé NE, Al Amin HA, Barchini J, Tchachaghian S, Shamaa F, Jabbur SJ, Atweh SF. Brainstem injection of lidocaine releases the descending pain-inhibitory mechanisms in a rat model of mononeuropathy. *Exp Neurol* 2012; 237: 180-90.
170. Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsuda Y, Nonaka T, Han W, Toriyama H, Tanabe T. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *EMBO J* 2001; 20: 2349-56.
171. Sandercock D, Cramer M, Wu J, Chiang YK, Biton V, Heritier M. Gabapentin extended release for the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy: efficacy and tolerability in a double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Diabetes Care* 2009; 32: e20.
172. Sandrini M, Vitale G, Ruggieri V, Pini LA. Effect of acute and repeated administration of paracetamol on opioidergic and serotonergic systems in rats. *Inflamm Res* 2007; 56: 139-42.
173. Satyanarayana PS, Jain NK, Singh A, Kulkarni SK. Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 641-9.
174. Sawynok J, Reid AR, Doak GJ. Caffeine antinociception in the rat hot-plate and formalin tests and locomotor stimulation: involvement of noradrenergic mechanisms. *Pain* 1995; 61: 203-213.
175. Sawynok J. Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 1–20.
176. Sawynok J, Liu XJ. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol* 2003; 69: 313-40.
177. Sawynok J. Adenosine and ATP receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2007; (177): 309-28.
178. Sawynok J, Reid AR, Fredholm BB. Caffeine reverses antinociception by amitriptyline in wild type mice but not in those lacking adenosine A1 receptors. *Neurosci Lett* 2008; 440: 181-4.
179. Sawynok J. Caffeine and pain. *Pain* 2011a; 152: 726-9.
180. Sawynok J. Methylxantines and pain. *Handb Exp Pharmacol* 2011b; 200: 311-29.
181. Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 177: 3-28.

182. Schulte G, Robertson B, Fredholm BB, DeLander GE, Shortland P, Molander C. Distribution of antinociceptive adenosine A1 receptors in the spinal cord dorsal horn, and relationship to primary afferents and neuronal subpopulations. *Neuroscience* 2003; 121: 907-16.
183. Scroggs RS, Fox AP. Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J Physiol* 1992; 445: 639–58.
184. Seegers AJ, Jager LP, Zandberg P, van Noordwijk J. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of non-narcotic analgesic drug mixtures in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1981; 251: 237-254.
185. Shih A, Miletic V, Miletic G, Smith LJ. Midazolam administration reverses thermal hyperalgesia and prevents gamma-aminobutyric acid transporter loss in a rodent model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 2008; 106: 1296-302.
186. Sikandar S, Dickenson AH. Visceral pain: the ins and outs, the ups and downs. *Curr Opin Support Palliat Care* 2012; 6: 17-26.
187. Siqueira-Junior JM, Peters RR, Brum-Fernandes AJ, Ribeiro-do-Valle RM. Effects of valeryl salicylate, a COX-1 inhibitor, on models of acute inflammation in mice. *Pharmacol Res* 2003; 48: 437-43.
188. Sliva J, Dolezal T, Prochazkova M, Votava M, Krsiak M. Preemptive levetiracetam decreases postoperative pain in rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29: 953-957.
189. Stepanović-Petrović RM, Tomić MA, Vučković SM, Kocev N, Ugrešić ND, Prostran MS, Bošković B. GABAergic mechanisms are involved in the antihyperalgesic effects of carbamazepine and oxcarbazepine in a rat model of inflammatory hyperalgesia. *Pharmacology* 2008a; 82: 53-8.
190. Stepanović-Petrović RM, Tomić MA, Vučković SM, Paranos S, Ugrešić ND, Prostran MS, Milovanović S, Bošković B. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. *Anesth Analg* 2008b; 106: 1897-903.
191. Stepanović-Petrović RM, Tomić MA, Vučković SM, Poznanović G, Ugrešić ND, Prostran MŠ, Bošković B. Pharmacological interaction between oxcarbazepine and two COX inhibitors in a rat model of inflammatory hyperalgesia. *Pharmacol Biochem Behav* 2011a; 97: 611-8.

192. Stepanović-Petrović R. Terapija epilepsije. U: Ugrešić N, Stepanović-Petrović R, Savić M, urednici. Farmakoterapija za farmaceute. Beograd: Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2011b: 307-331.
193. Takeda M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K, Matsumoto S. Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol Pain* 2011; 7:5.
194. Tallarida RJ, Murray RB. *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*. 2nd ed. New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo: Springer Verlag, 1986.
195. Tallarida RJ. *Drug synergism and Dose-Effect Data Analysis*. 1st ed. London, New York, Washington: Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, 2000.
196. Tallarida RJ. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain* 2002; 98: 163-168.
197. Tallarida RL, Stone DJ, Raffa RB. Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sci* 1997; 61:PL 417-425.
198. Tanabe M, Takasu K, Kasuya N, Shimizu S, Honda M, Ono H. Role of descending noradrenergic system and spinal alpha2-adrenergic receptors in the effects of gabapentin on thermal and mechanical nociception after partial nerve injury in the mouse. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 703-14.
199. Tavares RG, Schmidt AP, Tasca CI, Souza DO. Quinolinic acid-induced seizures stimulate glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain: effects prevented by guanine-based purines. *Neurochem Res* 2008; 33: 97-102.
200. Taylor CP. Mechanisms of analgesia by gabapentin and pregabalin--calcium channel alpha2-delta [Cavalpha2-delta] ligands. *Pain* 2009; 142: 13-6.
201. Thienel U, Neto W, Schwabe SK, Vijapurkar U; Topiramate Diabetic Neuropathic Pain Study Group. Topiramate in painful diabetic polyneuropathy: findings from three double-blind placebo-controlled trials. *Acta Neurol Scand* 2004; 110: 221-31.
202. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K: The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
203. Tomić MA, Vučković SM, Stepanović-Petrović RM, Ugrešić N, Prostran MS, Bošković B. The anti-hyperalgesic effects of carbamazepine and oxcarbazepine are attenuated by treatment with adenosine receptor antagonists. *Pain* 2004; 111: 253-60.



- 
204. Tomić MA, Vucković SM, Stepanović-Petrović RM, Ugrišić N, Prostran MS, Bosković B. Peripheral anti-hyperalgesia by oxcarbazepine: involvement of adenosine A1 receptors. *Pharmazie* 2006; 61: 566-8.
205. Tomić MA, Vučković SM, Stepanović-Petrović RM, Ugrišić ND, Prostran MS, Bošković B. Synergistic interactions between paracetamol and oxcarbazepine in somatic and visceral pain models in rodents. *Anesth Analg* 2010a; 110: 1198-205.
206. Tomić MA, Vučković SM, Stepanović-Petrović RM, Micov AM, Ugrišić ND, Prostran MS, Bošković B. Analysis of the antinociceptive interactions in two-drug combinations of gabapentin, oxcarbazepine and amitriptyline in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2010b; 628: 75-82.
207. Tomić M, Stepanović-Petrović R. Terapija bola i glavobolje. U: Ugrišić N, Stepanović-Petrović R, Savić M, urednici. *Farmakoterapija za farmaceute*. Beograd: Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2011: 357-386.
208. Toussaint K, Yang XC, Zielinski MA, Reigle KL, Sacavage SD, Nagar S, Raffa RB. What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works? *J Clin Pharm Ther* 2010; 35: 617-38.
209. Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Tokumaru J, Takaki M, Willmore LJ. Effect of levetiracetam on molecular regulation of hippocampal glutamate and GABA transporters in rats with chronic seizures induced by amygdalar FeCl<sub>3</sub> injection. *Brain Res* 2007; 1151: 55-61.
210. Uphouse LA, Welch SP, Ward CR, Ellis EF, Embrey JP. Antinociceptive activity of intrathecal ketorolac is blocked by the kappa-opioid receptor antagonist, nor-binaltorphimine. *Eur J Pharmacol* 1993; 242: 53-8.
211. van Seventer R, Feister HA, Young JP Jr, Stoker M, Versavel M, Rigaudy L. Efficacy and tolerability of twice-daily pregabalin for treating pain and related sleep interference in postherpetic neuralgia: a 13-week, randomized trial. *Curr Med Res Opin* 2006; 22: 375-84.
212. Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 46: 295-309.
213. Vilholm OJ, Cold S, Rasmussen L, Sindrup SH. Effect of levetiracetam on the postmastectomy pain syndrome. *Eur J Neurol* 2008; 15: 851-7.

- 
214. Vučković SM, Tomić MA, Stepanović-Petrović RM, Ugrešić N, Prostran MS, Bošković B. The effects of alpha2-adrenoceptor agents on anti-hyperalgesic effects of carbamazepine and oxcarbazepine in a rat model of inflammatory pain. *Pain* 2006a; 125: 10-9.
215. Vučković S, Tomić M, Stepanović-Petrović R, Ugrešić N, Prostran M, Bošković B. Peripheral antinociception by carbamazepine in an inflammatory mechanical hyperalgesia model in the rat: a new target for carbamazepine? *J Pharmacol Sci* 2006b; 100: 310-4.
216. Wang Y, Zhang X, Guo QL, Zou WY, Huang CS, Yan JQ. Cyclooxygenase inhibitors suppress the expression of P2X(3) receptors in the DRG and attenuate hyperalgesia following chronic constriction injury in rats. *Neurosci Lett* 2010; 478: 77-81.
217. Watkins LR, Maier SF. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 2002; 82: 981-1011.
218. White DM, Cousins MJ. Effect of subcutaneous administration of calcium channel blockers on nerve injury-induced hyperalgesia. *Brain Res* 1998; 801: 50-8.
219. Wodarski R, Clark AK, Grist J, Marchand F, Malcangio M. Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pain* 2009; 13: 807-11.
220. Wu ZZ, Chen SR, Pan HL. Differential sensitivity of N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel currents to a mu opioid in isolectin B4-positive and -negative dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 939-947.
221. Xie YK, Xiao WH, Li HQ. The relationship between new ion channels and ectopic discharges from a region of nerve injury. *Sci China B* 1993; 36: 68-74.
222. Xie DJ, Uta D, Feng PY, Wakita M, Shin MC, Furue H, Yoshimura M. Identification of 5-HT receptor subtypes enhancing inhibitory transmission in the rat spinal dorsal horn in vitro. *Mol Pain* 2012; 8: 58.
223. Yajnik S, Singh GP, Singh G, Kumar M. Phenytoin as a coanalgesic in cancer pain. *J Pain Symptom Manage* 1992;7(4):209-13.
224. Yaksh TL, Noueihed RY, Durant PA: Studies of the pharmacology and pathology of intrathecally administered 4-anilinopiperidine analogues and morphine in the rat and cat. *Anesthesiology* 1986; 64: 54-66.
225. Yaksh TL, Dirig DM, Conway CM, Svensson C, Luo ZD, Isakson PC. The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of

- spinal prostaglandinE2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *J Neurosci* 2001; 21: 5847-53.
226. Yaksh TL. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. *J Pain* 2006; 7(1 Suppl 1): S13-30.
227. Yamamoto T, Takahara A. Recent updates of N-type calcium channel blockers with therapeutic potential for neuropathic pain and stroke. *Curr Top Med Chem* 2009; 9: 377-395.
228. Yang M, Roman K, Chen DF, Wang ZG, Lin Y, Stephens RL Jr. GLT-1 overexpression attenuates bladder nociception and local/cross-organ sensitization of bladder nociception. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300: F1353-9.
229. Yasuda T, Miki S, Yoshinaga N, Senba E. Effects of amitriptyline and gabapentin on bilateral hyperalgesia observed in an animal model of unilateral axotomy. *Pain* 2005; 115: 161-70.
230. Yokoyama T, Maeda Y, Audette KM, Sluka KA. Pregabalin reduces muscle and cutaneous hyperalgesia in two models of chronic muscle pain in rats. *J Pain* 2007; 8: 422-9.
231. Yoon MH, Yaksh TL. Evaluation of interaction between gabapentin and ibuprofen on the formalin test in rats. *Anesthesiology* 1999; 91: 1006-13.
232. Yoshino T, Kimoto A, Kobayashi S, Noguchi M, Fukunaga M, Hayashi A, Miyata K, Sasamata M: Pharmacological profile of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Arzneimittelforschung* 2005; 55: 394-402.
233. Zakrzewska JM, Chaudhry Z, Nurmikko TJ, Patton DW, Mullens EL. Lamotrigine (lamictal) in refractory trigeminal neuralgia: results from a double-blind placebo controlled crossover trial. *Pain* 1997; 73: 223-30.
234. Zeilhofer HU, Möhler H, Di Lio A. GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 397-402.
235. Zhang JL, Yang JP, Zhang JR, Li RQ, Wang J, Jan JJ, Zhuang Q. Gabapentin reduces allodynia and hyperalgesia in painful diabetic neuropathy rats by decreasing expression level of Nav1.7 and p-ERK1/2 in DRG neurons. *Brain Res* 2013; 1493: 13-8.
236. Zhang WS, Xu H, Xu B, Sun S, Deng XM, Zhang YQ. Antihyperalgesic effect of systemic dexmedetomidine and gabapentin in a rat model of monoarthritis. *Brain Res* 2009; 1264: 57-66.

237. Zhang YQ, Gao X, Ji GC, Huang YL, Wu GC, Zhao ZQ. Expression of of 5-HT1A receptor mRNA in rat lumbar spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation. *Pain* 2002; 98: 287-295.
238. Zollner C, Shaqura MA, Bopaiah CP, Mousa S, Stein C, Schafer M. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 202-210.

## OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

### Radovi u međunarodnim časopisima:

1. **Micov A**, Tomić M, Popović B, Stepanović-Petrović R. The antihyperalgesic effect of levetiracetam in an inflammatory model of pain in rats: mechanism of action. *Br J Pharmacol* 2010; 161: 384-92.
2. Stepanović-Petrović RM, **Micov AM**, Tomić MA, Ugrešić ND. The local peripheral antihyperalgesic effect of levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. *Anesth Analg* 2012; 115: 1457-66.
3. Tomić MA, **Micov AM**, Stepanović-Petrović RM. Levetiracetam Interacts Synergistically With Nonsteroidal Analgesics and Caffeine to Produce Antihyperalgesia in Rats. *J Pain* 2013 Aug 15. *In press*.
4. Stepanović-Petrović RM, **Micov AM**, Tomić MA, Kovačević JM, Bošković BD. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. *Anesthesiology* 2013 Sep 26. *In press*.

### Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu:

1. **Micov A**, Tomić M, Stepanović-Petrović R. The involvement of opioidergic receptors in the local peripheral anti-hyperalgesic effect of levetiracetam. 23th Congress of the European College of Neuropsychopharmacology, 28.8.-2.9.2010, Amsterdam, Holland. *European Neuropsychopharmacology*, 2010; 20(Suppl 3), S261.
2. Stepanović-Petrović R, **Micov A**, Tomić M. The involvement of adenosine A1 receptors in the antihyperalgesic effect of levetiracetam. 24rd Congress of the European College of Neuropsychopharmacology, 3-7 September, 2011, Paris, France. *European Neuropsychopharmacology*, 2011; 21(Suppl 3), S286.
3. Tomić M, **Micov A**, Stepanović-Petrović R. Antinociceptive effect of levetiracetam in a mouse model of visceral pain. 24rd Congress of the European College of Neuropsychopharmacology, 3-7 September, 2011, Paris, France. *European Neuropsychopharmacology*, 2011; 21 (Suppl 3), S279.
4. **Micov A**, Tomić M, Stepanović-Petrović R. Caffeine antagonizes the antihyperalgesic effect of levetiracetam in a rat model of inflammatory hyperalgesia. 24rd Congress of the European College of Neuropsychopharmacology, 3-7 September, 2011, Paris, France. *European Neuropsychopharmacology*, 2011; 21(Suppl 3), S278.

5. Stepanović-Petrović R, **Micov A**, Tomić M. Synergism between levetiracetam and two COX inhibitors in a rat model of inflammatory hyperalgesia. International Association for the Study of Pain, (IASP), Milan, Italy, 27-31 August 2012; Abstracts of the 14th World Congress on Pain, IASP, 2012; PP 32
6. Tomić M, **Micov A**, Stepanović-Petrović R. Synergistic interactions between paracetamol and levetiracetam in somatic and visceral inflammatory pain models in rodents. International Association for the Study of Pain, (IASP), Milan, Italy, 27-31 August 2012; Abstracts of the 14th World Congress on Pain, IASP, 2012; PP 326
7. **Micov A**, Stepanović-Petrović R, Tomić M. Caffeine potentiates the antihyperalgesic effects of levetiracetam in a rat model of inflammatory hyperalgesia. International Association for the Study of Pain, (IASP), Milan, Italy, 27-31 August 2012; Abstracts of the 14th World Congress on Pain, IASP, 2012; PP 325.

**Saopštenja sa domaćih skupova štampana u izvodu:**

1. **Micov A**, Tomić M, Stepanović-Petrović R. Lokalno periferno analgetičko dejstvo levetiracetama je posredovano  $\alpha_2$ -adrenergičkim receptorima. V Kongres Farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, 13-17. oktobar 2010, Beograd. Arh. farm. 2010;60:652-653.
2. **Micov A**, Tomić M, Stepanović-Petrović R. Uloga adenozijskih receptora u analgetičkom dejstvu levetiracetama u modelu inflamatornog bola u pacova. 13. Kongres Farmakologa Srbije sa međunarodnim učešćem, Palić, Zbornik radova, 2011; 183-185.
3. Stepanović-Petrović R, **Micov A**, Tomić M, Popović B. Analgetičko dejstvo levetiracetama u modelu inflamatornog bola u pacova: mehanizam delovanja 13. Kongres Farmakologa Srbije sa međunarodnim učešćem, Palić, Zbornik radova, 2011; 172-174.

## Biografija

Ana Micov rođena je 28.8.1981. godine u Nišu, Republika Srbija. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani farmaceut, završila je januara 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,48. Po obavljenom jednogodišnjem pripravničkom stažu za farmaceute položila je stručni ispit marta 2008. godine. Doktorske akademske studije iz farmakologije upisala je školske 2007/2008. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, nakon čega se, u oktobru 2008. godine, zaposlila kao saradnik u nastavi na Katedri za farmakologiju. Marta 2011. izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast „Farmakologija“. Januara 2012. upisala je zdravstvene specijalističke studije iz Farmakoterapije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Učestvuje u pripremi i izvođenju praktične nastave iz obaveznih predmeta Farmakologije i Farmakoterapije.

Asistent dipl. farm. Ana Micov uključena je u naučnoistraživački rad na Katedri za farmakologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od 2009. godine angažovana je kao saradnik na Projektu osnovnih istraživanja Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije *Ispitivanje mehanizma dejstva, interakcija i toksičnih efekata analgetika, kao i vazoaktivnih supstanci* (br. 145030). Od 2011. godine angažovana je na Projektu osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije *Ispitivanje mehanizma dejstva, interakcija i toksičnih efekata adjuvantnih analgetika* (br. 175045). Član je Međunarodnog udruženja za proučavanje bola (IASP).

Dobitnik je Godišnje nagrade Farmaceutskog fakulteta za naučnoistraživački rad na poslediplomskim studijama (2009) sa radom *Analgetičko dejstvo levetiracetama u modelu zapaljenskog bola u pacova: mehanizam dejstva*.

Koautor je udžbenika za studente osnovnih studija *Farmakoterapija za farmaceute* (glavni urednik Ugrešić N, Beograd: Farmaceutski fakultet, 2011). Autor je i koautor 8 radova u časopisima međunarodnog značaja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а **Ана Мицов**

Број уписа **31/07**

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

**Антиноцицептивни ефекат, механизам дејства и интеракције  
леветирацетама у моделима соматског, висцералног и неуропатског бола**

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 18.10.2013.

А. Мицов



**Прилог 2.**

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

Име и презиме аутора **Ана Мицов**

Број уписа **31/07**

Студијски програм **Докторске академске студије из фармакологије**

Наслов рада **Антиноцицептивни ефекат, механизам дејства и интеракције леветирацетама у моделима соматског, висцералног и неуропатског бола**

Ментор **Проф. др Радица Степановић-Петровић**

Потписани \_\_\_\_\_

*A. Micov*

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

*18.10.2013*

*A. Micov*

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

**Антиноцицептивни ефекат, механизам дејства и интеракције леветирацетама у моделима соматског, висцералног и неуропатског бола**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 18. 10. 2013.

SI. Gicov

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 прераде. 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 прераде. 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.