

**UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET**

Dr Dina D. Vasović

**Selektivna modulacija GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$
podjedinicu na eksperimentalnom modelu trigeminalnog
neuropatskog bola**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTISTRY**

Dr Dina D. Vasović

**Selective modulation of $\alpha 6$ subunit containing GABAA
receptors on trigeminal neuropathic pain model**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentor

Dr Božidar Brković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Stomatološki fakultet

Komentor

Miroslav Savić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

Dr Ivana Šćepan, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Stomatološki fakultet

Dr Gavriilo Brajović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Stomatološki fakultet

Dr Jelena Roganović, docent
Univerzitet u Beogradu – Stomatološki fakultet

Dr Aleksandar Trbović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

U Beogradu, _____

Selektivna modulacija GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu na eksperimentalnom modelu trigeminalnog neuropatskog bola

Rezime

Trigeminalni neuropatski bol je hronično bolno stanje orofacijalne regije koje nastaje kao posledica povrede trigeminalnog živca. Ova vrsta bola loše ili uopšte ne reaguje na terapiju, te njegovo lečenje predstavlja veliki terapijski problem koji utiče kvalitet života pacijenta. U trigeminalnom ganglionu eksprimiran je veliki broj hemijskih medijatora, a GABA je najznačajniji inhibitorski neurotransmiter. Zbog velikog broja podjedinica i njihovih različitih kombinacija, postoji veliki broj efekata koji GABA ostvaruje. U trigeminalnom ganglionu postoje GABAA receptori koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu. Smanjenje ove podjedinice primenom male interferirajuće RNK pojačava bolni odgovor kod eksperimentalnih životinja na modelima miofacijalnog i inflamatornog bola temporomandibularnog zgloba. Trigeminalni ganglion je supstrat za razvoj većeg broja patoloških stanja koje se sreću u stomatologiji, kao što su trigeminalna neuralgija i trigeminalna neuropatija. Hipoteza ove doktorske disertacije je bila da pojačavanje aktivnosti GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu utiče na smanjenje bolnog odgovora u modelu trigeminalnog neuropatskog bola. Lekovi koji potenciraju aktivnost ove grupe receptora nisu dostupni u kliničkoj praksi. U ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je DK-I-56-1, novosintetisani selektivni modulator $\alpha 6$ podjedinice GABAA receptora, koji pripada grupi deuterisanih pirazolohinolinona. Sprovedena je detaljna farmakokinetička analiza ovog jedinjenja na animalnom eksperimentalnom modelu. Dobijeni rezultati pokazuju da je kinetika ovog jedinjenja u plazmi i mozgu relativno spora, sa poluvremenom eliminacije od 6 h odnosno 13 h, pri čemu je postignuta slobodna koncentracija u mozgu u rasponu 10-300 nM. Ovakav farmakokinetički profil je podesan za ispitivanje u protokolima ponavljane primene. Model hronične konstriktivne povrede infraorbitalnog živca je potvrđen kao pouzdan eksperimentalni

model trigeminalnog neuropatskog bola kod pacova. Primenjen je protokol hronične konstriktione povrede, u kome su životinje sa razvijenom neuropatijom tokom 14 dana primale pojedinačne dnevne doze od 10 mg/kg DK-I-56-1 ili hemijski srodnog pirazolohinolinskog jedinjenja DK-I-87-1, koje ne potencira GABAA receptore koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu. Utvrđeno je da DK-I-56-1, ali ne i DK-I-87-1, dovodi do statistički značajnog smanjenja bolnog odgovora eksperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima, bez pratećih nespecifičnih promena u ponašanju. Pozitivna modulacija GABAA $\alpha 6$ receptora primenom biokompatibilne formulacije DK-I-56-1 pogodne za hroničnu primenu, može predstavljati novu terapijsku opciju za lečenje trigeminalnog neuropatskog bola, i predmet je daljih patentno šticećenih aktivnosti vezanih za razvoj leka.

Ključne reči: hronični bol, trigeminalna neuropatija, $\alpha 6$ GABAA receptori, selektivna pozitivna modulacija, ponašanje, von Frey filamentima

Naučna oblast: Stomatološke nauke

Uža naučna oblast: Bazične stomatološke nauke

UDK broj:

Selective modulation of $\alpha 6$ subunit containing GABAA receptors on trigeminal neuropathic pain model

Summary

Neuropathic pain induced by trigeminal nerve damage is common chronic pain state and it is poorly controlled by current treatments. It represents major therapeutic concern and reduces patients quality of life. Numerous chemical mediators are present in trigeminal ganglia, and GABA is most common inhibitory neurotransmitter. Due to different subunit combinations, GABA can show diversity of pharmacological effects. GABAA receptors containing $\alpha 6$ subunit are located in trigeminal ganglia, and their reduction by small interfering RNA increases inflammatory temporomandibular and myofascial pain in rats. One of the most common orofacial pain states like trigeminal neuralgia or trigeminal neuropathy begin in trigeminal ganglia. We thus hypothesized that enhancing GABAA receptors containing the $\alpha 6$ subunit activity may help in neuropathic syndromes originating from the trigeminal system. Selective modulators that activate this specific receptor population are not commercially available. In this doctoral dissertation we used recently developed deuterated pyrazoloquinolinone compound, (DK-I-56-1) that selectively activates $\alpha 6$ subunit of GABAA receptors. Here, we performed a detailed pharmacokinetic analysis of DK-I-56-1 on animal experimental model. Both plasma and brain tissue kinetics of DK-I-56-1 were relatively slow, with half-lives of 6 h and 13 h, respectively, enabling the persistence of estimated free brain concentrations in the range 10-300 nM throughout a 24-h period. We confirmed that chronic constriction injury of infraorbital nerve is considered a reliable experimental animal model for trigeminal neuropathic pain. Results were obtained on IoN-CCI protocol in hypersensitive rats dosed intraperitoneally with 10 mg/kg DK-I-56-1 or DK-I-87-1, structurally similar pyrazoloquinolinone compound that can not induce GABA currents on $\alpha 6$ containing receptors. Results demonstrated that DK-I-56-1 but not DK-I-87-1 significantly reduced the allodynic response to von Frey filaments, without non specific

behavioural changes in rats. Biocompatible nanoemulsion formulation of DK-I-56-1, that positively modulates $\alpha 6$ GABAA receptors, is appropriate for repeated administration, and thus may represent a novel treatment option against the development and maintenance of trigeminal neuropathic pain. Confirmation of these hypothesis require further experiments, that are conducted through patent activities.

Keywords: chronic pain, trigeminal neuropathy, $\alpha 6$ GABAA receptors, selective positive modulation, behavior, von Frey filaments

Scientific field: Dental sciences

Narrower scientific field: Basic dental sciences

UDC:

Lista skraćenica

CCI – hronična konstrikciona povreda (eng. *chronic constriction injury*)

DMSO – dimetilsulfoksid

GABA – gama-aminobuterna kiselina

GABAA – tip A receptora za γ -aminobuternu kiselinu

GABAA $\alpha 6$ – GABAA receptori koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu

IoN – infraorbitalni živac

IPSP – inhibitorni postsinaptički potencijal

NMDA – N-metil D-aspartat receptor

RT-PCR – lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. *Real Time PCR*)

TMZ- temporomandibularni zglob

Sadržaj

1 UVOD	1
1.1 Neurofiziološka osnova orofacijalnog bola	5
1.2 Trigeminalna neuropatija	9
1.3 Receptori gama-aminobuterne kiseline.....	13
1.4 Ligandi selektivni za $\alpha 6$ GABAA receptore.....	17
1.5 Ogladni model hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca.....	19
2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	22
3 MATERIJAL I METODE	25
3.1 Ogladne životinje	26
3.2 Korišćene supstance.....	27
3.2.1 Formulacija supstanci	27
3.2.2 Postupak izrade nanoemulzije	29
3.2.3 Deuteracija.....	31
3.3 Farmakokinetička analiza	33
3.4 Model hronične konstriktione povrede n. infraorbitalis-a.....	34
3.5 Dizajn studije	36
3.6 Praćenje izazvanog bolnog ponašanja (mehaničke alodinije).....	39
3.7 Određivanje ekspresije $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice GABAA receptora, NKCC1 i KCC2	41
hlornih kotransportera u trigeminalnom ganglionu.....	41
3.7.1 Izolcija RNK za ispitivanje genske ekspresije.....	41

3.7.2	Određivanje koncentracije i čistoće uzoraka	42
3.7.3	Reverzna transkripcija – lančana reakcija polimeraze.....	42
3.7.4	Real time PCR	44
3.8	Statistička analiza.....	46
4	REZULTATI.....	47
4.1	Farmakokinetička analiza	48
4.2	Validacija eksperimentalnog modela hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca	51
4.3	Terapijski efekat DK-I-56-1 na razvijenu trigeminalnu neuropatiju	54
4.4	Analiza ekspresije $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice GABAA receptora, NKCC1 i KCC2.....	56
	hlornih kotransportera u trigeminalnom ganglionu.....	56
5	DISKUSIJA	59
6	ZAKLJUČCI.....	73
7	LITERATURA	76
8	BIOGRAFIJA	89
9	PRILOZI	91

1. UVOD

Bol se definiše kao neprijatno čulno ili emocionalno iskustvo u vezi sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva, ili je opisano u vezi sa tim oštećenjem. Emocionalna komponenta bola je izraženija kod hroničnog u odnosu na akutni bol (www.iasp-pain.org/resources/painDefinition).

Predeo lica inervisan je od strane trigeminalnog živca, a prenošenje bolnih impulsa iz orofacijalne regije ima specifičnosti u odnosu na put transmisije bola iz preostalog dela tela, koji ide preko dorzalnih rogova kičmene moždine. Bolni nadražaji iz predela lica putuju sa periferije preko trigeminalnog gangliona do centralnog nervnog sistema. U prenošenju bolnih impulsa iz orofacijalne regije učestvuje veliki broj hemijskih medijatora, modulatora i neurotransmitera od kojih neki imaju ulogu u nishodnoj regulaciji bola (na primer, gama-aminobuterna kiselina). Nastanak hroničnog bola orofacijalne regije dovodi do ispoljavanja mehanizama modulacije i modifikacije, kao i gubitka inhibicije. Za razliku od akutnog bola, čija je biološka uloga pre svega zaštitna i dijagnostička, hronični bol nema jasnu biološku ulogu, ali je povezan sa fizičkim, emotivnim i društvenim stresom pacijenta (Merril, 2007). Zbog svog karaktera i dužine trajanja, kod pacijenata kod kojih postoji neka vrsta hroničnog bola češće su ispoljeni znaci anksioznosti i depresije, što dodatno otežava lečenje (Scriavani i Spierings, 2016).

Zbog postojanja lokalne traume tkiva i posledične periferne senzitivacije receptora za bol, ortodontske skeletne nepravilnosti mogu biti praćene akutnim ili hroničnim bolovima u orofacijalnoj regiji različitog intenziteta i učestalosti. Bolovi se mogu javiti u predelu mastikatornih mišića i njihovih ovojnica, mišićnih pripoja, periosta, dentoalveolarnog kompleksa i struktura temporomandibularnog zgloba.

Često dijagnostikovano patološko stanje koje je praćeno bolom u predelu inervacione zone trigeminalnog nerva je i disfunkcija temporomandibularnog zgloba (TMZ), udružena sa mijalgijom (bolom lokalizovanim u mastikatornim mišićima orofacijalne regije) (Okerson,

2003). Disfunkcija TMZ-a praćena je nizom kliničkih simptoma i znakova. Pored otežanog i nepravilnog otvaranja usta, parafunkcija i auskultacionih promena, mogu se javiti i glavobolja, bol akutnog i hroničnog tipa na nivou zgloba, kao i bol u predelu lica i vrata (Luther i sar., 2010). Ućestalost disfunkcije TMZ-a udružena sa dentofacijalnim deformitetima, prema podacima dostupnim u literaturi, veoma je promenljiva i kreće se u rasponu od 14% do 97% (Laskin i sar., 1986; Link i Nikcerson, 1992; Panula i sar., 2000; Westermarck i sar., 2001). Jedan od važnih kliničkih faktora za nastanak disfunkcije TMZ-a udružene sa mijalgijom, jeste malokluzija, odnosno skeletni i dentoalveolarni poremećaji sagitalnog, vertikalnog ili transverzalnog pravca na nivou gornje i donje vilice (Egermark i sar., 2003). Na koncept malokluzije, kao anatomskog deformiteta u anteriornoj ili superiornoj poziciji kondila (zglobne glavice), ukazano je još 1964. godine, da bi se, osamdesetih godina 20. veka, stručna pažnja usmerila prema međusobnoj povezanosti malokluzije i disfunkcije TMZ, sa posebnim osvrtom na terapijski, ortodontski koncept lećenja ove patološke promene (Green i Laskin, 1988). Tako na primer, novija ispitivanja Al-Moraissa i sar. (2017) su pokazala značajnu korelaciju između malokluzije i disfunkcija, međutim u literaturi se mogu naći i oprećna mišljenja (Laskin i sar., 1986; Luther , 1998; Rodriguez-Garcia i sar., 1998). Klinička studija na većem uzorku pacijenata (1134 ispitanika), ukazala je na značajno veću prevalencu miofacijalnog bola kod osoba ženskog pola, kao i znatno veću ućestalost bolnih disfunkcija TMZ-a kod boćno ukrštenog zagrižaja, u odnosu na kontrolnu grupu pacijenata bez malokluzije (Tecco i sar., 2010). Pored pomenutih ortodontskih nepravilnosti, znaćaj malokluzije u patogenezi bolnih disfunkcija TMZ-a ogleda se i u činjenici da malokluzije između ostalog, indukuju pojavu bruksizma i drugih parafunkcija orofacijalnog sistema, koje same po sebi pogoršavaju postojećiu disfunkciju (Manfredini i sar., 2014).

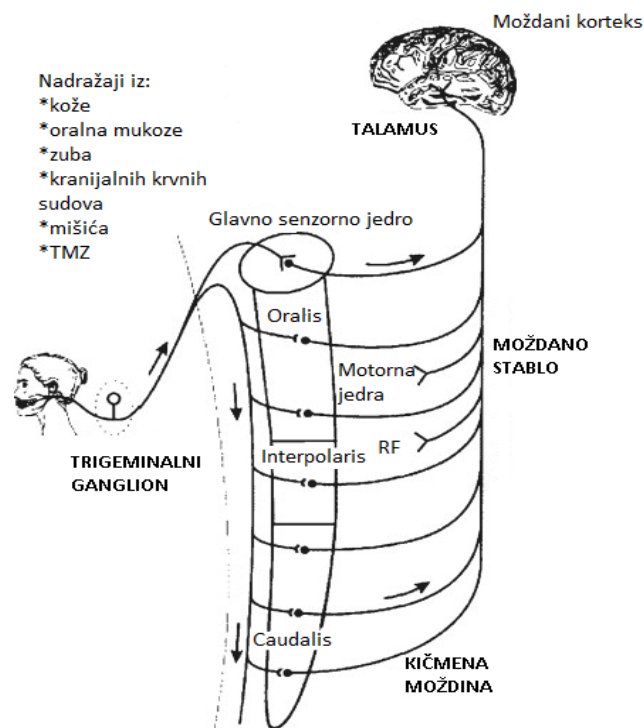
Posmatrano sa ortodontskog, terapijskog aspekta, Dibbets i sar. (1985), kao i McNamara i sar. (1997), uporedno analizirajući simptome bolne disfunkcije TMZ-a i mijaligije pre započinjanja ortodontske terapije, utvrdili su da su tegobe smanjene i sporadične, ali da i dalje postoje kod pacijenata posle završenog lečenja. Vađenje zuba, kao terapijski modalitet, kojim se omogućava dobijanje dovoljnog prostora za pomeranje zuba u toku ortodontske terapije, takođe je bio jedan od kontraverznih faktora pojačanja bolnih tegoba. Tako, na primer, dugogodišnje longitudinalno kliničko ispitivanje Dibbets i van der Weele (1992) je ukazalo na činjenicu da vađenje zuba zbog ortodontske terapije može imati uticaja na nastanak i pogoršanje bolne disfunkcije TMZ-a. Ukoliko bolna disfunkcija perzistira i po završenoj ortodontskoj terapiji ili je evidentna i tokom terapije, u najvećem broju kliničkih slučajeva, razmatra se i mogućnost ortognate hirurgije kod ovih pacijenata. Međutim, brojna istraživanja su pokazala da ni hirurški modaliteti ortodontske terapije ne doprinose stabilizaciji tegoba i njihovom prestanku, već da tegobe fluktuiraju i menjaju svoj karakter zavisno od perioda praćenja (Rodrigues-Garcia i sar., 1998; Magnusson i sar., 2000; Abrahamsson i sar., 2013). Stoga se, danas, imajući u vidu perzistiranje bola i tegoba, bez obzira na preduzetu ortodontsku ili ortodontsko-hiruršku terapiju, u okviru lečenja pacijenata sa bolnim disfunkcijama u orofacijalnoj regiji, a posebno usled mogućnosti hroniciteta bolnih disfunkcija i nastanka neuropatija trigeminalnog nerva, razmatra i mogućnost primene medikamentozne, farmakološke terapije.

1.1 Neurofiziološka osnova orofacijalnog bola

Tkiva orofacijalne regije inervisana su od strane jedne od tri završne grane trigeminalnog živca. Primarna aferentna vlakna trigeminalnog živca su mijelinizovana A β ili A δ nervna vlakna, koja se završavaju u tkivu i ponašaju se kao mehanoreceptori (reaguju na blag dodir) ili proprioceptori (reaguju na mišićno istezanje ili tenziju). Kao primarna aferentna vlakna sreću se A δ i C nemijelinizovana nervna vlakna, koja završavaju u tkivu kao slobodni nervni završeci i preuzimaju funkciju nociceptora. Kada se registruje bolni nadražaj, preko nociceptora, akcioni potencijal se sprovodi sve do senzornih zona u mozgu, gde se registruje lokalizacija, vrsta, jačina i trajanje bolnog nadražaja (Sessle, 2005).

Traumatsko oštećenje pomenutih tkiva, praćeno je lokalnom zapaljenskom reakcijom, koja se odlikuje aktiviranjem inflamatornih ćelija i oslobađanjem brojnih medijatora zapaljenja (histamin, serotonin, bradikinin, citokini). Inflamatorni medijatori oslobađaju se iz krvnih sudova ili drugih tkiva, i dovode do povećanja (histamin, 5-hidroksi triptamin, citokini) ili smanjenja (enkefalini) nervne ekscitabilnosti. Aferentna vlakna takođe oslobađaju različite proinflamatorne medijatore (supstanca P, CGRP, somatostatin, nervni faktori rasta), koji se sintetišu u telu primarnih neurona trigeminalnog gangliona. Iz tela primarnih aferentnih neurona mogu se oslobađati i različiti hemijski medijatori poput glutamata ili gama-aminobuterne kiseline, koji potenciraju ili smanjuju aktivnost perifernih nervnih vlakana. Ovaj mehanizam dovodi do pojačanog odgovora na postojanje periferne traume, što se naziva akutnom primarnom hiperalgezijom (Costigan i Woolf, 2000). S druge strane, pored nastanka akutnog inflamatornog bola, povrede pomenutih orofacijalnih struktura mogu da prouzrokuju i nastanak hroničnog neuropatskog bola. Kako se pomenute strukture nalaze u inervacionoj zoni trigeminalnog živca, ova vrsta neuropatije, naziva se trigeminalna neuropatija.

Prenošenje akutnog (inflamatorna periferna hiperalgezija, inflamatorni bol) ili hroničnog bola (neuropatski bol) iz orofacijalne regije, povezano je sa aktivacijom receptora na različitim nivoima trigeminalnog puta. Naime, složeni mehanizmi odgovorni za neurofiziološke aktivnosti na nivou trigeminalnog živca, u svojoj osnovi, povezani su sa transmisijom bolnog stimulusa na 3 nivoa. Tela primarnih aferentnih neurona (neuron prvog reda), nalaze se u trigeminalnom ganglionu. Iz ganglionu, centralni produžeci neurona završavaju se u senzitivnim jedrima moždanog stabla, odnosno, u spinalnom jedru trigeminalnog živca, gde su smeštena tela neurona drugog reda. Spinalno jedro trigeminalnog živca podeljeno je na tri dela: *pars oralis*, *pars interpolaris* i *pars caudalis*.



Slika 1. Šematski prikaz trigeminalnog puta. Ovo je glavni somatosenzorni put koji prenosi nadražaje iz regije lica i usne duplje. Trigeminalni primarni aferentni neuroni pružaju se preko trigeminalnog ganglionu do neurona drugog reda u trigeminalnom senzornom jedru. Neuroni drugog reda se dalje projektuju do drugih delova mozga (talamusa za senzorna, a retikularne formacije za motorna jedra). Nisu prikazane dodatne projekcije cervikalnih i nekih kranijalnih nerava koja se pridružuju trigeminalnom putu (preuzeto i prilagođeno iz Sessle, 2000). RF-retikularna formacija

U literaturi, pokazano je da je *pars caudalis*, koji po svojoj organizaciji podseća na dorzalne robove kičmene moždine, deo trigeminalnog jedra u kome se završavaju nervna vlakna koja prenose bolne nadražaje iz orofacijalne regije (Bereiter i sar., 2000). Nadalje, iz senzornog jedra, bol se prenosi do talamusa, tačnije do ventralne posteromedijalne grupe jedara, gde leži telo neurona trećeg reda. Aksoni ovih neurona završavaju u primarnom somatosenzornom polju, gde se registruje emocionalna komponenta bola (Sessle, 2000).

Kliničke manifestacije periferne senzitivacije ispoljavaju se sniženim pragom nadražaja i pojačanim odgovorom receptora na mestu gde se trauma desila. Svi medijatori zapaljenja, mogu da difunduju u okolno tkivo, usled čega se bolno područje širi, a pacijent se žali na spontani bol, postojanje hiperalgezije (pojačan i produžen odgovor na bolne nadražaje) i alodinije (bolni odgovor na nadražaje koji u fiziološkim uslovima ne izazivaju bol) (Woolf i Salter, 2000).

Neki od osnovnih neurofizioloških mehanizama u transmisiji trigeminalnog bolnog nadražaja, jesu mehanizmi modulacije i modifikacije orofacijalnog bola, koji značajno menjaju neurofiziološku osnovu i aktivnost, kako perifernih receptora, tako i perifernih i centralnih neurona trigeminalnog sistema. Modulacija se odnosi na posttranslacione promene, koje nastaju usled aktivacije receptora ili jonskih kanala i različitih unutarćelijskih signalnih mehanizama, a uzrokuju promenu u ekscitabilnosti neurona prvog i drugog reda. Modifikacija se odnosi na dugotrajne promene u ispoljavanju različitih receptora, jonskih kanala ili neurotransmitera koji u velikoj meri menjaju fiziološki odgovor na bolne nadražaje (Woolf i Salter, 2000). Tako, na primer, usled hronične traume na periferiji, A β nervna vlakna moduliraju svoju aktivnost u odnosu na fiziološku i stiču sposobnost generisanja bolnih impulsa. Poznato je, takođe, da se pored periferne senzitivacije (primarne hiperalgezije), razvija i centralna senzitivacija, koju čini pojačano pražnjenje centralnih neurona (neurona drugog reda), a usled povećanog oslobađanja

eksčitatornih neurotransmitera (glutamata) i sledstvene aktivacije NMDA receptora. Aktivacija ovih receptora dovodi do dugotrajne aktivnosti nerava, što predstavlja osnovu za nastanak hroničnog orofacijalnog bola (Costigan i sar., 2009). Usled aktivacije ligand zavisnih jonskih kanala AMPA receptora omogućava se influks kalcijuma u ćeliju. Takođe, dolazi do povećanog oslobađanja glutamata i supstance P, koji dalje povećavaju unutarćelijsku koncentraciju kalcijuma, pražnjenjem iz njegovih ćelijskih depoa. Aktivacija NMDA receptora podrazumeva uklanjanje jona magnezijuma, i oslobađanje jonskog kanala koji omogućava ulazak kalcijuma u telo neurona, fosforilaciju NMDA receptora, i promene u neuralnoj kinetici. Kao posledica povrede ili zapaljenja na periferiji, bolni nadražaji stižu do trigeminalnog jedra tokom nekoliko minuta, sati ili dana. Nakon vremenske sumacije nervnih impulsa, dolazi do povećane aktivnosti neurona drugog reda (*wind-up* fenomen). Ukoliko prestane generisanje bolnih impulsa, proces se prekida. Međutim, dugotrajna stimulacija ove regije, koja dovodi do centralne senzitivacije, klinički se ispoljava kao sekundarna hiperalgezija (pojačan i produžen odgovor na bolne nadražaje u regiji koja nije inervisana obolelim nervom) i mehanička alodinija (Woolf i Salter, 2000). Novija istraživanja pokazuju da su glavne strukture trigeminalnog sistema, kao što su glavno trigeminalno i spinalno jedro, uključene u generisanje trigeminalne centralne senzitivacije (Xie, 2008). Štaviše, na nivou trigeminalnog ganglionu i spinalnog jedra trigeminalnog živca, registrovano je postojanje i aktivnost GABA receptora, koji su odgovorni za modulaciju bolnih nadražaja iz orofacijalne regije (Hayasaki i sar., 2006; Puri i sar., 2011; 2012). Smatra se da, u toku procesa centralne senzitivacije, dolazi i do gubitka centralnih nishodnih regulatornih mehanizama koji smanjuju bol (Sessle, 2005). Opisuje se i uloga glija ćelija u procesu centralne senzitivacije (Merill, 2007). Važno je napomenuti da je centralna senzitivacija fiziološki odgovor

na bolne stimuluse, koji je najčešće reverzibilan. Smatra se da genetski, psihosocijalni i faktori okoline utiču na produžavanje ovog procesa, koji leži u osnovi hroničnog bola.

1.2 Trigeminalna neuropatija

Trigeminalna neuropatija je oboljenje perifernog nervnog sistema izazvano perifernim ili centralnim oštećenjem ili oboljenjem trigeminalnog živca.

Glavne karakteristike orofacijalnog neuropatskog bola su: bol koji se najčešće opisuje kao osećaj pečenja i koji se javlja spontano, potom, bol koji je izražen i prenaplašen u poređenju sa nadražajem koji ga izaziva, kao i neosetljivost ili loše reagovanje na terapiju analgeticima (Conti i sar., 2003).

Klasifikacija neuropatskih bolnih stanja trigeminalnog živca je nejasna, usled čega je vrlo teško odrediti kolika je njihova učestalost u populaciji, a prema podacima dostupnim u literaturi iznosi 2-11% (Benoliel i sar., 2012). Klinički značaj trigeminalne neuropatije ogleda se u smanjenju kvaliteta života pacijenata usled dugotrajnog, hroničnog bola, umerenog ili slabog intenziteta, praćenog osećajem glosodinije i glosopiroze, kao i mehaničkom alodinijom i pojačanim odgovorom u vidu hiperalgezije, a zbog sniženog praga nadražaja na bol (Napeñas i Zakrzewska, 2011). Bol se javlja jednostrano, najčešće u zahvaćenom dermatomu povređenog nerva, ali može postati difuzan i širiti se u okolinu. Pacijenti se žale na spontan ili provociran bol, koji opisuju kao pekući ili probadajući, uz postojanje kako pozitivnih (npr. parestezije, dizestezije) tako i negativnih (npr. gubitak osećaja) neuroloških simptoma. Ova vrsta bolova češće se javlja kod žena, starosti 45-50 godina (Haviv i sar., 2014). Etiologija je veoma raznovrsna – opisuje se

nastanak neuropatije nakon vađenja zuba, endodontskog lečenja kanala korena, ugradnje implantata, fraktura kostiju lica, kao i nakon ortognate hirurgije ili usled ortodontskih nepravilnosti (Benoliel i sar., 2012). Anamnestički, pacijenti ukazuju i na depresivna i anksiozna stanja (Scriavani i Spierings, 2016).

Takođe, ova vrsta hroničnog bolnog stanja orofacijalne regije predstavlja terapijski problem, s obzirom na anatomske i molekularne specifičnosti u načinu transmisije bola iz predela lica i ostatka tela. Lečenje trigeminalne neuropatije je isto kao i lečenje drugih neuropatskih bolnih stanja, a lekovi izbora su triciklični antidepresivi (npr. amitriptilin) i antikonvulzivi (kao što su karbamazepin, pregabalin i gabapentin). Koriste se takođe i selektivni inhibitori preuzimanja serotonina (fluoksetin i paroksetin), kao i opiodi (Benoliel i sar., 2012; 2016). Korišćenje lokalnih analgetika, preporučuje se pre sistemske terapije bilo kojim od ovih lekova, dok hirurgija nije terapijska metoda izbora za lečenje ovog patološkog stanja (Napeñas i Zakrzewska, 2011).

U svojoj studiji Haviv i sar. (2014) navode da samo 11% pacijenata sa trigeminalnom neuropatijom, nakon upotrebe dostupnih lekova, pokazuje značajno poboljšanje u smislu smanjenja bolova. Sve navedeno ukazuje na dalju potrebu u istraživanju (potencijalnih) efikasnijih terapijskih mogućnosti za lečenje ovih bolnih stanja.

Klinički nalaz hroničnog bolnog stanja, uočen je i kod ortodontskih pacijenata sa skeletnim nepravilnostima i malokluzijama (Shen i sar., 2016). U obzir treba uzeti i činjenicu da su, u uslovima postojanja ortodontskih nepravilnosti u orofacijalnoj regiji, periferne grane trigeminalnog nerva izložene hroničnoj povredi konstrikcije ili kompresije nerva, kada se generišu uslovi ektopične nervne aktivnosti, koja se klinički manifestuje i pojavom spontanog neuropatskog bola. Do sada je poznato da hronična povreda nerva može biti praćena formiranjem

neuroma i nastankom zona demijelinizacije nervnog tkiva, koja su mesta ektopične nervne aktivnosti, a što dalje dovodi do funkcionalnih promena na perifernom nervu (periferna neuropatija), na trigeminalnom ganglionu (gangliopatija), na dorzalnim rogovima kičmene moždine (radikulopatija) ili u centralnom nervnom sistemu (centralna neuropatija) (Benoliel i sar., 2016).

Dosadašnja ispitivanja patofiziološkog aspekta trigeminalne neuropatije pokazala su da nakon oštećenja nerva, zbog periferne senzitivacije, dolazi do zapaljenja i oslobađanja velikog broja proinflammatoryh medijatora uz pojavu periferne hiperalgezije. Specifičnost trigeminalnog sistema je u tome da većina struktura leži unutar ograničenog prostora, pa dodatno oštećenje nerva može nastati kao posledica pritiska (Benoliel i sar., 2002). Zapaljenje oko nerva, bez oštećenja aksona, povećava spontanu nervnu aktivnost najpre samo A β velikih nervnih vlakana, a kasnije zahvata A δ i nemijelinizovana C vlakna, i dovodi do hiperalgezije i mehaničke alodinije. Dakle, inflamatorni proces je uzrok ektopične nervne aktivnosti i pojave spontanog bola. Ektopična nervna aktivnost nastaje na nivou aksona, a ne u predelu sinaptičke pukotine. Razlozi za nastanak ove aktivnosti su promene na nivou metabolizma natrijuma, koje se manifestuju izmenjenom sintezom proteina koji učestvuju u izgradnji natrijumovih kanala (više kanala-veća osetljivost) i povećanju njegove koncentracije. Veće oštećenje tkiva, kao što je transekcija nervnog stabla, može da rezultira gubitkom aktivnosti proksimalnog i oporavkom distalnog dela živca, uz formiranje neuroma koji su mesto ektopične nervne aktivnosti koja direktno zavisi od koncentracije natrijuma, što delom objašnjava spontani bol (Spencer i Gremillion, 2007). Povreda nerva izrazito menja ekspresiju, raspored i fosforilaciju jonskih kanala u senzornim neuronima, što dovodi do promena u membranskom potencijalu i posledičnih spontanijh akcionijh potencijala, bez postojanja nadražaja (Hehn i sar., 2012).

Fenotipske promene odnose se pre svega na A β nervna vlakna, koja prenose taktilne impulse u fiziološkim uslovima. Promena neuropeptidne ekspresije, pre svega, ispoljavanja supstance P, ovim vlaknima daje sposobnost da generišu bolne impulse i učestvuju u nastanku periferne, a kasnije i centralne senzitivacije.

Povećanje nervne ekscitabilnosti, dovodi do pojačanog odgovora i aktivacije okolnih zona centralnog nervnog sistema, uz nastanak sekundarne hiperalgezije (centralne senzitivacije). Nastanak centralne senzitivacije dovodi do aktivacije NMDA receptora, koji povećavaju nervnu ekscitabilnost i značajno utiču na dalji razvoj procesa. Klinički, ovo se manifestuje pojačavanjem bola i njegovim širenjem u susedne strukture kod nekih pacijenata (sekundarna hiperalgezija) (Benoliel i sar., 2016). Periferno povećan nociceptivni odgovor u trigeminalnoj neuropatiji je povezan sa razvijanjem centralne senzitivacije, i nastaje kao posledica mikrostrukturnih i morfoloških promena trigeminalnog nervnog tkiva, posebno tankih, mijelinizovanih nervnih vlakana (Wilcox i sar., 2013). Imajući u vidu da satelitske glija ćelije na nivou trigeminalnog ganglionu u patološkim uslovima oslobađaju razne medijatore zapaljenja, usled interakcije sa već ekscitiranim neuronima, smatra se da su i one delom odgovorne za nastanak i održavanje neuropatskog orofacijalnog bola (Xie, 2008). Takođe, pored fenotipskih promena, dolazi i do promena u genskoj ekspresiji i transkripciji, kao i nishodnoj regulaciji supresornih mehanizama, što vodi daljem povećanju ekscitabilnosti nerava (Benoliel i sar., 2012).

1.3 Receptori gama-aminobuterne kiseline

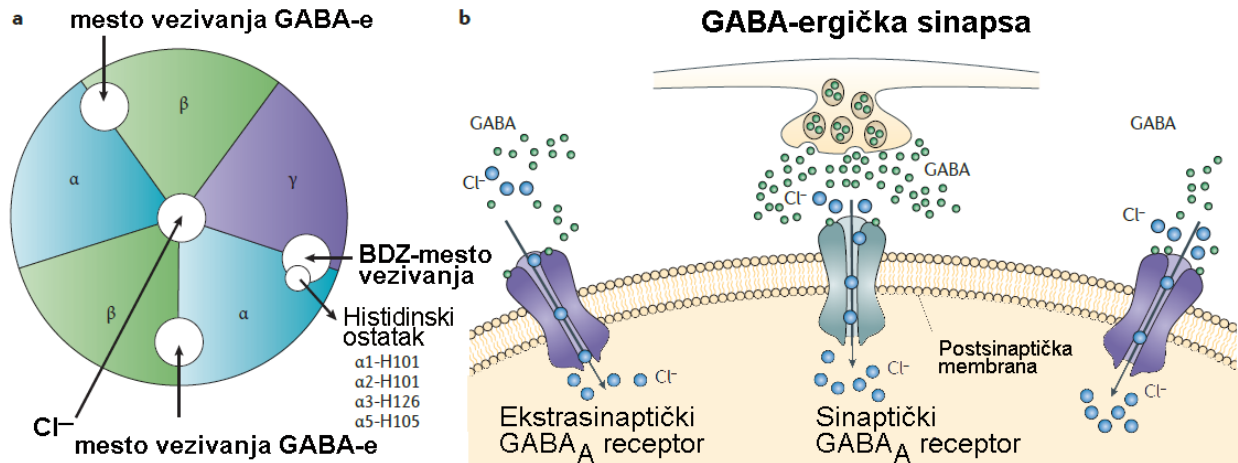
Gama-aminobuterna kiselina (GABA) je glavni inhibitorni neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu, a svoje efekte ostvaruje preko dve vrste receptora: GABAA i GABAB. GABAA receptori su pentamerni, ligand-zavisni jonski kanali selektivno propustljivi za hloridne (Cl⁻) jone. Ovi receptori smanjuju ekscitabilnost postsinaptičkih neurona, povećavajući permeabilnost ćelijske membrane za negativno naelektrisanе Cl⁻ jone, te dovode do hiperpolarizacije. Ovi receptori postoje na sinapsama i ekstrasinaptički, a dejstvo ostvaruju preko brze fazne inhibicije sinaptičke transmisije (inhibitorni postsinaptički potencijali-IPSP) i sporije tonične inhibicije na ekstrasinaptičkim i perisinaptičkim lokacijama (Rudolph i Knoflach, 2011). Receptori su organizovani kao pentamerni proteini koji okružuju centralnu poru, a ona predstavlja transmembranski jonski kanal (Olsen i Sieghart, 2008).

Postoji 19 subjedinica razvrstanih u nekoliko podfamilija koje obuhvataju izoforme visokog stepena homologije – α , β , γ , δ , ϵ , θ , π , ρ . Subjedinice su kodirane različitim genima, i do sada su poznate 6 α , 3 β , 3 γ , jedna δ , jedna ϵ , jedna θ , jedna π i 3 ρ podjedinice GABA receptora. (Wu i sar., 2012). Iako postoji veliki broj potencijalnih kombinacija različitih podjedinica (preko 500), stvarni broj je znatno manji – 26, a najčešće zastupljena receptorska populacija se sastoji iz 2 α , 2 β i γ subjedinice (Sieghart i Ernst, 2005). Najzastupljenija receptorska forma je $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (60%), zatim $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ (15-20%), $\alpha 3\beta x\gamma 2$ (10-15%), $\alpha 4\beta x\gamma$ ili $\alpha 4\beta x\delta$ (oko 5%), dok su $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ i $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ zastupljene sa manje od 5% ukupne receptorske populacije (Rudolph i Knoflach, 2011). Do sada je poznato da na nivou GABA receptora postoji najmanje 16 specifičnih mesta za vezivanje liganada (supstanca koja može da se veže i formira kompleks sa molekulom koji ima biološku svrhu), koji većinom ostvaruju efekte alosternih modulatora (vezuju se za alosterna vezna mesta,

i mogu pojačati ili ublažiti odgovor izazvan agonistom, pa se ovakvi ligandi nazivaju pozitivni ili negativni alosterni modulatori).

Zahvaljujući velikom broju podjedinica i njihovih kombinacija, njihovoj ćelijskoj i ekstraćelijskoj lokalizaciji, postoji značajan broj farmakoloških efekata koji može biti potenciran od strane ovih jonskih kanala (Wisden i sar., 1992; Sieghart, 1995; Pirker i sar., 2000).

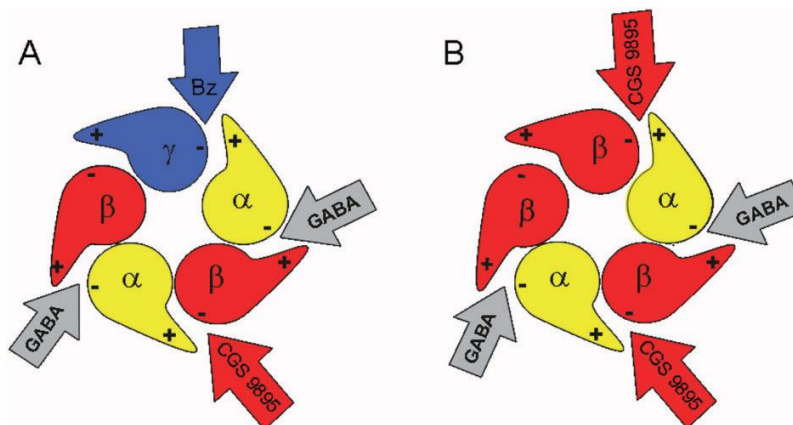
Najčešće korišćeni i ispitivani ligandi GABAA receptora su benzodiazepini, koji se vezuju u ekstracelularnom delu receptora, između α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ili $\alpha 5$) i γ (najčešće $\gamma 2$) podjedinice (Olsen i Sieghart, 2008; Rudolph i Knoflach, 2011). Benzodiazepini nemaju mogućnost da direktno otvore jonske kanale, za razliku od GABA-e, već dovode do alosterne modulacije veznog mesta. Modulacija može biti pozitivna, neutralna ili negativna, a ligandi se nazivaju agonisti (pozitivni alosterni modulatori), inverzni agonisti-oni koji ne dovode do maksimalnog odgovora (negativni alosterni modulatori), ili antagonisti benzodiazepinskog veznog mesta. Selektivnost liganda za određeno vezno mesto može biti posredovana njihovim vezivanjem odnosno pravljnjem receptor-ligand kompleksa ili efikasnošću da izazove određen biološki efekat nakon vezivanja za receptor (Rudolph i Knoflach, 2011). Benzodiazepini se vezuju za GABA receptore preko alosternih veznih mesta, i ne pokazuju selektivnost prema α podjedinici, usled čega pored terapijskih, daju i veliki broj neželjenih efekata kao što su sedacija, ataksija, amnezija, razvoj tolerancije i zavisnosti (Knutson i sar., 2018). Receptori koji sadrže $\alpha 4$ ili $\alpha 6$ podjedinicu, ne vezuju klasične benzodiazepine, jer zbog prisutne tačkaste mutacije i zamene aminokiseline histidina u arginin, nemaju vezno mesto za ove ligande.



Slika 2. Mesta vezivanja GABA-e i benzodiazepinsko mesto vezivanja na GABA_A receptoru (a). Efekti otvaranja GABA_A receptora na postsinaptičkoj membrani: povećanje provodljivosti postsinaptičke membrane i promena u potencijalu membrane zahvaljujući kretanju hloridnih jona (hiperpolarizujuća inhibicija). Sinaptički receptori detektuju mM koncentracije GABA-e i posreduju brzi IPSP, dok ekstrasinaptički receptori detektuju μM koncentracije GABA-e i bitni su za spori IPSP (tonična inhibicija) (b) (preuzeto i prilagođeno iz Rudolph i Knoflach, 2011)

Novе tehnike i eksperimentalni pristupi otkrivaju fiziološke uloge određenih subjedinica, kao i mogućnosti sinteze liganada selektivnih za različite tipove receptora koji bi potencijalno ispoljavali samo željene terapijske efekte (Sieghart i Savić, 2018). Otkrića u prethodnoj deceniji ukazuju da bi ligandi selektivni za pojedine subjedinice mogli da prevaziđu nedostatke klasičnih benzodiazepina i mogli bi da imaju potencijalne nove indikacije, kao što su analgezija, depresija, shizofrenija, moždani udar (Rudolph i Knoflach, 2011).

Ekstracelularni domen GABA_A receptora, koji se najčešće sastoji od 2 α , 2 β i γ podjedinice, ima najmanje 4 vezna mesta, smeštena između konstitutivnih podjedinica. Svaka podjedinica ima pozitivno i negativno naelektrisan pol, dok se vezno mesto formira između pozitivnog pola jedne i negativnog pola susedne podjedinice. Vezna mesta GABA_A nalaze se u predelu $\beta+\alpha$ -veznog mesta, dok se benzodiazepinsko vezno mesto nalazi između $\alpha+\gamma$ -interfejsa.



Slika 3. Izgled ekstracelularnog domena GABA_A receptora. Svaka podjedinica ima pozitivno (+) i negativno (-) naelektrisan pol. Vezujuća mesta za GABA nalaze se između (+) i (-) pola dve podjedinice. (A) $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ receptor sastoji se od dve α , dve β i jedne γ podjedinice. Benzodiazepinsko vezno mesto nalazi se između (+) pola α i (-) pola γ podjedinice. (B) $\alpha 1\beta 3$ receptor sastoji se od dve α , tri β podjedinice. Da bi se izbegla interakcija sa benzodiazepinskim veznim mestom, korišćena je ova vrsta receptora. Pretpostavlja se da ovaj tip receptora ima dva $\beta 3(+)/\alpha 1(-)$ vezna mesta (vezno mesto za GABA-u), dva $\alpha 1(+)/\beta 3(-)$ vezna mesta i jedno $\beta 3(+)/\beta 3(-)$, ali ne poseduje benzodiazepinsko vezno mesto (preuzeto i prilagođeno iz Mirheydari i sar., 2014)

Otkriće novog veznog mesta ($\alpha x+\beta y-$), omogućilo je dalje ispitivanje i sintezu selektivnih liganada koji bi ispoljavali samo specifične farmakološke efekte, bez neželjenih reakcija kao što su ataksija, amnezija, razvoj tolerancije i zavisnosti (Ramerstorfer i sar., 2011; Varagić i sar., 2013). Prvi ligandi za koje je pokazano da ostvaruju potencijaciju GABA_A struja preko novog veznog mesta $\alpha+\beta-$, bili su pirazohinolinoni CS 9895 i njegovi strukturni analozi (Varagić i sar., 2013). Dobijeni rezultati ukazali su da većina jedinjenja menja GABA_A indukovane struje, u vrlo sličnoj meri na $\alpha\beta$ i $\alpha\beta\gamma$ receptorima, i da su postignuti efekti ovih jedinjenja nezavisni od benzodiazepinskog veznog mesta. Ova jedinjenja ostvaruju neselektivnu modulaciju preko velikog broja receptorskih mesta $\alpha x+\beta y-$ ($x=1-6$, $y=1-3$). Može se pretpostaviti da preostalo

vezno mesto koje se nalazi između $\gamma+\beta$ - intefejsa, čini potencijalno vezno mesto nekih lekova, ali za sada nema dokaza koji bi podržali ovu pretpostavku (Mirheydari i sar., 2014).

S obzirom da pozitivno naelektrisan pol alfa podjedinice ($\alpha+$), učestvuje u izgradnji $\alpha+\beta$ - veznog mesta, kao i $\alpha+\gamma$ - veznog mesta, može se očekivati da se jedinjenja poput pirazolohinolinona, kao što je CS 9895, vezuju za oba vezna mesta.

1.4 Ligandi selektivni za $\alpha 6$ GABAA receptore

Mehanizam nastanka hroničnog traumatskog bola u trigeminalnoj neuropatiji delimično je povezan sa aktivacijom GABA receptora na nivou trigeminalnog gangliona i spinalnog jedra trigeminalnog živca (Puri i sar., 2012), čiji je glavni inhibitorski neurotransmiter GABA.

GABAA receptori koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu zastupljeni su vrlo ograničeno, za razliku od GABA-ergičkih receptora sa drugim α podjedinicama. Njihovo prisustvo u granuliranim ćelijama cerebeluma, olfaktornom bulbusu i kohlearnom jedru je odavno poznato (Wisden, 1992; Korpi i sar., 1999; Pirker, 2000), a aktuelna istraživanja pokazuju da ih ima i u trigeminalnom ganglionu (Puri i sar., 2012), strijatumu (Hillemecher i sar., 2015) i u spinalnim motornim neuronima (Delgado-Lezama i sar., 2013).

GABAA receptori koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u trigeminalnom ganglionu smešteni su u neuronima malog prečnika i satelitskim glija ćelijama (Hayasaki i sar., 2006). Smanjena ekspresija ove podjedinice, posredstvom male interferirajuće RNK, povećava nociceptivni odgovor na modelu miofacijalnog i inflamatornog bola temporomandibularnog zgloba (Puri i

sar., 2011; 2012; Kramer i Bellinger, 2013). U kasnijoj studiji, utvrđeno je da samo podvezivanje tetive masetera, dovodi do povećane ekspresije GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u kaudalnom jedru trigeminalnog živca, ukazujući na mogućnost da ovaj tip receptora učestvuje u homeostatskoj protivteži razvoju procesa periferne senzitivacije (Kramer i Bellinger, 2013).

Ligandi selektivni za $\alpha 6$ podjedinicu GABAA receptora mogu imati novu ulogu u lečenju oboljenja kao što su neuropatski bol, depresija, migrena, autizam, moždani udar, shizofrenija, opsesivno kompulzivni porećaji, poremećaj nedostatka pažnje itd. (Kramer i Bellinger, 2013; Chiou i sar., 2018; Fan i sar., 2018).

Iako su pirazolohinolinoni prvi sintetisani nebenzodiazepinski ligandi, njihova selektivnost između benzodiazepinskog ($\alpha\beta\gamma$ GABAA receptor, koji sadrži $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ili $\alpha 5$ podjedinicu) i nebenzodiazepinskog veznog mesta ($\alpha\beta\gamma$ GABAA receptor, koji sadrži $\alpha 4$ ili $\alpha 6$ podjedinicu) bila je veoma mala. Ipak, kako je metabolička stabilnost pirazolohinolinona u *in vitro* uslovima bila suboptimalna, sintetisano je nekoliko analoga kod kojih je A prsten zamenjen D prstenom, zbog čega je afinitet prema GABAA receptoru koji sadrži $\alpha 6$ podjedinicu povećan. Ove modifikacije dovele su do sinteze prvog, $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$, selektivnog liganda PZ-II-029 (opisan kao supstanca 6 u Varagić i sar., 2013). Ovaj ligand, i njemu slične supstance, ostvaruju svoje fiziološke efekte posredstvom $\alpha 6+\beta 3$ - interfejsa kao pozitivni alosterični modulatori GABAA receptora, a istovremeno se ponašaju kao antagonisti (nulti modulatori) benzodiazepinskog veznog mesta (Knutson i sar., 2018). Zbog ograničene rastvorljivosti u vodi, bioraspoloživost i poluvreme eliminacije ovih selektivnih modulatora dovedeni su u pitanje, što je prevaziđeno deuteracijom na ključnim metaboličkim pozicijama liganda. Pokazalo se da deuteracija pozitivno utiče na metaboličku stabilnost, dok istovremeno zadržava farmakološki profil aktivne supstance. Nakon deuteracije, ustanovljena je poboljšana bioraspoloživost $\alpha 6$ selektivnog liganda *in vivo* i postizanje

viših koncentracija liganda u mozgu nakon oralne i intraperitonealne primene (Knutson i sar., 2018).

Takođe, sintetisano je inaktivno jedinjenje (LAU 165), slične molekulske mase i hemijskih osobina od strane Treven i sar. (2018), koje se ponaša kao negativni alosterni modulator nezavisan od γ podjedinice, a samim tim i od benzodiazepinskog veznog mesta.

1.5 Ogladni model hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca

U literaturi je prikazano nekoliko eksperimentalnih modela trigeminalne neuropatije: hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca, transekcija donjeg alveolarnog živca, model regeneracije donjeg alveolarnog živca i model transekcije vratnih nerava (Iwata i sar., 2011).

Hronična konstrikciona povreda (CCI – eng. *chronic constriction injury*) živca podrazumeva plasiranje jedne ili više ligatura oko perifernog nerva, što dovodi do sniženog praga nadražaja na bolne i bezbolne stimulse koji se razvijaju unutar nekoliko dana od hirurške intervencije, a traju nekoliko meseci (Bennet i Xie, 1988). Hronična konstrikciona povreda najčešće se izvodi na *n.sciaticus*-u koji je većeg prečnika, zbog čega je hirurški pristup jednostavniji, a kao rezultat podvezivanja nastaju senzorne promene zahvaćene šape – alodinija, hiperalgezija, parestezije ili dizestezije. Nedostatak ovog metoda je činjenica da *n.ischiadicus* poseduje motornu granu, a takođe smatra se i da oštećenje *n.saphenous*-a delom doprinosi nastanku promena u ponašanju eksperimentalnih životinja (Vos i sar., 1994). Podvezivanje infraorbitalnog živca je nešto komplikovanije, zbog anatomske lokalizacije nerva, ali prednost ovog modela je što je *n.infraorbitalis* čisto senzitivna grana trigeminalnog živca, koji ne poseduje autonomna niti

motorna nervna vlakna. Infraorbitalni živac predstavlja završnu granu gornjeviličnog živca kod pacova a inervira njušku, brkove, gornje zube i dorzalnu površinu usne duplje (Waite i de Permentier, 1991).

Hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca predstavlja povredu izazvanu podvezivanjem stabla živca na različitom anatomskom nivou, kao što su supraorbitalni, intraoralni ili pristup živcu pravljenjem incizije u predelu vibrisa (Kernisant i sar., 2008). Imajući u vidu nedostatke i otežavajuće okolnosti hirurškog pristupa podvezivanju infraorbitalnog živca intraoralno, kao i otežano praćenje postignutih rezultata kod ekstraoralnog pristupa u predelu vibrisa, preporuka je da se u ove svrhe koristi supraorbitalni pristup (Deseure i Hans, 2015).

Prednosti supraorbitalne metode su smanjen stepen trauma tkiva životinja, koji se ogleda u činjenici da se izbegava povreda očne jabučice subperiostalnom tupom disekcijom tkiva, kao i očuvanje integriteta kože oglednih životinja u predelu vibrisa, koji će se kasnije koristiti za ispitivanje ponašanja, a što nije slučaj sa prethodno opisanim metodama. Nadalje, značajna prednost ove metode ogleda se i u činjenici da je konstrikciona povreda indukovana podvezivanjem živca pre nastanka završnih grana infraorbitalnog nerva, što uključuje šire područje praćenja mehaničke alodinije ogledne životinje. Nedostatak ove metode je produženo, neophodno potrebno vreme za samu hiruršku proceduru, ali je važna ponovljivost eksperimenta što utiče na značajnu homogenost grupe. Za izvođenje opisanog metoda poželjna je upotreba stereotaksičnog držača i uveličavajućeg mikroskopa (Kernisant i sar., 2008).

Podvezivanje infraorbitalnog živca može se koristiti kao životinjski model trigeminalne neuropatije (Jaggi i sar., 2009). Cilj ove hirurške procedure je da izazove povredu infraorbitalnog živca, sa razvojem spontanog i izazvanog bolnog ponašanja (mehanička alodinija) kod oglednih životinja, koje je slično simptomima pacijenata sa trigeminalnom neuropatijom (Deseure, 2015).

Primena opisanog eksperimentalnog modela koristi se u farmakološkim ispitivanjima novosintetisanih lekova, razvoju novih terapijskih strategija i razjašnjavanju patofizioloških mehanizama uključenih u nastanak trigeminalnog neuropatskog bola.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Radna hipoteza ove doktorske disertacije glasila je:

Modulacija $\alpha 6$ podjedinice GABAA receptora, primenom selektivnog modulatora DK-I-56-1, smanjuje neuropatski bol kod životinja kod kojih, nakon podvezivanja infraorbitalnog živca, postoji razvijena bolna preosetljivost.

Polazeći od činjenice da bi terapijska primena selektivnih modulatora $\alpha 6$ podjedinice GABAA receptora mogla da smanji učestalost neuropatskog bola trigeminalnog nerva, kao i činjenice da ekspresija $\alpha 6$ podjedinice značajno utiče na pomenutu modulaciju hroničnog bola izazvanog konstrikcijom infraorbitalnog živca na ovom eksperimentalnom modelu, ciljevi doktorske disertacije bili su sledeći:

1. Dozno zavisnim ispitivanjem utvrditi koncentraciju supstance DK-I-56-1, primenjene u dozama od 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg i 20 mg/kg u plazmi i mozgu pacova, jedan sat nakon intraperitonealne primene jedne doze supstance, radi utvrđivanja izabrane doze leka;
2. Utvrditi maksimalnu koncentraciju leka, vreme postizanja maksimalne koncentracije, poluvreme eliminacije i površinu ispod krive primenom izabrane doze supstance DK-I-56-1 u uzorcima krvi i mozga, posle 5 min, 20 min i 60 minuta, i 3 h, 12 h, 24 h i 48 h, nakon intraperitonealne primene;
3. Validirati model hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca, kao modela trigeminalne neuropatije, praćenjem izazvanog bolnog ponašanja reakcijom eksperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima, kod pacova sa podvezanim infraorbitalnim nervom;

4. Uporediti dobijene rezultate izazvanog bolnog nadražaja reakcijom eksperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima, kod pacova sa podvezanim infraorbitalnim nervom u odnosu na životinje kod kojih nerv nije podvezan;
5. Ispitati terapijski efekat supstance DK-I-56-1 u dozi od 10 mg/kg, u smanjenju neuropatskog bola, praćenjem izazvanog bolnog nadražaja reakcijom eksperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima, na modelu hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca;
6. Komparativno analizirati terapijske efekte postignute primenom supstance DK-I-56-1 u dozi od 10 mg/kg, sa postignutim terapijskim efektima primenom supstance DK-I-87-1 u istoj dozi i placebom, praćenjem izazvanog bolnog nadražaja reakcijom eksperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima, na modelu hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca;
7. Ispitati nivo ekspresije $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice GABAA receptora, kao i NKCC1 i KCC2 hlornih kontransportera kod pacova kojima je podvezan nerv bez primene terapijske doze leka, Real time PCR metodom;
8. Uporediti nivo ekspresije $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice GABAA receptora, kao i NKCC1 i KCC2 hlornih kontransportera, kod pacova kojima je podvezan nerv u odnosu na grupu životinja kojima nerv nije podvezan, Real time PCR metodom.

3. MATERIJAL I METODE

Laboratorijsko ispitivanje na oglednim životinjama sprovedeno je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za farmakologiju, po protokolu koji je u skladu sa principima dobre laboratorijske prakse (*OECD principles of Good Laboratory Practise*), kao i sa EU smernicama 2010/63, a deo istraživanja je urađen na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Odeljenju za genetska i molekularna istraživanja. Ogledi su sprovedeni u sklopu realizacije projekata osnovnih istraživanja pod brojem 175076 i 175021 finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog saveta za dobrobit životinja Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine, Uprava za veterinu (rešenje br. 323-07-11255/2016-05).

3.1 Ogledne životinje

U ogledima su korišćeni mužjaci albino pacova *Wistar* soja (Vojna farma, Beograd) stari oko 8 nedelja, težine 160-180 g na dolasku (110 životinja: 33 pacova za farmakokinetičke studije; 65 za ispitivanje modela trigeminalne neuropatije i terapijske efekte ispitivanih supstanci; 12 životinja za Real time PCR). Pacovi su čuvani pojedinačno, osim za farmakokinetičke studije (3-4 u kavezu) u standardnim kavezima od pleksiglasa (142 mm × 265 mm × 180 mm). Pristup vodi i hrani bio je *ad libitum*. Prostirka je menjana tri puta nedeljno (ponedeljak, sreda, petak). Životinje su bile smeštene u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta, na konstantnoj temperaturi od $21 \pm 1^\circ\text{C}$, relativnoj vlažnosti vazduha 40-70% i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (osvetljenje od 6 h, intenzitet svetla 120 lx). Sva ispitivanja su rađena tokom svetle faze ciklusa od 09 -16:00 h.

3.2 Korišćene supstance

Oglednim životinjama su intraperitonealno bile primenjene supstance DK-I-56-1 (7-metoksi-2-(4-(metoksi-d3)fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on) i DK-I-87-1 (8-hloro-2-(2-(metoksi-d3)fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on) koje su sintetisane na Univerzitetu u Viskonsinu (University of Wisconsin – Milwaukee, SAD). Supstance su formulisane u obliku biokompatibilne nanoemulzije DK-I-56-1 i DK-I-87-1 (videti u Postupak izrade nanoemulzije).

3.2.1 Formulacija supstanci

Prilikom različitih farmakokinetičkih ispitivanja na životinjama uobičajeno je da se koristi suspenzija rastvorenih supstanci. Međutim, u literaturi se sreću različite formulacije, s ciljem da se povećaju bioraspoloživost i koncentracija na mestu dejstva. Jedna od mogućnosti je rastvaranje supstance sa 20% dimetilsulfoksidom (DMSO), čime se postiže brže dejstvo, kao i bolja ujednačenost doze koja se primenjuje, jer su rastvori homogeniji sistemi u odnosu na suspenziju, kod koje može doći do taloženja i razdvajanja faza. Mana ove formulacije je što se kao rastvarač koristi nebiokompatibilni organski rastvarač DMSO. Za eksperimente u kojima se pomenuta formulacija aplikuje životinjama jednokratno, to može da bude prihvatljivo, ali takva formulacija nije pogodna za ponavljaju primenu ili primenu na ljudima, iako se smatra da niske koncentracije DMSO nisu toksične. Ipak, u literaturi je pokazano je da čak i niske koncentracije DMSO (2-4%), dovode do različitih procesa unutar ćelije što rezultuje apoptozom (Galvao i sar., 2014).

Nanoemulzija je biokompatibilni koloidni sistem sa submikronskim česticama veličine 20 do 200 nm, koji je formulisan radi prevazilaženja nedostataka uobičajenih formulacija za isporuku lekova (npr. suspenzije). Nanoemulzije su dvofazni termodinamički stabilni sistemi, u kojima su čestice vodene faze rastvorene u česticama masne faze (ili obrnuto), uz prisustvo emulgatora-surfaktanta ili kosurfaktanta. Nanoemulzija povećava efikasnost leka, smanjuje neželjene efekte, netoksična je i ne iritira, omogućava rastvaranje u vodi nerastvorljivih molekula, ima veću fizičko-hemijsku stabilnost, ubrzava ulazak leka u ćelije i maskira neprijatan ukus masne faze (Jaiswal i sar., 2015). Zbog solubilizacije, afiniteta prema membranama i veće slobodne površine kapljica unutrašnje faze, poboljšana je bioraspoloživost i isporuka kroz lipidne barijere, uključujući i krvno-moždanu barijeru, a time i permeabilnost (Matougui i sar., 2016).

Lipidne komponente nanoemulzije su najčešće fosfolipidi, holesterol, trigliceridi, žučne soli ili slobodne masne kiseline, koje su neškodljive, biokompatibilne i biorazgradive, mogu biti izolovane iz prirodnih izvora i imaju poznat farmakološki profil (Matougui i sar., 2016). Emulgator treba da bude netoksičan a njegov ukus, miris i hemijska stabilnost treba da budu u skladu sa vrstom supstance koja se rastvara. Nanoemulzije su pogodni sistemi za ciljanu isporuku lekova i modifikaciju farmakodinamičkih i farmakokinetičkih osobina, budući da molekuli aktivne supstance mogu da budu inkorporirani u kapljicama kako vodene, tako i masne faze. Na ovaj način, osetljive aktivne supstance se i štite od agresivnih *in vitro* i *in vivo* uslova i izbegavaju se neželjeni efekti leka zahvaljujući njegovoj ciljanoj isporuci (Matougui i sar, 2016).

3.2.2 Postupak izrade nanoemulzije

Nanoemulzija je pripremljena homogenizacijom pod visokim pritiskom na temperaturi od 50°C, nešto izmenjenom procedurom u odnosu na Đorđević i sar. (2015). Masna i vodena faza su zasebno pripremane. U laboratorijskoj čaši najpre su odmerene komponente masne faze: 20% ulje (koje je mešavina triglicerida srednje dužine lanca (Fargon GmbH & KG, Barsbuttel, Germany) i ricinusovog ulja (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) u masenom odnosu 2:1), 2% lecitin iz soje (Lipoid S 75) (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany) i 0,05% antioksidans butil-hidroksitoluen (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Zatim su komponente masne faze otopljene na 75°C, uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici, dok lecitin nije u potpunosti rastvoren. Komponente masne faze su nakon mešanja, ostavljene da se ohlade na 50°C. U drugoj čaši odmeren je 2% DMSO (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) i dodata preračunata količina supstance (DK-I-56-1 ili DK-I-87-1), tako da se dobija željena koncentracija nanoemulzije, nakon čega je rastvor supstance sonifikovan kratko na ultrazvučnom kupatilu. Rastvor supstance u DMSO, dodat je u uljanu fazu uz mešanje na magnetnoj mešalici. DK-I-56-1 ili DK-I-87-1 su rastvoreni u 2% DMSO kao ko-rastvaraču, a pripremljeni rastvor (90,91 mg/g) je dodat u masnu fazu da bi se dobila aktivna koncentracija supstance od 2 mg/g. Dok se rastvaraju i mešaju komponente masne faze, u trećoj čaši bile su odmerene komponente vodene faze i zagrejane na 50°C. Komponentne vodene faze su: veoma prečišćena voda, 0,03% natrijum-oleat (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany) i 2% polisorbitat 80 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Veoma prečišćena voda dobijena je na GenPure aparatu (TKA Wasseranfertigungssystem GmbH, Neiderelbert, Germany). Pomoću termometra proverene su temperature masne i vodene faze (bilo je potrebno da budu 50°C), a zatim je dodata vodena u masnu fazu uz mešanje na magnetnoj mešalici. Kada su se faze sjedinile, smeša je

stavljena na rotor stator homogenizator (IKA Ultra-Turaks[®], T25 digital IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany), na 10 000 rpm u trajanju od 3 minuta čime je dobijena preemulzija. Preemulzija se dalje propušta kroz homogenizator (EmulsiFlex-C3, Avestin Inc., Ottawa, Canada) pri pritisku od 800 bar i temperaturi od 50°C, kroz 10 ciklusa, pri čemu se dobija nanoemulzija. Dobijena nanoemulzija je bila aseptično filtrirana kroz 0,22 µm membranu i sipana u staklene bočice. Prazna nanoemulzija je pripravljena na isti način prethodno opisanim postupkom, bez DK-I-56-1 ili DK-I-87-1.

Tabela 1. Sastav pripravljene nanoemulzije: masna faza sastoji se od emulgovane supstance, DMSO, MCH, ricinusovog ulja, lecitina iz soje i BHT; vodena faza se sastoji od polisorbata 80, natrijum-oleata i ultra čiste vode; DMSO – dimetilsulfoksid; MCH – trigliceridi srednje dužine lanca; BHT – butilhidroksitoluen; P-NE – prazna nanoemulzija; DK-NE – nanoemulzija sa emulgovanom supstancom DK-I-56-1;

Sastojci (% masenog udela)	Formulacija	
	P-NE	DK-NE
Masna faza		
DK-I-56-1	–	0,2
DMSO	2	2
MCH	13,33	13,33
Ricinusovo ulje	6,67	6,67
Lecitin iz soje	2	2
BHT	0,05	0,05
Vodena faza		
Polisorbat 80	2	2
Natrijum oleat	0,03	0,03
Ultra čista voda	100	100

Nakon pripreme, sve supstance su čuvane na 25°C, a nakon 24 h vršena je njihova karakterizacija. Sva merenja su rađena u triplikovima. Nanoemulzija se sastoji od 13,33% triglicerida srednje dužine lanca, 6,67% ricinusovog ulja, 2% lecitina iz soje, 0,03% natrijum-oleata, 2% polioksi-etilen-sorbitan-monooleata, 0,05% butil-hidroksitoluena, 2% DMSO i 73,67% ultra čiste vode.

3.2.3 Deuteracija

Deuterizacija je proces u kome atom vodonika biva zamenjen atomom njegovog izotopa deuterijuma. Izotopi su atomi jednog istog elementa, koji se razlikuju po broju neutrona u jezgru i shodno tome, molekularnoj masi. Jedan od najšire upotrebljivanih izotopa u farmaceutskoj industriji jeste deuterijum, izotop vodonika, sa jednim protonom i jednim neutronom u jezgru. Vodonik i deuterijum ispoljavaju gotovo identične fizičke osobine, tako da je deuterizacija najmanja strukturna promena koja može da se izvrši na molekulu, a da originalno jedinjenje i deuterisani analog zadrže približno, ali ne i stopostotno, iste fizičko-hemijske osobine (Buteau, 2009). Male razlike u fizičkim osobinama deuterisanih jedinjenja u odnosu na originalno jedinjenje, nemaju uticaj na afinitet ili selektivnost čestice za njeno vezno mesto (Howland, 2015).

Deuteracija potencijalnih lekova može da promeni farmakokinetičke i farmakodinamičke osobine kao i toksikološki profil jedinjenja. Dobre osobine deuterisanih lekova su povećana efikasnost, smanjena toksičnost, smanjena varijabilnost između pacijenata, smanjena doza ili interval doziranja (Sharma i sar., 2012).

Uzrok gotovo svih razlika između nedeuterisanih i deuterisanih jedinjenja jeste različit metabolizam, što se označava kao kinetički efekat izotopa deuterijuma (*kinetic deuterium isotope effect – KDIE*). Ovaj efekat je posledica različite jačine veze između ugljenika i vodonika i ugljenika i deuterijuma, koje su po drugim osobinama iste. Zbog veće mase deuterijuma u odnosu na vodonik, veza ugljenik-deuterijum je 10 puta jača i teže se raskida, i hemijski i enzimski. Ukupan metabolizam se smanjuje kod deuterisanih jedinjenja, a neretko i menja, ako se jedinjenje metaboliše kroz više različitih metaboličkih puteva. Mnogobrojni su primeri efekata deuteracije na metabolizam biološki aktivnih jedinjenja – jedan od takvih je anestetik hloroform, koji se *in vivo* metaboliše do fozgena, veoma reaktivno agensa, a deuteracijom se smanjuje stepen metabolizma, usled čega se smanjuje njegova pulmotoksičnost i hepatotoksičnost. Nasuprot hloroformu, deuteracija 1,2-dibrometana povećava njegovu toksičnost, zbog toga što se usporavanjem metabolizma ovo reaktivno jedinjenje duže zadržava u organizmu. Deuterisani diazepam ne ispoljava antikonvulzivni efekat, jer je sprečena oksidacija do njegovog aktivnog oblika, oksazepam (Buteau, 2009).

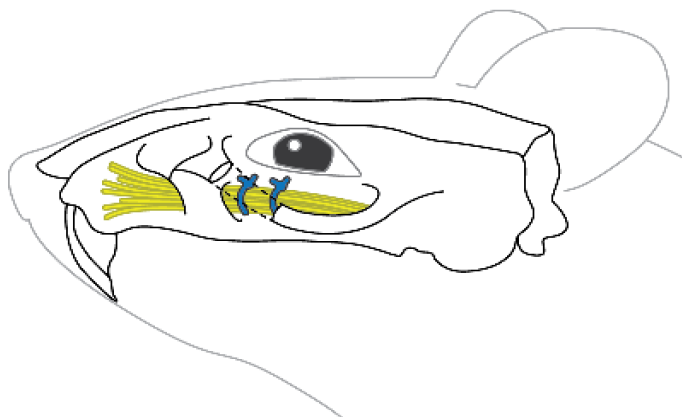
Kada se lek metaboliše u više različitih puteva, bitno je znati kakav je doprinos kog metaboličkog puta, mesta na kome se promene dešavaju, koji su enzimi uključeni i da li se očekuje da se ispolje KDIE na klirens deuterisanog jedinjenja. Ako je klirens jedinjenja nizak, deuteracija povećava izloženost i poluvreme eliminacije. Suprotno, ako je klirens visok, deuteracija će smanjiti efekat prvog prolaza i povećati izloženost, ali neće uticati na poluvreme eliminacije (Buteau, 2009).

3.3 Farmakokinetička analiza

Uzorci krvi (2 ml) za farmakokinetičku analizu uzimani su heparinizovanim špricевima, srčanom punkcijom životinja koje su prethodno anestetizirane intraperitonealno kombinacijom ketamin hidrohlorida (90 mg/kg, Ketamidol[®], Richter Pharma AG, Wels, Austria) i ksilazin hidrohlorida (10 mg/kg, Xylazed[®], Bioveta, A. S., Ivanovice na Hani, Czech Republic). Krv je sakupljana u heparinizovane ependorf tube od 2 ml, nakon čega je centrifugirana tokom 10 minuta na 800 rcf, da bi se dobila plazma. Nakon dekapitacije, mozgovi životinja su izolovani, preneti u plastične tube od 50 ml i izmereni, a zatim homogenizovani dodatkom 5 ml metanola (IKA Ultra-TurraxRT25 digital), i centrifugirani tokom 20 minuta na 3340 rcf, da bi se izdvojio supernatant. Koncentracije liganda DK-I-56-1 dobijene su iz plazme i supernatanta čvrsto-tečnom ekstrakcijom korišćenjem Oasis HLB kertridža (Waters Corporation, Millford, Massachusetts), na sledeći način: kertridži su najpre kondicionirani metanolom i destilovanom vodom. Nakon toga, na kolone su naneti uzorci (po 250 µl plazme ili homogenata mozga) i 50 µl internog standarda (SH-I-048A). Endogene nečistoće uklonjene su ispiranjem kertridža destilovanom vodom i metanolom. U finalnom koraku, uzorak je eluiran sa 1 ml metanola, i prenet u vijale iz kojih je ligand kvantifikovan *Ultra high performance liquid chromatography tandem* masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS) sa Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX triple quadrupole spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, California) koji koristi jonizaciju u elektrospreju (Obradović i sar., 2014). Preračunavanjem, dobija se krajnji rezultat koji predstavlja koncentraciju u plazmi (nmol/l) ili u mozgu (ng/g).

3.4 Model hronične konstriktione povrede n. infraorbitalis-a

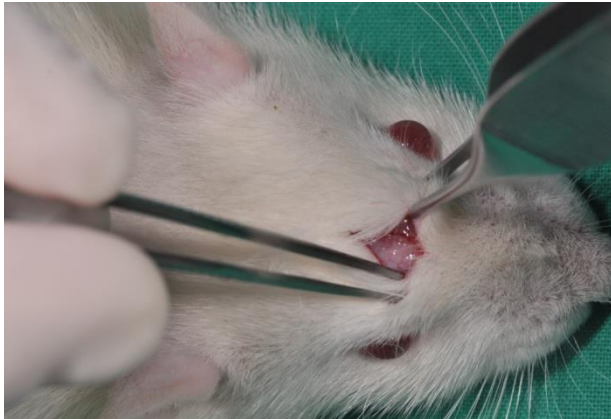
Operativna procedura je sprovedena u skladu sa prethodno opisanim protokolom (Vos i sar., 1994; Deseure i Hans, 2015). Levi infraorbitalni živac podvezan je u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta. Pacovi su anestetizirani kombinacijom ketamin hidrohlorida (60 mg/kg) i ksilazin hidrohlorida (10 mg/kg) intraperitonealno, a operativna procedura je izvršena bez upotrebe mikroskopa i stereotaksičnog okvira. Mesto na kome su pozicionirane ligature, šematski je prikazano je na Slici 4.



Slika 4. Šematski prikaz lokalizacije infraorbitalnog nerva i pozicije ligatura; kod svake eksperimentalne životinje plasirane su po 2 ligature na međusobnoj udaljenosti od oko 1 mm

Na glavi pacova napravljen je rez na srednjoj liniji poglavine (Slika 5). Infraorbitalni deo leve grane infraorbitalnog nerva bio je eksponiran zasecanjem kraja orbite koji čine gornjevilična, čeona, suzna i zigomatična kost. Nakon pristupa infraorbitalnom nervu (Slika 6), živac je podvezan resorptivnim koncem 5-0 (Slika 7), postavljanjem dve ligature na međusobnoj udaljenosti od oko 2 mm. Živac je podvezan tako da ligatura vidljivo smanji promer nerva (Slika 8), ali da ne dođe do prekida cirkulacije u površinskoj vaskularnoj mreži (Bennet i Xie, 1988). Rana je ušivena svilenim koncem (5-0), a životinje su raspoređene pojedinačno u kavezima do

oporavka. U kontrolnoj grupi, istom hirurškom procedurom pristupljeno je infraorbitalnom živcu, ali on nije podvezan.



Slika 5. Mesto pravljenja reza na glavi pacova, na srednjoj liniji poglavine



Slika 6. Identifikovanje stabla levog infraorbitalnog živca pre podvezivanja



Slika 7: Podvezivanje levog infraorbitalnog živca plasiranjem jedne a nakon toga i druge ligature



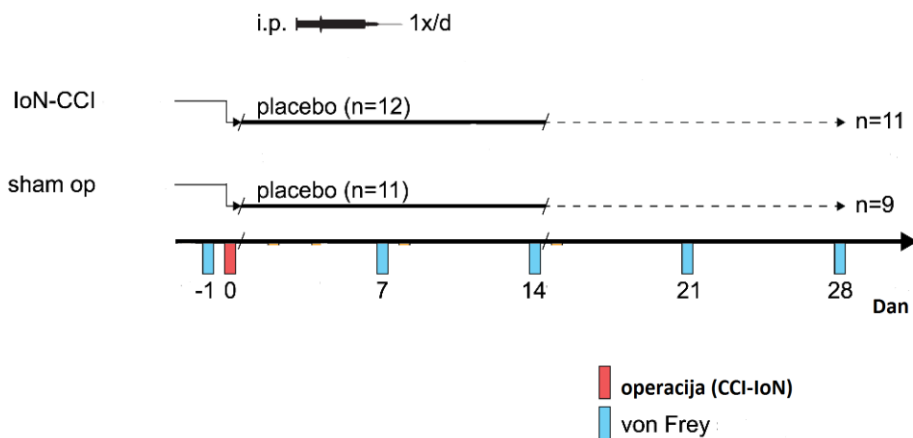
Slika 8.: Živac nakon podvezivanja-vidljiv je smanjen promer živca ali bez prekida cirkulacije

3.5 Dizajn studije

Laboratorijska ispitivanja na oglelnim životinjama podeljena su u 4 oglela:

1. U **prvom** oglelu (N=33) ispitana je dozno-zavisana efekta 4 različite doze DK-I-56-1 (2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg i 20 mg/kg) radi određivanja njihove koncentracije u krvi i moždanom tkivu 1 sat nakon intraperitonealne primene jedne doze supstance. Svaka pojedinačna doza je primenjena kod 3 oglelne životinje. Na osnovu utvrđenih molarnih koncentracija supstance u krvi i mozgu, i njenom korelacijom sa prethodnim istraživanjima biološke aktivnosti DK-I-56-1 (saradnička laboratorija na Medicinskom fakultetu Univerzitetu u Beču, Austrija), utvrđena je izabrana doza DK-I-56-1. Ova doza je nadalje korišćena za ispitivanje njenog farmakokinetičkog profila, nakon primene jedne doze posle 5 min i 20 min, a potom posle 1 h, 3 h, 12 h, 24 h i 48 h. Parametri farmakokinetičkog profila od interesa su maksimalna koncentracija leka u plazmi i moždanom tkivu (C_{max}), vreme postizanja maksimalne koncentracije leka (t_{max}), poluvreme eliminacije leka ($t_{1/2}$) i površina ispod krive (AUC_{0-12}). Za svaki opservacioni period (5 min, 20 min, 1 h, 3 h, 12 h, 24 h i 48 h) žrtvovane su po 3 oglelne životinje.
2. U **drugom** oglelu (N=23) ispitana je validnost modela hronične konstrikcione povrede, kao uzroka za nastanak trigeminalne neuropatije. Oglelne životinje su podeljene u 2 grupe: u eksperimentalnoj grupi životinjama je podvezan infraorbitalni živac (hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca – IoN-CCI), dok kod kontrolne grupe, nakon hirurškog pristupa, pomenuti nerv nije podvezan. Obe grupe su primale placebo u obliku prazne nanoemulzije (bez emulgovane supstance) u dozi 10 mg/kg, jednom dnevno, tokom 14 uzastopnih dana, počevši od prvog dana nakon operacije. Nadalje, praćenjem izazvanog bolnog ponašanja 7-og, 14-og, 21-og.

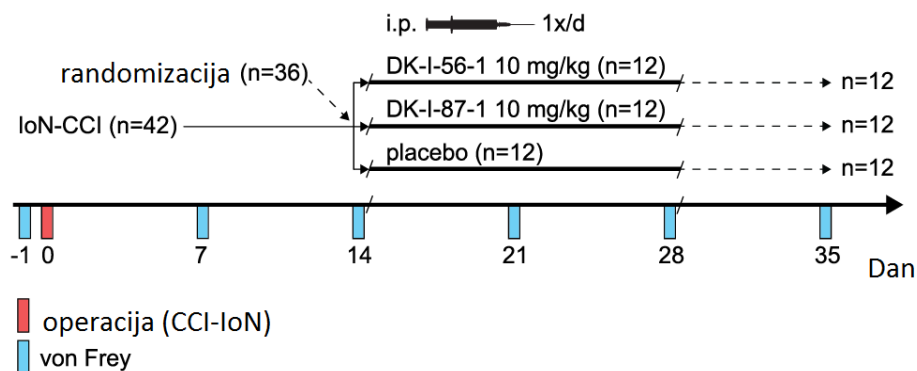
i 28-og dana posle operacije, primenom von Frey filamenata, utvrđena je validnost primenjenog modela jednostruko slepim istraživanjem (Slika 9).



Slika 9. Vremenski tok ogleda-validacija eksperimentalnog modela hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca, nakon i.p. primene placeba (prazne nanoemulzije); kod životinja je praćen odgovor na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima u prethodno definisanom vremenskom intervalu (jedan dan pre operacije, 7., 14., 21. i 28. dana posle podvezivanja živca); IoN-CCI-hronična konstriktiona povreda infraorbitalnog živca, životinje kojima je živac podvezan; sham op- životinje koje su operisane ali živac nije podvezan

3. U trećem ogledu (N=42) praćen je terapijski efekat DK-I-56-1 i DK-I-87-1 u lečenju razvijene neuropatije, na prethodno validiranom modelu hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca. Nakon opservacionog perioda od 14 dana posle podvezivanja infraorbitalnog nerva, utvrđena je bolna preosetljivost na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima, u odnosu na bazalne vrednosti, čime je potvrđeno postojanje trigeminalne neuropatije. Shodno tome, ogledne životinje sa razvijenom trigeminalnom neuropatijom su nasumično podeljene u 3 ogledne grupe u zavisnosti od primenjenog tretmana: a) DK-I-56-1, b) DK-I-87-1 ili c) placebo. Dalje komparativno istraživanje sprovedeno je od 15-og dana, svakodnevno, i.p. primenom jedne doze DK-I-56-1, DK-I-87-1 ili placebo u periodu od narednih 14 dana, dok je praćenje bolne preosetljivosti na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima

bilo sprovedeno 21-og, 28-og i 35-og dana. Merenje reaktivnosti su izvodili istraživači koji nisu imali informaciju o primenjenim tretmanima (dizajn slepog istraživanja) (Slika 10).



Slika 10. Vremenski tok oglada-terapijski efekat nanoemulzije DK-I-56-1, DK-I-87-1 ili placebo nakon i.p. primene u dozama od 10 mg/kg na eksperimentalnom modelu hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca; kod svih oglednih životinja je podvezan levi infraorbitalni živac, a odgovor životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima je praćen u prethodno definisanom vremenskom intervalu (jedan dan pre operacije, 7, 14, 21, 28 i 35 dana posle podvezivanja živca); IoN-CCI- hronična konstriktiona povreda infraorbitalnog živca, životinje kojima je živac podvezan

4. U četvrtom ogledu (N=12) određena je ekspresija $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice GABAA receptora, kao i NKCC1 i KCC2 hlornih kotransportera Real time PCR metodom, na prethodno validiranom modelu hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca. Životinje su podeljene u dve grupe-eksperimentalna grupa kojoj je živac podvezan (IoN-CCI) i kontrolna grupa životinja (sham), kod kojih posle hirurškog pristupa nije bilo podvezivanja nerva. Nakon opservacionog perioda od 14 dana posle podvezivanja infraorbitalnog nerva, utvrđena je bolna preosetljivost na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima, u odnosu na bazalne vrednosti, čime je potvrđeno postojanje trigeminalne neuropatije kod životinja kod kojih je živac podvezan. U skladu sa dobijenim rezultatima, iz eksperimentalne grupe odabrane su samo životinje kod kojih se razvila bolna preosetljivost. Životinje su žrtvovane 15. dana posle podvezivanja živca,

radi uzimanja uzoraka trigeminalnog gangliona kako bi bila ispitana ekspresija navedenih proteina. Ekspresija proteina određena je na uzorcima desnog i levog trigeminalnog gangliona, uzetih od životinja eksperimentalne (IoN-CCI), kao i od pacova kontrolne grupe (sham).

3.6 Praćenje izazvanog bolnog ponašanja (mehaničke alodinije)

Praćenje izazvanog bolnog ponašanja podeljeno je u dva dela: prvi deo istraživanja odnosio se na proces prilagođavanja oglednih životinja po principu privikavanja na uslove smeštaja u plastičnim kavezima kao i u staklenim kavezima u kojima je praćeno njihovo ponašanje. Po dolasku u vivarijum, ogledne životinje su se privikavale na uslove čuvanja tokom dva dana, pre početka privikavanja na von Frey filamente. Nakon toga, ogledne životinje su pojedinačno prenošene u kavezima u kojima su čuvane, do prostorije gde je sprovedeno privikavanje i praćenje ponašanja, a zatim su premeštene u staklene kaveze (250 x 150 x 165 mm) sa metalnim poklopcem. Navikavanje i praćenje ponašanja izvodili su se u osvetljenoj sobi sa indirektnom belom svetlošću (neonske lampe pričvršćene za zid), bez pozadinskog zvuka. Životinje su se navikavale na von Frey filamente svakodnevno, po 15 minuta, počevši od sedmog dana pre beleženja bazalnih vrednosti do kraja oglada. Svakih 30-ak sekundi, istraživač je podizao poklopac kaveza i dodirivao zid kaveza plastičnim štapićem. Privikavanje životinja, kao i praćenje ponašanja, sprovedeni su u periodu od 9 do 14 h. Supstance su primenjivane nakon privikavanja ili praćenja ponašanja koje je bilo sprovedeno tog dana, u periodu od 15 do 16 h.

U cilju ispitivanja mehaničke alodinije, korišćena je serija kalibrisanih von Frey filamenata (Aesthesio® Von Frey Kit, Touch Sensory Evaluator, Ugo Basile, Varese, Italy) koji su se

primenjivali na koži lica u predelu vibrisa, na strani na kojoj je podvezan živac. Jedan dan pred operaciju, bile su utvrđene bazalne vrednosti odgovora na von Frey filamente. Pacovi su raspoređeni pojedinačno u staklene kaveze po grupama kao i u procesu privikavanja, a u drugom ogledu u kome je validiran metod hronične konstrikcione povrede korišćena je serija od tri von Frey filamenta rastućih gramaža od 1 g, 2 g i 6 g. U trećem ogledu u kome se ispitivao terapijski efekat DK-I-56-1 korišćeni su von Frey filamenti od 0,6 g, 1,4 g i 4 g. Svaka ogledna životinja dodirnutu je 3-5 puta filamentom jedne gramaže u razmaku od nekoliko sekundi u predelu vibrisa na strani na kojoj je podvezan živac, da bi se dodelila jedinstvena ocena. Svaka reakcija na nadražaj ogledne životinje registrovana je sledećom skalom: 0 – izostanak odgovora, 1 – otkrivanje nadražaja, 2 – reakcija blagog povlačenja glave od nadražaja i/ili pojedinačni pokret brisanja nadražene zone lica, 3 – reakcija izbegavanja ili napada, 4 – asimetrično ponavljano brisanje lica, najmanje tri u seriji, usmereno ka nadraženoj zoni (Vos i sar., 1994). Za svaku životinju, izračunata je srednja vrednost odgovora na seriju od tri filamenta, koja je korišćena u statističkoj analizi. Manja ocena ukazivala je na slabiji odgovor na mehaničku stimulaciju filamentima, a veća ocena ukazivala je na jači, bolni (alodinijski) odgovor. U drugom ogledu, ispitivanje mehaničke alodinije rađeno je 7-og, 14-og, 21-og i 28-og dana nakon operacije. U trećem ogledu, ispitivanje je vršeno 7-og, 14-og, 21-og, 28-og i 35-og dana za životinje koje su ispunile zadati kriterijum uključivanja. U četvrtom ogledu, ispitivanje je vršeno 7-og i 14-og dana nakon podvezivanja infraorbitalnog živca.

Kriterijum za isključenje životinja iz statističke analize je prethodno utvrđen, i to za grupu životinja kojima je podvezan živac, a koje su primale placebo – ukoliko je odgovor na stimulaciju von Frey filamentima bio manji nakon podvezivanja živca u poređenju sa bazalnim vrednostima, a za grupu koja je operisana, a živac nije podvezan, a primala je placebo – ukoliko je odgovor na

stimulaciju von Frey filamentima bio veći nakon podvezivanja živca u poređenju sa bazalnim vrednostima, a prosečna razlika u odgovoru bila je veća ili jednaka 1,25 poena. Za ispitivanje ekspresije proteina (ogled 4), od životinja od kojih su uzeti uzorci trigeminalnih gangliona, važili su isti kriterijumi za isključenje, iako životinje nisu primale placebo nanoemulziju već su bile bez tretmana.

3.7 Određivanje ekspresije $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice GABAA receptora, NKCC1 i KCC2 klornih kotransportera u trigeminalnom ganglionu

Na dan uzimanja uzoraka, životinje su bile anestetizirane kombinacijom ketamina i ksilazina, a zatim dekapitirane. Nakon osteotomije i uklanjanja moždanog tkiva, trigeminalni ganglion izolovan je uz korišćenje svetlosnog mikroskopa tako što bi najpre bilo identifikovano stablo trigeminalnog živca i njegovih završnih grana na bazi lobanjske jame. Imajući u vidu da se ganglion nalazi na račvi trigeminalnog živca i njegovih završnih grana, isecanjem pomenutih grana, uzeto je i tkivo gangliona. Od životinja obe grupe, uzeti su uzorci desnog i levog trigeminalnog gangliona. Uzorci su dalje čuvani na -80°C .

3.7.1 Izolacija RNK za ispitivanje genske ekspresije

Nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodato 0,5 ml TRIzol® Reagent-a. Resuspendovanjem pomoću nastavka pipete uzorci su homogenizovani, a potom je dodat 0,1 ml hloroforma na svakih 0,5 ml inicijalno dodatog TRIzol® Reagent-a. Nakon jakog ručnog

mućkanja 15 sekundi, uzorak je centrifugiran na 12000 x g u trajanju od 15 minuta na +4° C. Posle centrifugiranja jasno su odvajane tri faze, donja-crvena (fenol-hloroformska), središnja i gornja-vodena faza koja je bezbojna. Vodena faza je pažljivo aspirirana i prebačena u novu tubicu, dodato je 0,25 ml izopropanola na svakih 0,5 ml inicijalno dodatog TRIzol® Reagent-a, a potom su tubice inkubirane na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta tubice su centrifugirane na 12000 x g u trajanju od 10 minuta na +4°C, a zatim je aspiriran i odstranjen supernatant. Pelet je ispran sa 0,5 ml 75% etanola na svakih 0,5 ml inicijalno dodatog TRIzol® Reagent-a, pa lagano vorteksovan, a zatim centrifugiran na 7500 x g 5 minuta na +4°C. Nakon centrifugiranja je opet odstranjen supernatant, a tubice su ostavljene na sobnoj temperaturi otvorene 10 minuta. Pelet je resuspendovan u 10 µl vode bez RNA-za i inkubiran u vodenom kupatilu na 55°C u trajanju od 15 minuta, nakon čega su uzorci čuvani na -80°C.

3.7.2 Određivanje koncentracije i čistoće uzoraka

Nakon izolacije RNK, koncentracija i čistoća merena je na spektrofotometru (NanoDrop 2000C Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA). Za analizu, korišćeno je 2 µl izolovane RNK, posle čega je kompjuterski dobijan rezultat koncentracije i čistoće uzoraka.

3.7.3 Reverzna transkripcija – lančana reakcija polimeraze

Za detekciju ekspresije gena korišćena je metoda reverzne transkripcije u kombinaciji sa Real Time PCR-om (RT-PCR). Reverznom transkripcijom se nakon izolacije RNK iz uzoraka, ona prepisuje u komplementarnu DNK uz pomoć enzima reverzne transkriptaze. Tako sintetisana komplementarna DNK se zatim koristi u RT-PCR metodi u cilju kvalitativne i kvantitativne

procene ekspresije određenog gena. Receptura za reakcionu smešu prikazana je u Tabeli 2. Za reverznu transkripciju korišćen je Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, Vilnius, Lithuania). Zapremina RNK koja se dodaje u reakcionu smešu preračunata je prema izmerenoj koncentraciji tako da je za svaku reverznu transkripciju korišćeno 1,2 µg RNK.

Tabela 2. Receptura za reakcionu smešu

Sastav	Zapremina (µl)
RNK	Odgovarajuća zapremina u µl kako bi prema izmerenoj koncentraciji bilo 1 µg RNK
Revert Aid	1
Ribolock	1
dNTP mix	2
Oligo dt	1
Reakcioni pufer	4
H₂O	Odgovarajuća zapremina do 30 µl ukupne zapremine reakcione smeše

Program reverzne transkripcije uključivao je dva koraka inkubacije, nakon čega je reakcija zaustavljena zagrevanjem uzorka na 70°C u trajanju od 5 minuta. Uzorci su do dalje analize čuvani na -70°C.

Tabela 3. Uslovi za reverznu transkripciju

Broj inkubacija	Vreme/ciklusi (min)	Temperatura (°C)
Inkubacija 1	5 min	25
Inkubacija 2	60 min	42
Inkubacija 3	5 min	70

3.7.4 Real time PCR

Umnožavanje jednog dela ispitivanih gena vršeno je u prisustvu fluorescentne boje SYBR Green iz komercijalnog kita SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline, London, UK). Osnovna karakteristika ove boje je sposobnost ugrađivanja u dvolančane DNK proizvode, zahvaljujući čemu je reakciju PCR-a moguće pratiti u realnom vremenu (Real time PCR). Uporedo sa umnožavanjem gena za $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice GABAA receptora, NKCC1 i KCC2 hlorne kotransportere, umnožavan je i gen za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH), čiji nivo ekspresije ne zavisi od tretmana, te ga stoga možemo koristiti kao endogenu kontrolu. Za umnožavanje su korišćeni specifični prajmeri čije su sekvence date u Tabeli 4. RT-PCR je sproveden pod standardnim temperaturnim uslovima (uslovljenim tipom polimeraze iz komercijalnog kita i sekvencama korišćenih prajmera): inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju 12 minuta (radi aktivacije polimeraze), 40 ciklusa od po tri koraka: 95°C u trajanju 30 sekundi, 56°C u trajanju 30 sekundi i 72°C u trajanju 30 sekundi. Radi provere specifičnosti PCR reakcije, na kraju svake reakcije rađena je analiza krive topljenja PCR produkata. RT-PCR analize rađene su korišćenjem LineGeneK kvantitativnog PCR sistema (BIOER Technology Co., Hangzhou, China) i svi uzorci su analizirani u duplikatu. Relativni nivo ekspresije gena izračunavan je korišćenjem tzv. *comparative critical threshold* ($\Delta\Delta Ct$) metoda (Livak i Schmittgen 2001). Prosečne Ct vrednosti su određene za $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice GABAA receptora, NKCC1 i KCC2 gen u svim uzorcima, a relativni nivo genske ekspresije definisan je u odnosu na ekspresiju GAPDH gena (ΔCt vrednosti-vrednosti dobijene oduzimanjem srednje vrednosti duplikata uzoraka GAPDH gena od srednje vrednosti duplikata ispitivanog gena za svaki pojedinačni uzorak). Nakon dobijanja ΔCt vrednosti za svaki od određenih gena, za svaki uzorak (kako levog tako i desnog ganglionu) određena je $\Delta\Delta Ct$ vrednost, oduzimanjem prosečne

Δ Ct vrednosti životinja kontrolne grupe (životinje kojima je živcu pristupljeno ali on nije podvezan; shamova) od Δ Ct vrednosti životinja kojima je podvezan živac. Nakon toga, određene su vrednosti relativne ekspresije pojedinačnih gena matematičkom formulom $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za Real time PCR

Gen	Forward	Reverse
GABAA α5	TTGGAAGCAGCTAAAATC	GAAGTCTTCTCCTCAGATGCTCT
GABAA α6	CACTCTGACTCCAAGTACCATCTG	GTACACAAGGTTGAATCCTG
GABAA γ2	CGGAAACCAAGCAAGGAT	TCTCTTGAAGGTGGGTGGCA
NKCC1	AGGAGCATTCAAGCACAGCTAATA	CGCTCTGATGATTCCCACGA
KCC2	GCGGGATGCCAGAAAGTCTA	GATGCAGGCTCCGAACAGAACA
GAPDH	GATGACATCAAGAAGGTGGTGA	TGCTGTAGCCGTATTCATTGTC

3.8 Statistička analiza

Statistička analiza podataka bihevioralnih testova je urađena uz pomoć SPSS 17.0 i Sigma Plot 11.0 softvera. Svi podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm SEM. Farmakokinetički parametri, maksimalna koncentracija (C_{max}), vreme postizanja maksimalne koncentracije (t_{max}), poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$) i površina ispod krive (AUC_{0-12}), izračunati su pomoću PK Funkcije za Microsoft Excel softver (Joel L. Usansky, Atul Desai i Diane Tang-Liu, Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, California; <http://www.boomer.org/pkin/soft.html>).

U ogledu dva, dobijeni podaci u odgovoru na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima obrađeni su Studentovim t-testom za nezavisne uzorke, a statistički značajna razlika određena je sa $p < 0,05$.

U ogledu tri, podaci dobijeni u odgovoru na von Frey filamente obrađeni su korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (jednofaktorska ANOVA) za dati dan, sa tretmanima kao različitim faktorom između grupa. U slučajevima u kojima je potvrđena statistički značajna razlika ($p < 0,05$), korišćen je SNK *post hoc* test. Iako je odgovor na stimulaciju von Frey filamentima ordinalna varijabla, korišćeni su parametarski testovi kako je prethodno opisano u literaturi, radi boljeg grafičkog prikaza statističkih rezultata (Deseure i sar., 2003).

U četvrtom ogledu, odgovor životinja na von Frey filamente pre uzimanja uzoraka za ispitivanje genske ekspresije različitih GABAA podjedinica, kao i hlornih kotransportera, obrađeni su korišćenjem Studentovog t-testa za nezavisne uzorke, a statistički značajna razlika određena je sa $p < 0,05$. U istom ogledu, stepen promene genske ekspresije između desnih i levih trigeminalnih ganglionu kod životinja kojima je živac podvezan, upoređivan je Mann Whitney U-testom, $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1 Farmakokinetička analiza

Dozno-zavisno ispitivanje različitih koncentracija supstance DK-I-56-1 je imala za cilj da utvrdi izabranu dozu primenjenog leka (DK-I-56-1), u krvi i mozgu pacova, jedan sat nakon i.p. primene liganda, kako bi se u narednom ogledu utvrdio farmakokinetički profil izabrane doze leka.

Dobijeni rezultati dozno-zavisnog ispitivanja koncentracija DK-I-56-1 u dozama od 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg ili 20 mg/kg, kako u krvi tako i u mozgu pacova, pokazala su da je izabrana doza kojom se postižu mikromolarne koncentracije u krvi i moždanom tkivu doza od 10 mg/kg DK-I-56-1, efektivna i bezbedna za bihejvioralne testove (Tabela 5 i Tabela 6).

Tabela 5. Ukupne molarne koncentracije DK-I-56-1 u plazmi pacova, primenjenih i.p. u dozi 2; 5; 10 i 20 mg/kg nanoemulzije, sat vremena nakon tretmana; plazma (srednja vrednost \pm SEM) za 3 uzorka

Doza DK-I-56-1	Plazma	
	Srednja vrednost (nmol/l)	SEM
2 mg/kg	1146,28	487,69
5 mg/kg	1686,96	796,63
10 mg/kg	5592,29	337,40
20 mg/kg	13971,85	1082,21

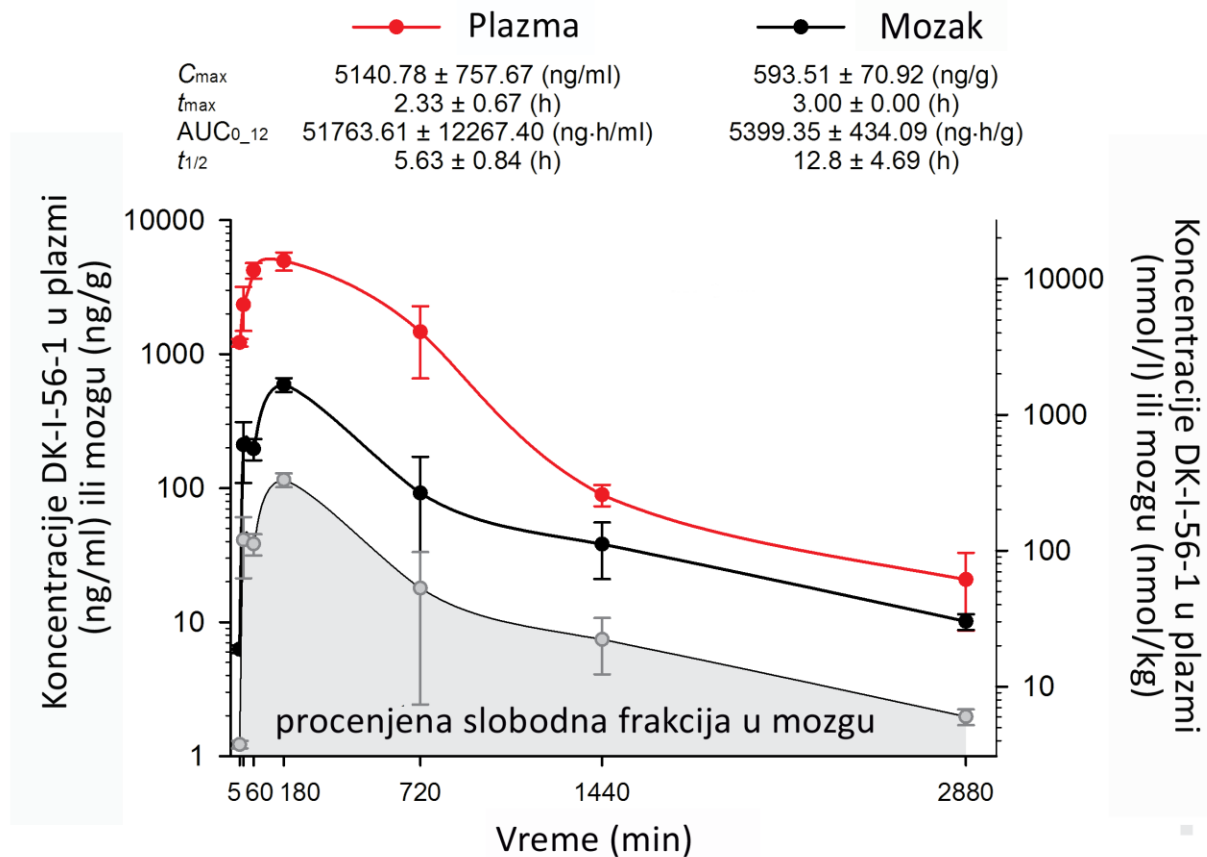
Tabela 6. Ukupne molarne koncentracije DK-I-56-1 u homogenatima mozga pacova, primenjenih i.p. u dozi 2; 5; 10 i 20 mg/kg nanoemulzije, sat vremena nakon tretmana; mozak (srednja vrednost \pm SEM) za 3 uzorka

Doza DK-I-56-1	Mozak	
	Srednja vrednost (nmol/kg)	SEM
2 mg/kg	229,64	35,57
5 mg/kg	281,74	143,22
10 mg/kg	819,27	233,84
20 mg/kg	1719,18	702,24

Dobijena izabrana doza od 10 mg/kg je bila u korelaciji sa slobodnom frakcijom leka u mozgu nakon i.p. primene pojedinačne doze od 10 mg/kg, koja je iznosila približno oko 100 nM. Ova doza bila je efikasna da dovede do modulacije $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptora *in vivo*, a rezultati su dobijeni nakon elektrofiziološkog ispitivanja (Knutson i sar., 2018).

Na Slici 11 su prikazani farmakokinetički profili DK-I-56-1 nakon intraperitonealne primene nanoemulzije u dozi od 10 mg/kg. Dobijeni rezultati pokazuju da maksimalna koncentracija supstance DK-I-56-1 u dozi od 10 mg/kg iznosi $5140,78 \pm 757,67$ ng/ml u plazmi, kao i $593,51 \pm 70,92$ ng/g u mozgu, postignuta nakon 2,33 h u plazmi, odnosno nakon 3 h u mozgu pacova. Nadalje, poluvreme eliminacije bilo je relativno sporo, $5,63 \pm 0,84$ h za plazmu, u odnosu na poluvreme eliminacije supstrata iz mozga ($12,8 \pm 4,96$ h). Površina ispod krive je iznosila $51763.61 \pm 12267,4$ ng h ml⁻¹ za plazmu, a $5399,35 \pm 434,09$ ng h g⁻¹ za mozak.

Dobijeni farmakokinetički profili DK-I-56-1, sa vrednostima iznad 10 μM u plazmi, odnosno 1 μM u moždanom tkivu, potvrdili su sposobnost apsorpcije u sistemsku cirkulaciju, kao i dobre distribucije ovog jedinjenja u mozgu.



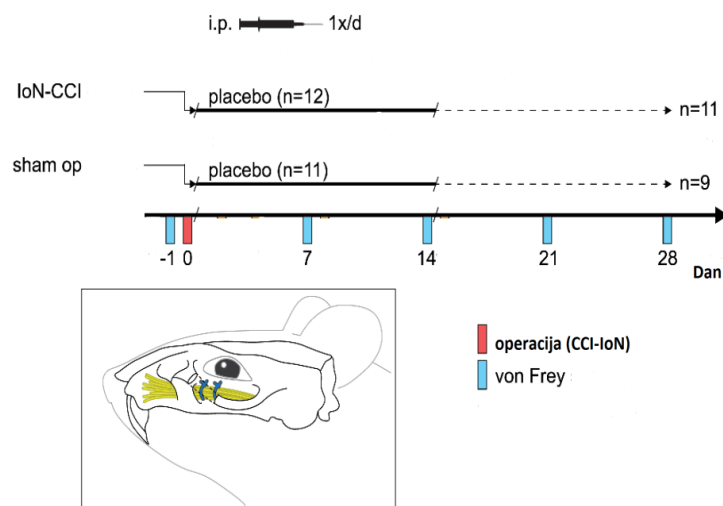
Slika 11. Farmakokinetički profili ukupne masene koncentracije u plazmi i moždanom tkivu DK-I-56-1 primenjenom i.p. u dozi 10 mg/kg u različitim vremenskim intervalima; svaki podatak predstavlja srednju vrednost \pm SEM za 3 uzorka; C_{max} = maksimalna koncentracija u mozgu ili plazmi; t_{max} = vreme postizanja maksimalne koncentracije u mozgu ili plazmi; $t_{1/2}$ = poluvreme eliminacije; AUC_{0-12} = površina ispod krive

4.2 Validacija eksperimentalnog modela hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca

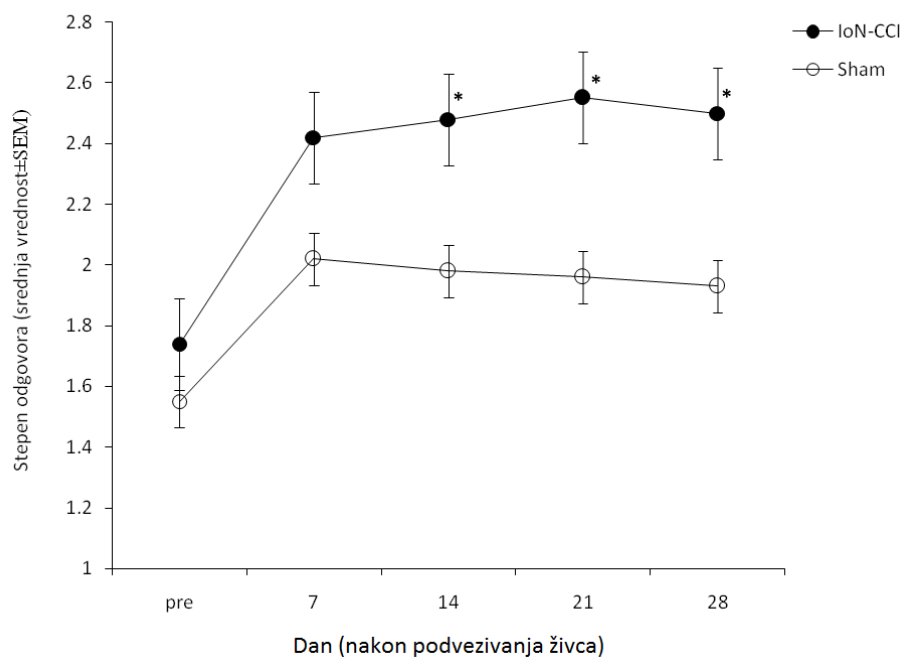
Validacija modela hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca utvrđena je poređenjem rezultata dobijenih posle podvezivanja infraorbitalnog živca praćenjem reakcije eksperimentalnih životinja mehaničkim odgovorom na von Frey filamente, u odnosu na životinje kojima živac nije podvezan, u vremenskom intervalu od 28 dana. U okviru ove analize, kod svih životinja je primenjen placebo efekat (prazna nanoemulzija u dozi od 10 mg/kg) u pojedinačnim dozama prvih 14 dana eksperimenta. Iz ovog istraživanja, isključene su 3 eksperimentalne životinje jer nisu ispunjavale prethodno definisane uslove eksperimenta.

Komparativnom analizom reakcije eksperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima je pokazana statistički značajna razlika 14-og, 21-og i 28-og dana između grupe životinja kojima je podvezan živac u odnosu na životinje kojima živac nije podvezan. Naime, značajno jača reakcija hipersenzitivnosti ekperimentalnih životinja od 2,48 (za 14. dan), 2,54 (za 21. dan), i 2,5 (za 28.dan) je registrovana kod životinja sa podvezanim živcem, što nije bio slučaj u kontrolnoj grupi, sa vrednostima 1,98, 1,96 i 1,93 za 14., 21. i 28. dan. Iako je postojala razlika u odgovoru na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima i 7-og postoperativnog dana, ova razlika, međutim, nije bila statistički značajna (2,42 kod životinja kod kojih je podvezan živac u odnosu na 2,02 kod životinja kojima živac nije podvezan).

A



B



Slika 12. A Vremenski tok oglada; B Stepen hipersenzitivnosti ogleđnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima ispitivanu jedan dan pre operacije, 7., 14., 21. i 28. dana nakon podvezivanja živca na modelu hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca; rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. * $p < 0,05$ (Studentov t-test); IoN-CCI- hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca, životinje kojima je živac podvezan; sham op- životinje koje su operisane ali živac nije podvezan

Tabela 7. Odgovor ekperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima (srednja vrednost \pm SEM); * $p < 0,05$ (Studentov *t*-test); IoN-CCI- hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca, životinje kojima je živac podvezan; sham- životinje koje su operisane ali živac nije podvezan;

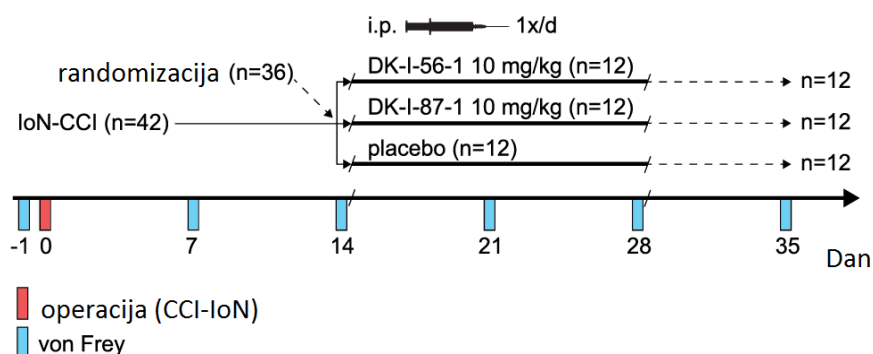
Opservacioni period	Grupa			
	IoN-CCI		sham	
	Srednja vrednost	SEM	Srednja vrednost	SEM
Pre	1,74	0,1	1,55	0,12
+7	2,42	0,19	2,02	0,21
+14	2,48	0,17	1,98*	0,08
+21	2,55	0,16	1,96*	0,12
+28	2,5	0,13	1,93*	0,23

4.3 Terapijski efekat DK-I-56-1 na razvijenu trigeminalnu neuropatiju

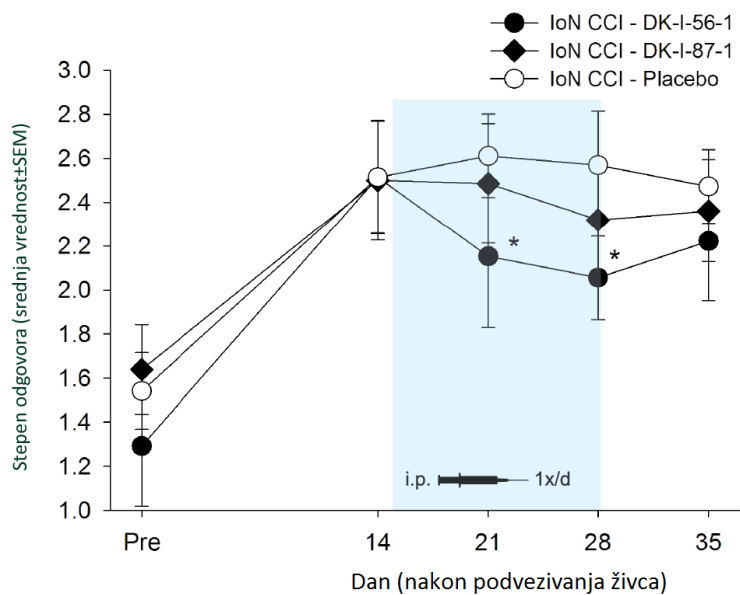
Nakon validacije modela, ispitan je terapijski efekat supstance DK-I-56-1 u dozi od 10 mg/kg posle njene ponavljane primene, u intervalu od 15. do 28. dana, nakon podvezivanja infraorbitalnog živca, u poređenju sa istom dozom DK-I-87-1 i placebo (prazna nanoemulzija). Dobijeni rezultati predstavljaju dobijene reakcije eksperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima. Ukupno šest životinja je isključeno iz statističke analize jer nisu ispunjavale prethodno definisane uslove.

Rezultati terapijskog efekta DK-I-56-1, DK-I-87-1 i placebo, su pokazali statistički značajnu razliku 21-og i 28-og dana između ispitivanih grupa. Nadalje, post hoc testom je utvrđeno da postoji statistički značajno smanjenje hipersenzitivnosti u odgovoru na von Frey filamente kod životinja koje su primale DK-I-56-1 u poređenju sa onim koje su primale placebo. Značajno najmanja vrednost u odgovoru na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima, bila je u grupi životinja koje su primale DK-I-56-1 od 2,15 za 21., odnosno 2,06 za 28. dan, što nije bio slučaj sa životinjama koje su primale placebo (2,61 za 21.dan; 2,57 za 28. dan). Statistički značajna razlika nije dokazana ni u jednom vremenskom intervalu između eksperimentalnih životinja koje su primale DK-I-87-1 i placebo. Razlika u hipersenzitivnosti pri odgovoru eksperimentalnih životinja na von Frey filamente između ispitivanih grupa nije postojala 35. dana nakon podvezivanja živca ($p > 0,05$).

A



B



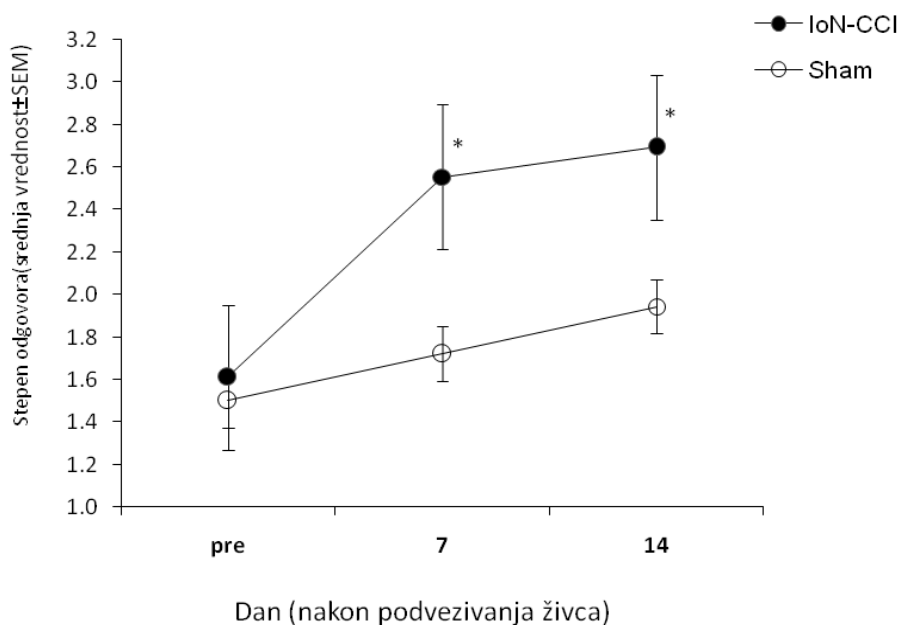
Slika 13. A Vremenski tok oglada; B Terapijski efekat DK-I-56-1: stepen hipersenzitivnosti ogleđnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima ispitivanu jedan dan pre operacije, 7., 14., 21., 28. i 35. dana nakon podvezivanja živca na modelu hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. * $p < 0,05$ (jednofaktorska ANOVA i SNK post-hoc test); IoN-CCI- hronična konstriktiona povreda infraorbitalnog živca, životinje kojima je živac podvezan

Tabela 8. Terapijski efekat DK-I-56-1: odgovor eksperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima (srednja vrednost \pm SEM); * $p < 0,05$ (jednofaktorska ANOVA, SNK post hoc); IoN-CCI- hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca, životinje kojima je živac podvezan;

Opservacioni period	DK-I-56-1		DK-I-87-1		Placebo	
	Srednja vr.	SEM	Srednja vr.	SEM	Srednja vr.	SEM
Pre	1,29	0,14	1,64	0,10	1,54	0,09
14	2,52	0,11	2,58	0,14	2,52	0,16
21	2,15*	0,16	2,48	0,11	2,61	0,09
28	2,06*	0,09	2,32	0,13	2,57	0,12
35	2,22	0,14	2,36	0,40	2,47	0,08

4.4 Analiza ekspresije $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice GABAA receptora, NKCC1 i KCC2 hlornih kotransportera u trigeminalnom ganglionu

Ispitivanje ekspresije $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice GABAA receptora, kao i NKCC1 i KCC2 hlornih kotransportera je urađeno na tkivu desnog i levog trigeminalnog gangliona kod eksperimentalnih životinja sa podvezanim infraorbitalnim živcem kao i kod životinja kod kojih je živcu pristupljeno, bez podvezanja. Mehaničkom stimulacijom von Frey filamentima 7. i 14. dana potvrđena je bolna preosetljivost kod životinja kod kojih je živac podvezan, a njihova reakcija se statistički značajno razlikovala u odnosu na reakciju eksperimentalnih životinja kod kojih nije podvezan infraorbitalni živac (Grafikon 4). Tri životinje su isključene iz statističke analize jer nisu ispunjavale prethodno definisane kriterijume, koji su važili u svim ostalim bihevioralnim eksperimentima. U ovom eksperimentu, nakon procene da li se razvila bolna preosetljivost, životinje su žrtvovane, nakon čega je vrednovan nivo ekspresije proteina.

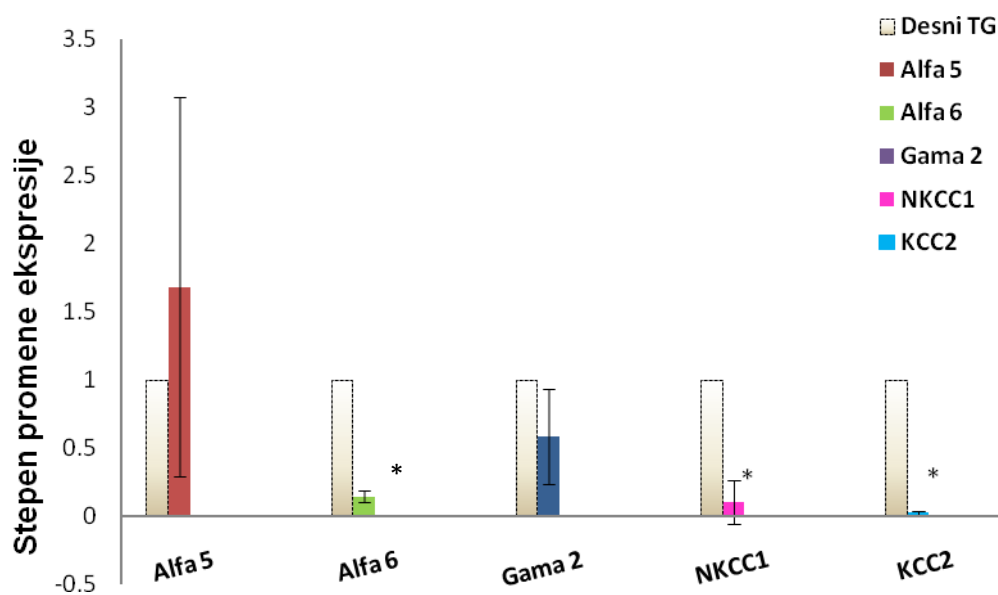


Slika 14. Stepen hipersenzitivnosti oglednih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima ispitivanu jedan dan pre operacije, 7. i 14. dana nakon podvezivanja živca na modelu hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca; rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM. * $p < 0,05$ (Studentov t-test za nezavisne uzorke); IoN-CCI- hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca, životinje kojima je živac podvezan; sham- životinje koje su operisane ali živac nije podvezan

Za procenu stepena promene ekspresije za sve ispitivne proteine, najpre je određena $2^{-\Delta\Delta Ct}$ vrednost za desne i leve ganglione, na način koji je prethodno opisan. Vrednosti su zatim normirane, odnosno prikazane kao relativne vrednosti levih gangliona u odnosu na desne (na levoj strani je živac podvezan, dok desnom nije pristupano tokom hirurške intervencije).

Pokazan je smanjen nivo ekspresije $\alpha 6$ podjedinice GABAA receptora u grupi životinja kod kojih je živac podvezan ($p < 0,05$), u odnosu na nivo ekspresije u trigeminalnom ganglionu sa

desne strane. Ekspresija oba hlorna kotransportera, pokazuje smanjenje sa leve u odnosu na desnu stranu, s tim što samo KCC2 pokazuje statistički značajno smanjenje u levom trigeminalnom ganglionu životinja kod kojih je živac podvezan, u odnosu na ekspresiju sa desne strane.



Slika 15. Stepenn promene ekspresije $\alpha 5$, $\alpha 6$ i $\gamma 2$ podjedinice, NKCC1 i KCC2 u levom trigeminalnom ganglionu, prikazano u odnosu na desnu stranu kod životinja kod kojih je živac podvezan (Mann Whitney U-test), * $p < 0,05$; TG-trigeminalni ganglion

5. DISKUSIJA

Hronični orofacijalni bol je specifično bolno stanje zbog svoje lokalizacije i psihološkog uticaja koji ima na pacijenta. Najčešće vrste hroničnog bola su muskuloskeletni, neurovaskularni i neuropatski bol. Bez obzira na uzrok, bol nastaje kao odgovor na nadražaj, koji kada se ukloni bol prestaje. Međutim, u slučajevima hroničnog bola dolazi do oštećenja regulatornih mehanizama u mozgu pa i nakon uklanjanja bolnog nadražaja bol perzistira, što je iscrpljujuće za pacijenta (Renton, 2017). Malokluzije su u značajnoj meri udružene sa različitim skeletnim, zglobnim i mišićnim disfunkcijama koje usled neblagovremene ortodontske terapije mogu da se manifestuju pojavom hroničnih orofacijalnih bolova, i usled hroničnog trajanja sledstvenom pojavom neuropatije (Manfredini i sar., 2010). Iako ovakve disfunkcije sa aspekta patogeneze započinju inflamatornim bolom, koji se s vremena na vreme javlja u vidu akutnog bola, u svojoj osnovi su definisane kao hronične trigeminalne neuropatije.

Hronični bolovi u ovoj regiji mogu biti izraženi u vidu hronične disfunkcije temporomandibularnog zgloba sa ili bez hroničnih bolova u predelu mastikatornih mišića. Međutim, u ovim bolnim stanjima iako sprovedena, ortodontska ili ortodontsko-hirurška terapija najčešće ne daje povoljne terapijske rezultate. U obzir treba uzeti i činjenicu o nekoherentnosti u donošenju korektne kliničke dijagnoze, imajući u vidu da se radi o skupu simptoma i znakova disfunkcije orofacijalnog sistema. Prvo, disfunkcija TMZ-a klinički postoji ako se kod pacijenta dijagnostikuje artralgiya temporomandibularnog zgloba na osnovu prisutnog bola na palpaciju jednog ili oba zgloba, potom pojave spontanog bola u zglobu, bola u zglobu pri spontano maksimalno otvorenim ustima ili favorizovanom (asistiranom) maksimalnom otvaranju, ili pojave bola pri lateralni kretanjama, bez auskultacionih promena. Međutim, napredovanje artralgiye TMZ-a dovodi do osteoartritisa, kada se navedeni simptomi pojačavaju, a krepitacije na zglobnim površinama postaju čujne. Drugo, disfunkcija TMZ-a je u velikom broju kliničkih

slučajeva udružena sa disfunkcijom mastikatornih mišića, pa se ovo oboljenje manifestuje kao miofacijalni bol sa sledećim simptomima i znakovima: spontanim jakim ili tupim bolom u mirovanju ili pri funkciji stomatognatog sistema, lokalizovan u vilici, temporalnom predelu, periaurikularno, ili unutar uveta, kao i bolom na palpaciju mišića u najmanje 3 pozicije od ukupno 20 mišića, i to na strani gde je prisutan spontan bol (Abrahamsson i sar., 2013). Treće, pored kliničkih simptoma i znakova, sa aspekta tačne dijagnostike, problematična je i radiološka dijagnostika, koja se sprovodi primenom magnetene rezonance i koja je pokazala da u samo 10% slučajeva postoji fiziološki odnos zglobnih površina kod pacijenata sa asimptomatskom disfunkcijom TMZ-a i mijalgijom (Muir i Gross, 1990). Konačno, potencijalni značaj dentalne okluzije i posturalne kontrole trigeminalnih uzlaznih signala iz orofacijalne regije, pokazao je prisustvo bola u predelu vrata i ramenog pojasa kod pacijenata sa malokluzijom II i III klase, uz smanjenje mišićne funkcije u tom anatomskom predelu (Bron i sar., 2007; Tecco i sar., 2012).

Mastikatorna funkcija stomatognatnog sistema je kontrolisana trigeminalnim neurokontrolnim mehanizmima čije patološke promene dovode do nastanka ne samo disfunkcija TMZ-a, već prouzrokuju klinički, dijagnostički i terapijski teža oboljenja kao što je miofacijalni bolni sindrom. Ovaj sindrom uključuje postojanje neuropatske okidačke zone nastale used prisutnih anatomskih, morfoloških i funkcionalnih promena stomatognatog sistema, a uzroci mogu biti lokalni (dentalna trauma, parafunkcije, mišićna trauma, malokluzija, skeletne nepravilnosti, efekat antihipertenzivne terapije blokatorima kalcijumskih kanala) ili sistemski (emocionalni disbalans, endokrini poremećaji, nutritivni deficit, virusne infekcije, poremećaji sna) (Tecco i sar., 2012). Miofacijalni bolni sindrom, u svojoj klinički razvijenoj hroničnoj formi, leči se medikamentozno, kombinovanom primenom miorelaksanata, antidepresiva i nesteroidih antiinflamatornih lekova. U akutnim fazama, ovako razvijen neuropatski bol kontroliše se i

primenom injekcionih blokada lokalnih anestetika, glicerola, etil-alkohola ili kortikosteroida (Lavelle i sar., 2007).

Jasno je da je terapijski postupak kod ovakvih pacijenata kompleksan i još uvek nedefinisan, a pored dobro planirane ortodontske terapije, često zahteva primenu medikamenata, kako u suzbijanju akutnog, tako i hroničnog bola. Stoga je cilj ove doktorske disertacije bio da u određenom segmentu definiše moguć medikamentozni pristup u lečenju hronične trigeminalne neuropatije sa aspekta specifične, selektivne aktivacije GABAA receptora u trigeminalnom ganglionu.

Uloga GABAA receptora u transmisiji bolnih impulsa je opisana u literaturi. Aktivacija GABAA receptora dovodi do inhibicije u transmisiji bolnih impulsa, do koje može doći prilikom oštećenja perifernog nerva. Bolni impulsi koji dolaze sa periferije, dospevaju do trigeminalnog ganglionu ili do dorzalnih rogova kičmene moždine, gde dolazi do presinaptičke i postsinaptičke interakcije sa GABA-interneuronima. Uloga interneurona, pored one koju imaju u transmisiji senzornih nadražaja u fiziološkim uslovima, opisuje se i u nastanku i održavanju hroničnih bolnih stanja. Gubitak inhibitorne GABA-erničke transmisije jedan je od razloga nastanka inflamatornog i neuropatskog bola (Zeilhofer i sar., 2012).

Inhibitorni GABAA interneuroni u dorzalnim rogovima kičmene moždine imaju mogućnost da dovedu do nastanka presinaptičke inhibicije, i spreče razvoj centralne senzitivacije koja leži u osnovi hroničnog bola. Poznato je da klasični benzodiazepini svoje efekte mogu da ispoljavaju i preko spinalnih GABAA receptora koji sadrže $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ i $\alpha 5$ podjedinicu, a pored anksiolitičkog, sedativnog i miorelaksantnog efekta dovode i do analgezije. U svojim israživanjima Zeilhofer i sar. (2012) ukazuju da kod miševa koje imaju tačkaste mutacije na nekoj od α podjedinica GABAA receptora, dolazi do razvoja analgezije, ali bez razvoja

neželjenih efekata kao što je na primer sedacija kod životinja sa mutacijom na $\alpha 1$ podjedinici. Smatra se da $\alpha 2$ i $\alpha 3$ podjedinica imaju najznačajniju ulogu u razvoju analgezije do koje dovode klasični benzodiazepini poput diazepama. Literatura ukazuje na mogućnost potencijacije spinalnih GABAA receptora u lečenju bolnih stanja, međutim glavni nedostatak ovakve modulacije jeste njegova nespecifičnost, jer modulacija $\alpha 2$ receptora dovodi do brojnih promena psiholoških i bihejvioralnih funkcija. Sa druge strane, za modulaciju $\alpha 6$ podjedinice GABAA receptora koja se opisuje u ovoj doktorskoj disertaciji se očekuje da utiče na populaciju koja je lokalizovana i selektivnija, sa aspekta spektra promene ponašanja koje očekujemo.

Imajući u vidu mehanizam nastanka i razvoja neuropatskog bola, posebno sa aspekta nastanka primarne hiperalgezije, ali i razvoja centralne senzitivizacije, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da pozitivna modulacija selektivnim ligandom za GABAA receptor, koji sadrži $\alpha 6$ podjedinicu, dovodi do smanjenja trigeminalnog neuropatskog bola, što je i bila radna hipoteza ove doktorske disertacije.

U obzir treba uzeti i činjenicu da do sada ne postoje utvrđeni protokoli u lečenju trigeminalne neuropatije, pa je i naučni doprinos ove doktorske disertacije sagledan u rezultatima koji jasnije definišu terapijski potencijal primenjenog liganda DK-I-56-1 kao pozitivnog modulatora GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, u smanjenu periferne trigeminalne neuropatije, a što je pokazano na eksperimentalnom modelu hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca kod pacova.

Model hronične konstrikcione povrede je jedan od animalnih modela za ispitivanje neuropatskog bola (Iwata i sar., 2011). Prvi put je opisan od strane Vosa i saradnika (1994), koji su na ovom eksperimentalnom modelu pokazali da se bolna preosetljivost kod oglednih životinja javlja 12. dana nakon podvezivanja živca. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj

doktorskoj disertaciji, pošto se bolna preosetljivost kod oglednih životinja javila 14. dana posle podvezivanja živca. Naime, kako je opservacioni period u ovoj doktorskoj disertaciji obuhvatao kraći vremenski period do 35. dana, u odnosu na studiju Vosa i sar., (1994), statističkom analizom je utvrđeno da trend pojave povećanja bolnog odgovora na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima u predelu brkova (mehanička alodinija) može da se registruje već 7. dana nakon podvezivanja živca, ali bez statistički značajne razlike. Kako su ovi rezultati praćeni longitudinalno, za očekivati je da se sa razvojem i progresijom neuropatije pojačava i stepen mehaničke alodinije u rasponu od 7. do 14. dana. Statistički značajna razlika pokazana je i u narednim registrovanim vremenskim intervalima, 21. i 28. dana, do kada su i praćene promene u ponašanju, što je skladu sa podacima u literaturi (Vos i sar.,1994). Vos i saradnici (1994) su pokazali da neuropatski bol perzistira čak 4 meseca kod životinja kod kojih je podvezan infraorbitalni živac. Do sličnih rezultata u validaciji ovog eksperimentalnog modela došli su i Deseure i Hans (2015). Štaviše, ovi autori opisuju da je primenom modela hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca moguće utvrditi i postojanje hiporesponsivne faze (sniženog odgovora životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima), i to u prvoj fazi opservacije koja traje prvih nekoliko dana nakon podvezivanja nerva. Prilikom validacije eksperimentalnog modela u ovoj doktorskoj disertaciji, ova faza nije registrovana, jer nije praćena, s obzirom da je praćenje bolnog ponašanja započeto tek 7. dana nakon podvezivanja živca, što ne isključuje njenu pojavu u ranoj fazi razvoja neuropatije.

Takođe, potrebno je imati u vidu razliku u vrsti oglednih životinja, jer su u svim prethodnim studijama korišćeni *Sprague-Dawley* pacovi (Vos i sar., 1994; Kernisant i sar., 2008; Deseure i sar., 2015), što bi mogao da bude jedan od izvora varijabiliteta u vremenskom toku razvijanja bolnog ponašanja kod životinja. U našoj studiji, nije rađeno ispitivanje odgovora kontralateralne

strane u odnosu na podvezanu, s obzirom da u pilot studijama nismo uočili da je moguće jasno razgraničiti i oceniti ponašanje životinje u odnosu na ispitivane strane.

U obzir treba uzeti i činjenicu da su korišćeni von Frey filamenti bili unutar preporučenih vrednosti koje se pominju u literaturi (0,015-12 g) (Vos i sar., 1994; Kernisant i sar., 2008; Deseure i Hans 2015), u serijama od po tri filamenta različitih gramaža (prva serija 1 g, 2 g i 6 g; druga serija 0,6 g, 1,4 g i 4 g), što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima, ali i našom pilot studijom, jer je uočeno da povećanje gramaže filamenata ne dovodi do povećanja bolnog odgovora, kako kod životinja kod kojih je živac podvezan, tako i kod životinja kojima je živcu hirurški pristupljeno, ali on nije podvezan. Naime, povećanje gramaže filamenata nije menjalo vrednost registrovanog odgovora na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima.

Primarni rezultat terapijskog efekta liganda DK-I-56-1, selektivnog za vezivanje za $\alpha 6$ podjedinicu GABAA receptora, potvrdio je da doza od 10 mg/kg DK-I-56-1 nakon 14 dana, od kada je razvijena mehanička alodinija kod oglednih životinja, smanjuje postojeći trigeminalni neuropatski bol. Uočeno je takođe, da doza od 10 mg/kg ne utiče akutno na nivo anksioznosti, mišićne jačine i osnovnih senzomotornih sposobnosti, što je prethodno potvrđeno nizom eksperimentalnih testova (Knutson i sar., 2018).

Statistički značajan terapijski efekat liganda DK-I-56-1 na modelu razvijenog neuropatskog bola, uočen je 21. i 28., ali ne i 35. dana, pri čemu je davanje DK-I-56-1 primenjeno u intervalu od 14-og do 28-og dana pojedinačnom dnevnom dozom. Ako se uzme u obzir isti hirurški model hronične konstrikcione povrede, ali sa ispitivanjem izazvanog bolnog ponašanja u različitim vremenskim intervalima, koji su uradili Deseure i saradnici (2003), korišćenjem selektivnog agoniste 5-HT_{1A} receptora, može se reći da DK-I-56-1 pokazuje smanjenje bolnog odgovora, kao rezultat 13 ponovljenih doza. Dakle, efekat koji ovaj ligand ostvaruje hroničnom primenom,

definisani su njegovim koncentracijama u krvi i mozgu koje opadaju po završetku tretmana, a ne trenutnim niti odloženim dejstvom leka. Deseure i saradnici (2003), pokazali su da na istom eksperimentalnom modelu, ali korišćenjem drugog terapijskog pristupa u lečenju hroničnog trigeminalog bola, značajno smanjenje bolnog odgovora 29. dana, ali posle primene 6 pojedinačnih doza, počevši oko 24. dana nakon podvezivanja živca, što je u skladu sa našim rezultatima.

U većini drugih studija (Michot i sar., 2012; Gris i sar., 2016), kao i pomenutoj studiji Deseure i sar. (2003), ispitivanje izazvanog bolnog odgovora praćeno je nekoliko sati od primene leka, odnosno u trenutku kada su životinje izložene akutnim farmakokinetičkim efektima, prilikom merenja odgovora na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima. S tim u vezi, u obzir treba uzeti činjenicu da su efekti DK-I-56-1, DK-I-87-1 i placebo, praćeni najmanje 20-ak sati nakon primene liganda. Treba ukazati i na skorašnje rezultate Knutsona i sar. (2018), gde je DK-I-56-1 nakon jednokratne primene, izazvao blagu hiperlokomociju kod oglednih životinja, što nije bio slučaj nakon akutne primene DK-I-87-1.

Jedna od farmakoloških karakteristika primenjenih liganada u ovoj doktorskoj disertaciji jeste njihova selektivnost vezivanja za specifične podjedinice GABAA receptora. Prisustvo $\alpha 6$ podjedinice je najviše ispitano u malom mozgu, gde formira sinaptičke $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptore i extrasinaptičke $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ i $\alpha 6\beta 3\delta$ receptore (Jechlinger i sar. 1998; Nusser i sar. 1998). Sastav receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, na neuronima trigeminalnog gangliona nije u potpunosti jasan, a u literaturi su opisani i $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ i $\alpha 6\beta 2/3\delta$ receptori (Hayasaki et al., 2006). U trigeminalnom ganglionu pacova starih 2-3 nedelje imunohistohemijom je uočeno da većina neurona ispoljava $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 2/3$ i $\gamma 1/3$ podjedinice na telu neurona, dok su $\alpha 6$ i δ podjedinice prisutne na telima malih neurona (Hayasaki i sar., 2006). Ovakav nalaz je u

suprotnosti sa ekspresijom $\alpha 6$ podjedinice u dorzalnim rogovima kičmene moždine, gde se njena ekspresija ne registruje ili je ona zanemarljiva (Usoskin i sar., 2015). Takođe, kod odraslih pacova imunofluorescencijom uočeno je da 86% malih, 74% srednjih i 74% velikih neurona prisutnih u trigeminalnom ganglionu, ispoljavaju GABAA receptore koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu (Puri i sar. 2012). Razlika u starosti eksperimentalnih životinja može da bude jedan od mogućih razloga različite rasprostranjenosti GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u ovim studijama.

Smanjenje ekspresije $\alpha 6$ podjedinice na modelu inflamatornog i miofacijalnog bola, dovodi do povećanog bolnog odgovora životinja u odgovoru na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima (Puri i sar. 2012; Kramer i Bellinger 2013), a takođe ukazuje na moguću ulogu GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u inhibiciji propagacije bolnih signala. Inhibicija se najverovatnije odvija na telu neurona smeštenih u trigeminalnom ganglionu ili na završecima primarnih aferentnih neurona. Lokalno, na nivou trigeminalnog gangliona, važnu ulogu imaju i satelitske glija ćelije koje akumuliraju GABA-u iz ekstracelularnog prostora i oslobađaju je ekstrasinaptički, difuzijom u okolno tkivo. Difuzija GABA-e nastaje kao odgovor na česte akcione potencijale i posledično oslobađanje K^+ jona iz tela neurona (Hayasaki i sar., 2006).

Poseban akcenat u interpretaciji dobijenih rezultata daju i skorašnja ispitivanja Knutsona i sar., bazirana na elektrofiziološkoj analizi ćelija koje sadrže različite konglomerate GABA receptora. Ovi autori su pokazali da DK-I-56-1 dozno-zavisno pojačava aktivnost GABA-e na $\alpha 6\beta 3\gamma 2$, $\alpha 6\beta 3\delta$ i $\alpha 6\beta 3$ receptorima pri koncentracijama već od 0,1 μM , ali modulacija na drugim podtipovima ispitivanih GABAA receptora zahteva koncentracije veće od 1 μM da bi došlo po promene aktivnosti. Nasuprot tome, DK-I-87-1, je neaktivan na GABAA receptorima koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu i blago aktivan na nekim drugim podtipovima GABAA receptora pri

koncentracijama od 1 μM (Knutson i sar., 2018). Funkcionalna selektivnost DK-I-56-1 za receptore koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu dalje je naglašena niskom do umerenom koncentracijom koju ovaj ligand postiže u mozgu (10-300 nM) nakon ponavljane primene doze od 10 mg/kg (Knutson i sar., 2018). Ove koncentracije liganda u krvi i mozgu, potvrđuju prethodni zaključak autora da pirazolohinolinoni i njihovi deuterisani analozi, kao što je DK-I-56-1, u najvećoj meri dovode do modulacije $\alpha +/\beta$ - veznog mesta, a u manjoj meri se vezuju za vezno mesto klasičnih benzodiazepina ($\alpha +/\gamma$ -) (Varagić i sar., 2013). Dodatno vezivanje DK-I-56-1 za benzodiazepinsko vezno mesto u kome nema $\alpha 6$ podjedinice, trebalo bi da dovodi do određenih neželjenih *in vivo* efekata, međutim, njihovo odsustvo nakon i.p. aplikacije 10 mg/kg DK-I-56-1 se suprotstavlja ovoj činjenici (Knutson i sar., 2018). Selektivni ligand kao što je DK-I-56-1 ostvaruje efekte preko $\alpha 6\beta\gamma$, $\alpha 6\beta\delta$ i $\alpha 6\beta$ receptora, sa većim potencijalom za $\alpha 6\beta\gamma$ nego $\alpha 6\beta\delta$ GABAA receptore. Dejstvo liganda DK-I-56-1 koje ostvaruje preko $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ receptora je zapravo kombinacija efekata koji se ostvaruju preko i $\alpha 6 +/\beta 3$ - i $\alpha 6 +/\gamma 2$ - veznih mesta, dok se efekat preko $\alpha 6\beta 3\delta$ receptora ostvaruje samo preko $\alpha 6 +/\beta 3$ - veznog mesta.

Poznato je da neuropatski bol koji nastaje usled podvezivanja infraorbitalnog živca dovodi do nastanka brzih akcionih potencijala u neuronima trigeminalnog ganglionu (Vos i sar., 1994). U trigeminalnom ganglionu, GABA se stvara i oslobađa od strane 70% neurona, ali može da se akumulira samo od strane satelitskih glija ćelija koje okružuju neurone. Smatra se da često okidanje akcionih potencijala od strane senzornih neurona može da dovede do povećane ekstraćelijske koncentracije K^+ tokom repolarizacije ćelijske membrane nakon okidanja akcionih potencijala, što može dovesti do oslobađanja GABA-e iz satelitskih glija ćelija i/ili neurona, stvarajući negativnu povratnu spregu na senzornim neuronima (Hayasaki i sar., 2006). Posledična aktivacija visoko senzitivnih GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu na telu

neurona trigeminalnog gangliona, mogla bi sprečiti stvaranje čestih akcionih potencijala kao i njihovu sinaptičku transmisiju do centralnih završetaka, tačnije do *pars causalis*-a trigeminalnog jedra (Mortensen i sar., 2012; Karim i sar., 2013). Stoga, moguć efekat koji DK-I-56-1 ostvaruje bio bi povećano dejstvo endogene GABA-e i smanjena sinaptička transmisija bolnih impulsa do odgovarajućih terminala u trigeminalnom jedru, koja posledično dovodi do smanjenja bolne percepcije.

Hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca takođe dovodi do poremećaja u homeostazi hloridnih jona. Primarni aferentni neuroni trigeminalnog živca pokazuju izraženu ekspresiju katjonskih hloridnih kontransportera (NKCC1) koji akumuliraju Cl^- unutar ćelije. Pored NKCC1, u hloridnu ravnotežu, uključen je i KCC2 koji je zadužen za smanjenje intracelularne koncentracije hlorida. Ovaj kotransporter (KCC2) nije prisutan u trigeminalnom ganglionu, već samo u spinalnom jedru trigeminalnog živca (Wei i sar., 2013).

Promene u homeostazi Cl^- dovode do promena koje su slične onim koje nastaju u toku periferne senzitivizacije (Wei i sar., 2013; Kaila i sar., 2014). U slučaju povrede, i povišene nervne ekscitabilnosti, gde usled depolarizacije primarnih aferentnih neurona dolazi do nastanka akcionih potencijala, inhibitorni mehanizmi ipak ostaju očuvani (Takkala i sar., 2016). Ipak, IoN-CCI dovodi do povećanja ekspresije NKCC1, usled povećanja koncentracije i fosforilacije ovih jonskih kanala, koja je u osnovi depolarizacije usled oslobađanja GABA-e i nastanka ekscitatorne depolarizacije primarnih aferentnih neurona, koji dovode do nastanka bola na dodir (mehanička alodinija), kao posledica uključivanja $\text{A}\beta$ vlakana u nociceptivni put (Kaila i sar., 2014). Takođe, nakon IoN-CCI, dolazi do smanjenja ekspresije KCC2 u spinalnom jedru trigeminalnog živca, što znači da do promena dolazi kako na neuronima prvog, tako i na neuronima drugog reda.

Farmakokinetički profili ispitivanih jedinjenja, koja su formulisana u obliku biokompatibilne nanoemulzije sa visokim sadržajem vode, bili su dovoljno spori, usled čega je i aplikacija liganda jedanput dnevno bila adekvatna da dostigne efektivne koncentracije između dve doze. Poluvreme eliminacije nanoemulzije DK-I-56-1 nakon intraperitonealne primene iznosilo je 12,8 h, dok je poluvreme eliminacije nakon intraperitonealne, oralne i intravenske aplikacije suspenzije ovog jedinjenja iznosilo 2,28h, 4,20 h i 4,34 h (Knutson i sar., 2018). Imajući u vidu slične vrednosti poluvremena eliminacije nakon primene suspenzije različitim putevima unošenja, verovatno je da formulacija supstance igra značajnu ulogu u kinetici jedinjenja kao što je pretdodno pokazano sa primenom različitih jedinjenja (Đorđević i sar., 2015). U ovom radu, Đorđević i sar. su pokazali da primena nanoemulzije diazepama intravenski, sa najnižim sadržajem uljane faze od 20%, što je isto kao i u našem istraživanju, dovodi do značajnog produžavanja dispozicije u mozgu (29 naspram 207 minuta), što je pokazatelj da formulacija leka ima uticaja na kinetiku supstance. Međutim, slobodna frakcija liganda u krvi bila je izuzetno niska i nije mogla biti određena, ali je koncentracija u mozgu dostizala značajne vrednosti. Zahvaljujući lipofilnosti DK-I-56-1, resorpcija u mozgu bila je neoštećena. Slično zapažanje opisuju Ettrup i sar., (2011) kod velikog broja lipofilnih N-benzil-supstituisanih fenetilamina, da na resorpciju u mozgu ne utiče značajno niska slobodna frakcija liganda u plazmi. Trigeminalni ganglion ne samo da je bogat mastima, već leži izvan krvno moždane barijere za razliku od njegove centralne sinapse (Eftekhari i sar., 2015). U zavisnosti od toga gde se nalaze neuroni koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, preko kojih DK-I-56-1 ostvaruje svoje efekte, farmakološka efektivna koncentracija liganda može da bude povezana sa njegovom koncentracijom u krvi ili u mozgu. Moguće je da su farmakološke mete DK-I-56-1 prisutne rostralnije, odnosno u predelu sinaptičkih krajeva trigeminalnih neurona koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, u kaudalnom delu trigeminalnog jedra ili

negde drugde u predelu trigeminalnog puta, takođe izvan krvno-moždane barijere (Shibuta i sar., 2012). Nezavisno od toga gde se nalaze GABAA receptori koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu preko kojih se ostvaruje efekat DK-I-56-1, njegova farmakološka efektivna koncentracija je u vezi sa koncentracijom u mozgu. Naime, u literaturi je pokazano da slobodna frakcija u homogenatima mozga većeg broja lekova male molekulske težine, korelira sa slobodnom frakcijom leka u dorzalnim rogovima kičmene moždine, što bi moglo da liči na situaciju u perifernom nervnom tkivu (Liu i sar., 2018).

Na posletku, pokazali smo da DK-I-56-1, funkcionalno selektivni pozitivni alosterični modulator GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, značajno umanjuje prisutan neuropatski bol. Ovi efekti su dokumentovani u uslovima dejstva liganda 20 sati nakon prethodne intraperitonealne primene, i zbog toga izostaju svi nespecifični faktori koji mogu uticati na ponašanje životinja.

Dakle, aktivacija $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ od strane DK-I-56-1 doprinosi analgetičkom efektu, uz mogućnost da ovo jedinjenje, nekim delom, ostvaruje efekte putem potpuno drugih populacija receptora. Na osnovu dostupne literature, takođe nije moguće isključiti mogućnost da su anatomske mete DK-I-56-1 smeštene centralnije, kao na primer u neuronima drugog reda, u spinalnom trigeminalnom jedru (Okada-Ogawa i sar., 2015).

Ovo je prvo istraživanje koje pokazuje da pozitivna modulacija GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, može da bude nova terapijska opcija za lečenje trigeminalne neuropatije, sa obećavajućim potencijalom za dalje kliničko ispitivanje, s obzirom da ne ispoljava negativna neželjena dejstva klasičnih benzodiazepina (Knutson i sar., 2018). Ipak, iako je DK-I-56-1 visoko selektivan pozitivan modulator GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, mogu da postoje i alternativna mesta dejstva ovog liganda.

Smanjenje trigeminalnog neuropatskog bola na modelu hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca, moguće je i pozitivnom modulacijom benzodiazepinskog veznog mesta GABAA receptora primenom liganada koji su selektivni za različite tipove GABAA receptora, koji sadrže $\alpha 2$, $\alpha 3$ ili $\alpha 5$ podjedinicu. Takođe, postoji mogućnost da slaba modulacija $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ ili $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ receptora doprinosi da je efekat DK-I-87-1 slab i nije značajan na razvijen neuropatski bol.

Dalja istraživanja bi trebalo da odrede stvarno mesto vezivanja DK-I-56-1, posredstvom kojeg se ostvaruju farmakološki efekti ovog selektivnog liganda koji smanjuje neuropatski bol, kao i njihovu lokalizaciju u centralnom ili perifernom delu trigeminalnog sistema. Međutim, u ovoj disertaciji je prvi put prikazano da dejstvo liganda selektivnih za $\alpha 6$ podjedinicu GABAA receptora, a takođe je pokušano da se uoči najveći broj sličnosti sa simptomina sličnim trigeminalnoj neuropatiji koja je prisutna kod ljudi, ligand je dat ponavljano tokom 14 uzastopnih dana, s obzirom da je pretpostavka da nijedan lek nakon akutne primene ne može da izleči ovakvu patologiju.

6. ZAKLJUČCI

1. Ispitivanje farmakokinetičkog ponašanja novosintetisanog jedinjenja DK-I-56-1, pokazalo je da ovo jedinjenje ispoljava linearnost postignutih koncentracija u plazmi i moždanom tkivu u širokom rasponu doza;
2. U skladu sa podatkom o slobodnoj frakciji jedinjenja u moždanom tkivu, odabrana je doza (10 mg/kg) koja je podesna za dugotrajni tretman oglednih životinja u izabranom modelu trigeminalnog neuropatskog bola;
3. Statistički značajna razlika u sve tri vremenske tačke ukazuje da hronična konstrikciona povreda infraorbitalnog živca dovodi do mehaničke alodinije kod oglednih životinja kojima je podvezan živac, i stoga može se koristiti kao validan model trigeminalnog neuropatskog bola.
4. Kod životinja kod kojih je živac podvezan postoji statistički značajno povećanje odgovora na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima u odnosu na grupu životinja kojima živac nije podvezan.
5. Terapijski efekat selektivnog modulatora GABAA $\alpha 6$, DK-I-56-1, na modelu hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca, dovodi do statistički značajnog smanjenja odgovora na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima, te može biti nova terapijska mogućnost u lečenju trigeminalnog neuropatskog bola.
6. Za razliku od DK-I-56-1, DK-I-87-1 kao ni placebo ne dovode do promene odgovora eksperimentalnih životinja na mehaničku stimulaciju von Frey filamentima.
7. Nakon analize ekspresije, uočeno je statistički značajno smanjenje u ekspresiji $\alpha 6$ podjedinice GABAA receptora, kao i hlornih kotransportera. Preostale ispitivane podjedinice

($\alpha 5$ i $\gamma 2$) pokazuju promene u smislu povećanja ili smanjenja ekspresije, ali ne dostižu statističku značajnost, što može ukazivati na ulogu $\alpha 6$ podjedinice GABAA receptora u mehanizmu nastanka trigeminalnog neuropatskog bola.

7. LITERATURA

1. Abrahamsson C, Henrikson T, Nilner M, Sunzel B, Bondemark L, and Ekberg E (2013). TMD before and after correction of dentofacial deformities by orthodontic and orthognathic treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg* **42**: 752-758.
2. Al-Moraissi EA, Perez D, and Ellis III E (2017). Do patients with malocclusion have a higher prevalence of temporomandibular disorders than controls both before and after orthognathic surgery? A systematic review and meta-analysis. *J Cranio Maxillofac Surg* **45**: 1716-1723.
3. Bennett GJ and Xie YK (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**: 87-107.
4. Benoliel R, Teich S, and Eliav E (2016). Painful Traumatic Trigeminal Neuropathy. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am* **28**: 371-380.
5. Benoliel R, Kahn J, and Eliav E (2012). Peripheral painful traumatic trigeminal neuropathies. *Oral Dis* **18**: 317-332.
6. Bereiter, DA, Hirata, H, and Hu, JW (2000). Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn. *Pain* **88**: 221-224.
7. Bron C, Franssen J, Wensing M, and Oostendorp RA (2007). Interrater reliability of palpation of myofascial trigger points in three shoulder muscles. *J Man Manip Ther* **15**: 203-215.
8. Buteau KC (2009). Deuterated drugs: Unexpectedly nonobvious? *J High Tech* **10**, 22.
9. Chiou LC, Lee HJ, Ernst M, Huang WJ, Chou JF, Chen HL, Mouri A, Chen LC, Treven M, Mamiya T, Knutson, DE, Witzigmann C, Cook J, Sieghart W, Nabeshima T, and Fan PC (2018). Cerebellar $\alpha 6$ -subunit-containing GABAA receptors: a novel therapeutic target for disrupted prepulse inhibition in neuropsychiatric disorders. *Br J Pharmacol* **175**: 2414-2427.

10. Conti PR, Pertes RA, Heir GM, Nasri C, Cohen HV, and Araújo CD (2003). Orofacial pain: basic mechanisms and implication for successful management. *J Appl Oral Sci* **11**: 1-7.
11. Costigan M, Scholz J, and Woolf CJ (2009). Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* **32**: 1-32.
12. Costigan M and Woolf CJ (2000). Pain: molecular mechanisms. *J Pain* **1**: 35-44.
13. Delgado-Lezama R, Loeza-Alcocer E, Andrés C, Aguilar J, Guertin PA, and Felix R (2013). Extrasynaptic GABA(A) receptors in the brainstem and spinal cord: structure and function. *Curr Pharm Des* **19**: 4485-4497.
14. Deseure K and Hans GH (2015). Chronic constriction injury of the rat's infraorbital nerve (IoN-CCI) to study trigeminal neuropathic pain. *J Vis Exp* **103**.
15. Deseure K, Koek W, Adriaensen H, and Colpaert FC (2003). Continuous administration of the 5-hydroxytryptamine1A agonist (3-Chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[(5-methylpyridin-2-ylmethyl) -amino]-methyl]piperidin-1-yl]-methadone (F 13640) attenuates allodynia-like behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 505-514.
16. Dibbets JM, van der Weele LT, and Uildriks AK (1985). Symptoms of TMJ dysfunction: indicators of growth patterns? *J Pedod* **9**: 265-284.
17. Đorđević SM, Cekić ND, Savić MM, Isailović TM, Randelović DV, Marković BD, Savić SR, Timić Stamenić T, Daniels R, and Savić SD (2015). Parenteral nanoemulsions as promising carriers for brain delivery of risperidone: Design, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation. *Int J Pharm* **493**: 40-54.
18. Egermark I, Magnusson T, and Carlsson GE (2003). A 20-year follow-up of signs and symptoms of temporomandibular disorders and malocclusions in subjects with and without

- orthodontic treatment in childhood. *Angle Orthod* **73**: 109-115.
19. Eftekhari S, Salvatore CA, Johansson S, Chen TB, Zeng Z, and Edvinsson L (2015). Localization of CGRP, CGRP receptor, PACAP and glutamate in trigeminal ganglion. Relation to the blood-brain barrier. *Brain Res* **1600**: 93-109.
 20. Ettrup A, Hansen M, Santini MA, Paine J, Gillings N, Palner M, Lehel S, Herth MM, Madsen J, Kristensen J, and Begtrup M (2011). Radiosynthesis and in vivo evaluation of a series of substituted ¹¹C-phenethylamines as 5-HT_{2A} agonist PET tracers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **38**: 681-693.
 21. Fan PC, Lai TH, Hor CC, Lee MT, Huang P, Sieghart W, Ernst M, Knutson DE, Cook J, Chiou LC (2018). The $\alpha 6$ subunit-containing GABA_A receptor: A novel drug target for inhibition of trigeminal activation. *Neuropharmacol* **140**: 1-13.
 22. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, and Cordeiro MF (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *Faseb J* **28**:1317-1330.
 23. Greene, CS, and Laskin, DM (1988). Long-term status of TMJ clicking in patients with myofascial pain and dysfunction. *J Am Dent Assoc* **117**: 461-466.
 24. Gris G, Portillo-Salido E, Aubel B, Darbaky Y, Deseure K, Vela JM, Merlos M, and Zamanillo D (2016). The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats. *Sci Rep* **6**.
 25. Haviv Y, Zadik Y, Sharav Y, and Benoliel R (2014). Painful traumatic trigeminal neuropathy: an open study on the pharmacotherapeutic response to stepped treatment. *J Orofac Pain* **28**: 52-60.
 26. Hayasaki H, Sohma Y, Kanbara K, Maemura K, Kubota T, and Watanabe M (2006). A local GABAergic system within rat trigeminal ganglion cells. *Eur J Neurosci* **23**: 745-757.

27. Hehn AC, Baron R, and Woolf CJ (2012). Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. *Neuron* **73**: 638-642.
28. Hillemecher T, Leggio L, and Heberlein A (2015). Investigational therapies for the pharmacological treatment of alcoholism. *Expert Opin Investig Drugs* **24**: 17-30.
29. Howland RH (2015). Deuterated drugs. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv* **53**:13-16.
30. Iwata K, Imamura Y, Honda K, and Shinoda M (2011). Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. *Int Rev Neurobiol* **97**: 227-250.
31. Jaggi AS and Singh N (2011). Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Brain Res* **1381**: 187-201.
32. Jaiswal M, Dudhe R, and Sharma PK (2015). Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *Biotech* **5**: 123-127.
33. Jechlinger M, Pelz R, Tretter V, Klausberger T, and Sieghart W (1998). Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABAA receptors containing alpha6 subunits. *J Neurosci* **18**: 2449-2457.
34. Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, and Voipio J (2014). Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* **15**: 637-654.
35. Karim N, Wellendorph P, Absalom N, Johnston GA, Hanrahan JR, and Chebib M (2013). Potency of GABA at human recombinant GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes: a mini review. *Amino Acids* **44**: 1139-1149.
36. Kernisant M, Gear RW, Jasmin L, Vit JP, and Ohara PT (2008). Chronic constriction injury of the infraorbital nerve in the rat using modified syringe needle. *J Neurosci Methods* **172**: 43-47.

37. Knutson DE, Kodali R, Divovic B, Treven M, Stephen MR, Zahn NM, Dobricic V, Huber AT, Meirelles MA, Verma RS, Wimmer L, Witzigmann C, Arnold, LA, Chiou LC, Ernst M, Mihovilovic MD, Savic MM, Sieghart W, and Cook JM (2018). Design and synthesis of novel deuterated ligands functionally selective for the gamma-aminobutyric acid type a receptor (GABAAR) alpha6 subtype with improved metabolic stability and enhanced bioavailability. *J Med Chem* **61**: 2422-2446.
38. Korpi ER, Koikkalainen P, Vekovischeva OY, Mäkelä R, Kleinz R, Uusi-Oukari M, and Wisden W (1999). Cerebellar granule-cell-specific GABAA receptors attenuate benzodiazepine-induced ataxia: evidence from $\alpha 6$ -subunit-deficient mice. *Eur J Neurosci* **11**: 233-240.
39. Kramer PR and Bellinger LL (2013). Reduced GABAA receptor $\alpha 6$ expression in the trigeminal ganglion enhanced myofascial nociceptive response. *Neuroscience* **245**:1-11.
40. Lavelle ED, Lavelle W, and Smith HS (2007). Myofascial trigger points. *Anesthesiol Clin* **25**: 841-851.
41. Laskin DM, Ryan WA, and Green, CS (1986). Incidence of temporomandibular symptoms in patients with major skeletal malocclusions: a survey of oral and maxillofacial training programs. *Oral Surg* **61**: 537-541.
42. Link JJ and Nickerson JW (1992). Temporomandibular joint internal derangements in an orthognathic population. *Int J Adult Ortod Orthognat Surg* **7**: 161-169.
43. Liu H, Chen Y, Huang L, Sun X, Fu T, Wu S, Zhu X, Zhen W, Liu J, Lu G, Cai W, Yang T, Zhang W, Yu X, Wan Z, Wang J, Summerfield SG, Dong K, and Terstappen GC (2018). Drug Distribution into Peripheral Nerve. *J Pharmacol Exp Ther* **365**: 336-345.
44. Livak KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-

- time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**:402-408.
45. Luther F, Layton S, and McDonald F (2010). Orthodontics for treating temporomandibular joint (TMJ) disorders. *Cochrane database of systematic reviews*, **7**.
 46. Luther F (1998). Orthodontics and the temporomandibular joint: where are we now? Part 1. Orthodontic treatment and temporomandibular disorders. *Angle Orthod* **68**: 295-304.
 47. Magnusson T, Egermark I, and Carlsson GE (2000). A longitudinal epidemiologic study of signs and symptoms of temporomandibular disorders from 15 to 35 years of age. *J Orofac pain* **14**: 310-319.
 48. Manfredini D, Stellini E, Marchese-Ragona R, and Guarda-Nardini L (2014). Are occlusal features associated with different temporomandibular disorder diagnoses in bruxers? *Cranio* **32**: 283-288.
 49. Manfredini D, Peretta R, Guarda-Nardini L, and Ferronato G (2010). Predictive value of combined clinically diagnosed bruxism and occlusal features for TMJ pain. *Cranio* **28**: 105-113.
 50. Matougui N, Boge L, Groo AC, Umerska A, Ringstad U, Bysell H and Saulnier P (2016). Lipid based nanoformulations for peptide delivery. *Int J Pharm* **502**: 80-97.
 51. McNamara JA (1997). Orthodontic treatment and temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **83**: 107-117.
 52. Merrill LR (2007). Central Mechanisms of Orofacial Pain. *Dent Clin N Am* **51**: 45-59.
 53. Michot B, Bourgoin S, Viguiet F, Hamon M, and Kayser V (2012). Differential effects of calcitonin gene-related peptide receptor blockade by olcegepant on mechanical allodynia induced by ligation of the infraorbital nerve vs the sciatic nerve in the rat. *Pain* **153**: 1939-1948.

54. Mirheydari P, Ramerstorfer J, Varagic Z, Scholze P, Wimmer L, Mihovilovic MM, and Ernst, M (2014). Unexpected Properties of δ -Containing GABA A Receptors in Response to Ligands Interacting with the α^+ β^- Site. *Neurochem res* **39**: 1057-1067.
55. Mortensen M, Patel B, and Smart TG (2012). GABA Potency at GABA(A) Receptors Found in Synaptic and Extrasynaptic Zones. *Front Cell Neurosci* **6**: 1-10.
56. Muir CB and Gross AN (1990). The radiologic morphology of asymptomatic temporomandibular joints. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **70**: 349-354.
57. Napeñas JJ and Zakrzewska JM (2011). Diagnosis and management of trigeminal neuropathic pains. *Pain Man* **1**: 353-365.
58. Nusser Z, Sieghart W, and Somogyi P (1998). Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* **18**: 1693-1703.
59. Obradović AL, Joksimović S, Poe MM, Ramerstorfer J, Varagic Z, Namjoshi O, Batinić B, Radulović T, Marković B, Roth BL, Sieghart W, Cook JM, and Savić MM (2014). Sh-I-048a, an in Vitro Nonselective Super-Agonist At the Benzodiazepine Site of GABAA Receptors: the Approximated Activation of Receptor Subtypes May Explain Behavioral Effects. *Brain Res* **1554**: 36-48.
60. Okada-Ogawa A, Nakaya Y, Imamura Y, Kobayashi M, Shinoda M, Kita K, and Iwata K (2015). Involvement of medullary GABAergic system in extraterritorial neuropathic pain mechanisms associated with inferior alveolar nerve transection. *Exp Neurol* **267**: 42-52.
61. Okerson J (2003). Management of temporomandibular disorders and occlusion. 5th edn. St. Louis: Mosby

62. Olsen RW and Sieghart W (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* **60**: 243-260.
63. Panula K, Somppi M, Finne K, and Oikarinen K (2000). Effects of orthognathic surgery on temporomandibular joint dysfunction: A controlled prospective 4-year follow-up study.*Int J Oral Maxillofac Surg* **29**: 183-187.
64. Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, and Sperk G (2000). GABA A receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* **101**: 815-850.
65. Puri J, Vinothini P, Reuben J, Bellinger LL, Ailing L, Peng YB, and Kramer PR (2012). Reduced GABA(A) receptor $\alpha 6$ expression in the trigeminal ganglion alters inflammatory TMJ hypersensitivity. *Neuroscience* **213**: 179-190.
66. Puri J, Bellinger LL, and Kramer PR (2011). Estrogen in cycling rats alters gene expression in the temporomandibular joint, trigeminal ganglia and trigeminal subnucleus caudalis/upper cervical cord junction. *J Cell Physiol* **226**: 3169-3180.
67. Ramerstorfer J, Furtmüller R, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Sieghart W, and Ernst M (2011). The GABAA receptor $\alpha + \beta -$ interface: a novel target for subtype selective drugs. *J Neurosci* **31**: 870-877.
68. Renton T (2017). Chronic orofacial pain. *Oral Dis* **23**: 566-571.
69. Rodrigues-Garcia R, Sakai S, Rugh JD, Hatch JP, Tiner BD, van Sickels JE.,and Bays, RA (1998). Effects of major Class II occlusal corrections on temporomandibular signs and symptoms. *J Orofac pain* **12**: 185-192.

70. Rudolph U and Knoflach F (2011). Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 685-697.
71. Scrivani S and Spierings E (2016). Classification and Differential Diagnosis of Oral and Maxillofacial Pain. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am* **28**: 233-246.
72. Sessle BJ (2005). Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol* **71**: 117-136.
73. Sessle BJ (2000). Acute and chronic pain: Brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**: 57-91.
74. Sharma R, Strelevitz TJ, Gao H, Clark AJ, Schildknecht K, Obach RS, Ripp SL, Spracklin DK, Tremaine LM, and Vaz AD (2012). Deuterium Isotope Effects on Drug Pharmacokinetics. I. System-Dependent Effects of Specific Deuteration with Aldehyde Oxidase Cleared Drugs. *Drug Metab Dispos* **40**: 625-634.
75. Shen H, Shao S, Zhang J, Wang Z, Lv D, Chen W, Svensson P, and Wang K (2016). Fixed orthodontic appliances cause pain and disturbance in somatosensory function. *Eur J Oral Sci* **124**: 26-32.
76. Shibuta K, Suzuki I, Shinoda M, Tsuboi Y, Honda K, Shimizu N, Sessle BJ, and Iwata K (2012). Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. *Brain res* **1451**: 74-86.
77. Sieghart W and Savić MM (2018). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVI: GABAA receptor subtype-and function-selective ligands: key issues in translation to humans. *Pharmacol rev* **70**: 836-878.

78. Sieghart W and Ernst M (2005). Heterogeneity of GABAA receptors: revived interest in the development of subtype-selective drugs. *Curr Med Chem-Cent Nerv Sys Agents* **5**: 217-242.
79. Sieghart W (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol rev* **47**: 181-234.
80. Spencer CJ and Gremillion HA (2007). Neuropathic Orofacial Pain: Proposed Mechanisms, Diagnosis and Treatment Considerations. *Dent Clin N Am* **51**: 209-224.
81. Takkala P, Zhu Y, and Prescott SA (2016). Combined changes in chloride regulation and neuronal excitability enable primary afferent depolarization to elicit spiking without compromising its inhibitory effects. *PLoS comput biol* **12**: e1005215.
82. Tecco S, Marzo G, Crincoli V, Di Bisceglie B, Tete S, and Festa F (2012). The prognosis of myofascial pain syndrome (MPS) during a fixed orthodontic treatment. *Cranio* **30**: 52-71.
83. Treven M, Siebert DC, Holzinger R, Bampali K, Fabjan J, Varagic Z, Wimmer L, Steudle F, Scholze P, Schnürch M, Mihovilovic MD, and Ernst M (2018). Towards functional selectivity for $\alpha 6\beta 3\gamma 2$ GABAA receptors: a series of novel pyrazoloquinolinones. *Br J Pharmacol* **175**: 419-428.
84. Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lönnerberg P, Lou D, and Linnarsson S (2015). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* **18**: 145.
85. Varagic Z, Ramerstorfer J, Huang S, Rallapalli S, Sarto-Jackson I, Cook J, Sieghart W, and Ernst M (2013). Subtype selectivity of $\alpha +\beta$ - site ligands of GABAA receptors: identification of the first highly specific positive modulators at $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$ receptors. *Br J Pharmacol* **169**: 384-399.

86. Vos BP, Strassman AM, and Maciewicz RJ (1994). Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* **14**: 2708-2727.
87. Wei B, Kumada T, Furukawa T, Inoue K, Watanabe M, Sato K, and Fukuda A (2013). Pre- and post-synaptic switches of GABA actions associated with Cl⁻ homeostatic changes are induced in the spinal nucleus of the trigeminal nerve in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuroscience* **228**: 334-348.
88. Westermark A, Shayeghi F, and Thor A (2001). Temporomandibular dysfunction in 1,516 patients before and after orthognathic surgery. *Int J Adult Orthod Orthognath Surg* **16**: 145-151.
89. Wilcox SL, Gustin SM, Eykman EN, Fowler G, Peck CC, Murray GM, and Henderson L A (2013). Trigeminal nerve anatomy in neuropathic and non-neuropathic orofacial pain patients. *J Pain* **14**: 865-872.
90. Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, and Seeburg PH (1992). The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* **12**: 1040-1062.
91. Wu X, Wu Z, Ning G, Guo Y, Rashid AR, Macdonald RL, De Blas AL, Luscher B, and Chen G (2012). γ -Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptor α Subunits Play a Direct Role in Synaptic Versus Extrasynaptic Targeting. *J Biol Chem* **287**: 27417-27430.
92. Xie YF (2008). Glial involvement in trigeminal central sensitization. *Acta Pharmacol Sin* **29**: 641.

93. Waite PM and de Permentier P (1991). The rat's postero-orbital sinus hair: I. Brainstem projections and the effect of infraorbital nerve section at different ages. *J Comp Neurol* **312**: 325-340.
94. Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, and Seeburg PH (1992). The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* **12**: 1040-1062.
95. Woolf CJ and Salter MW (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**: 1765-1768.
96. Zeilhofer HU, Benke D, and Yevenes GE (2012). Chronic pain states: pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**:111-133.

8. BIOGRAFIJA

Dina Vasović rođena je 20.09.1988. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu. Stomatološki fakultet u Beogradu upisala je 2007. godine, a diplomirala u januaru 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,37. U toku studiranja bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta i zadužbine „Dragoljub Marinković“. Nakon obavljenog pripravnčkog staža na Klinikama Stomatološkog fakulteta, položila je stručni ispit za doktore stomatologije u februaru 2014. godine. Doktorske studije na Stomatološkom fakultetu u Beogradu, studijski program „Bazična i klinička istraživanja u stomatologiji“ upisala je 2013. godine, i položila je sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 10,0. Od 2013. do 2017. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja i priključena na Projekat Ministarstva „Kontrola bola i molekularni mehanizmi kao faktori regenerativne terapije u stomatologiji kod zdravih i obolelih od diabetes mellitus-a“. Od 2014. do 2016. bila je angažovana kao saradnik u nastavi na predmetima Javno zdravlje, Medicinska ekologija i Menadžment u stomatologiji u okviru integrisanih akademskih studija na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U februaru 2018. godine upisala je specijalističke studije iz oblasti Ortopedija vilica. Od aprila 2018. godine angažovana je kao istraživač saradnik na Projektu Ministarstva „Kontrola bola i molekularni mehanizmi kao faktori regenerativne terapije u stomatologiji kod zdravih i obolelih od diabetes mellitus-a“.

9. PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана **Дина Васовић**

број индекса **4004/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Селективна модулација ГАБА_A рецептора који садрже $\alpha 6$ подјединицу на експерименталном моделу тригеминалног 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, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Дина Васовић**

Број индекса **4004/2013**

Студијски програм **Базична и клиничка истраживања у стоматологији**

Наслов рада **Селективна модулација ГАБА_A рецептора који садрже $\alpha 6$ подјединицу на експерименталном моделу тригеминалног неуропатског бола**

Ментори **проф др Божидар Брковић**

проф Мирослав Савић

Потписана **Дина Васовић**

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, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Селективна модулација ГАБА_A рецептора који садрже α 6 подјединицу на експерименталном моделу тригеминалног 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

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, _____
