

Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Na VI redovnoj sednici Nastavno - naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 28. 05. 2019. godine, odluka broj 3/48, imenovana je komisija u sastavu:

Prof. dr Ivana Šćepan, Stomatološki fakultet, Beograd

Prof. dr Gavriilo Brajović, Stomatološki fakultet, Beograd

Doc. dr Jelena Roganović, Stomatološki fakultet, Beograd

Prof. dr Aleksandar Trbović, Medicinski fakultet, Beograd,

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom **SELEKTIVNA MODULACIJA GABAA RECEPTORA KOJI SADRŽE $\alpha 6$ PODJEDINICU NA EKSPERIMENTALNOM MODELU TRIGEMINALNOG NEUROPATSKOG BOLA.**

Kandidat: dr Dina Vasović

Mentor: Prof. dr Božidar Brković,

Komentor Prof. Miroslav Savić.

Imenovana Komisija je proučila doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Dine Vasović pod nazivom **SELEKTIVNA MODULACIJA GABAA RECEPTORA KOJI SADRŽE $\alpha 6$ PODJEDINICU NA EKSPERIMENTALNOM MODELU TRIGEMINALNOG NEUROPATSKOG BOLA** je napisana na 104 strane na kojima je prikazano 8 tabela, 15 slika i 96 referenci iz savremene, značajne naučne literature. Disertacija sadrži: rezime na srpskom i engleskom jeziku, uvod, hipotezu, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke, literaturu, upotrebene skraćenice i biografiju.

U **Uvodu** su obrazloženi najčešći razlozi za nastanak hroničnog bolnog stanja i neuropatija orofacijalne regije, u koje se mogu svrstati i stanja ortodontskih nepravilnosti, kao što je i bolna disfunkcija temporomandibularnog zgloba. Dalje, detaljno su opisani mehanizmi nastanka neuropatskog bola, uz razvoj periferne i centralne senzitivacije, koji mogu biti povezani sa traumom perifernog trigeminalnog nerva. Nadalje, opisan je model hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog nerva, kao animalni model trigeminalne neuropatije periferne grane trigeminusa, funkcionalno povezane sa trigeminalnim ganglionom. Pokazano je, isto tako, da su

dosadašnja istraživanja ukazala na značajnu aktivnost GABA neurotransmitera u kontroli orofacijalnog bola, posebno u razvoju centralne senzitivacije, hiperalgezije i alodinije. Imajući u vidu složene mehanizme GABA-ergičke aktivnosti, kao i specifičnosti vezane za selektivnu aktivaciju GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu u trigeminalnom ganglionu, opisani su nosintetisani ligandi koji se smatraju pozitivnim alosterim modulatorima ili nultim modulatorima ove podjedinice.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani: Dozno zavisnim ispitivanjem utvrditi koncentracije supstance DK-I-56-1 u plazmi i mozgu pacova jedan sat nakon intraperitonealne primene različitih doza supstance (2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg ili 20 mg/kg), nakon čega će biti utvrđen farmakokinetički profil izabrane doze DK-I-56-1 nakon intraperitonealne primene, merenjem koncentracija u uzorcima krvi i mozga u više vremenskih tačaka. Validirati model hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca, kao eksperimentalni model trigeminalne neuropatije, praćenjem izazvanog bolnog ponašanja pacova sa podvezanim infraorbitalnim nervom, u odnosu na životinje kontrolne grupe (kod kojih je nervu pristupljeno, ali on nije podvezan). Na validiranom modelu, ispitati terapijski efekat supstance DK-I-56-1 u smanjenju neuropatskog bola, praćenjem izazvanog bolnog ponašanja eksperimentalnih životinja, u poređenju sa supstancom slične hemijske strukture DK-I-87-1, koja ne utiče na aktivnost GABAA receptora koji sadrže $\alpha 6$ podjedinicu, i placebo. Komparativnom statističkom analizom takođe utvrditi razlike u ekspresiji nekih podjedinica GABAA receptora kao i hlornih kotransportera, kod pacova kojima je podvezan nerv u poređenju sa kontrolnom grupom (životinje koje su operisane, bez podvezivanja nerva).

U poglavlju **Materijal i metode** pregledno su date karakteristike eksperimentalnog istraživanja na laboratorijskim životinjama (pacovima) i jasno su definisani protokoli za izvođenje eksperimenta na modelu trigeminalne neuropatije po principima Dobre laboratorijske prakse. Posebno su prikazani metodi analize izazvanog bolnog ponašanja kod eksperimentalnih životinja kojima je podvezan živac, kao i kod životinja kontrolne grupe, praćenjem bolnog odgovora na stimulaciju von Frey filamentima u različitim vremenskim tačkama. Takođe, opisano je i praćenje izazvanog bolnog ponašanja eksperimentalnih životinja nakon intraperitonealne primene selektivnog modulatora $\alpha 6$ podjedinice GABAA receptora, i njegovog surkturnog analoga ili placeba. Pored toga, jasno i pregledno su prikazani metodi kvantitativne analize nivoa određenih podjedinica GABAA receptora, kao i hlornih kotransportera NKCC1 i KCC2 uz pomoć Real Time PCR-a. U statističkoj obradi podataka navedeni su svi racionalno upotrebljeni statistički testovi.

Rezultati su prikazani u četiri dela. Prikazani rezultati prate postavljene ciljeve. U prvom delu opisan je dozno zavisni efekat selektivnog modulatora $\alpha 6$ podjedinice GABAA receptora primenom različitih koncentracija ovog jedinjenja. Nakon odabira najpogodnije koncentracije od 10 mg/kg, opisan je njen farmakokinetički profil sa različitim parametrima. U drugom delu rezultata opisana je validacija animalnog modela hronične konstriktione povrede infraorbitalnog živca, kao modela trigeminalne neuropatije, praćenjem izazvanog bolnog ponašanja, kod životinja eksperimentalne i kontrolne grupe. U trećem delu rezultata, opisan je terapijski efekat DK-I-56-1 koji se postiže na ovom eksperimentalnom modelu u smanjenju bolnog odgovora, u poređenju sa životinjama koje su primale DK-I-87-1 ili placebo. Četvrti deo rezultata opisuje promene na molekularnom nivou u vidu promena u ekspresiji različitih podjedinica GABAA

receptora, kao i hlornih kotransportera kod životinja sa razvijenom trigeminalnom neuropatijom, u poređenju sa životinjama kontrolne grupe.

U **Diskusiji** je naučnom analizom dobijenih rezultata diskutovana značaj i pouzdanost animalnog modela trigeminalne neuropatije, odnosno, ukazano je na činjenicu da je model hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca validan i pouzdan metod istraživanja. Obrazloženi su i rezultati komparativne analize koja je pokazala terapijski potencijal liganda DK-I-56-1, kao pozitivnog modulatora $\alpha 6$ GABAA receptora, a koji je pogodan za ponavljnu primeu, u suzbijanju periferne trigeminalne neuropatije na eksperimentalnom modelu hronične konstrikcione povrede infraorbitalnog živca kod pacova. Istovremeno, dobijeni rezultati su povezani sa nalazima dosadašnjih savremenih, farmakoloških istraživanja u ovoj oblasti koji pokazuju da promene u ekspresiji $\alpha 6$ proteina GABAA receptora u trigeminalnom ganglionu, nastaju u sklopu razvoja trigeminalne neuropatije. Pošto do sada ne postoje utvrđeni protokoli u lečenju trigeminalne neuropatije, u diskusiji je ukazano da bi rezultati ove doktorske disertacije mogli da indukuju nove mogućnosti lečenja ovog patološkog stanja. Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata predstavljeni su zaključci koji daju jasne odgovore na postavljene ciljeve. U **literaturi** su navedene relevantne, savremene i značajne naučne reference koje su citirane u radu.

B. Kratak opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je nosintetisani selektivni modulator $\alpha 6$ podjedinice GABAA receptora, DK-I-56-1, koji pripada grupi deuterisanih pirazolohinolinona. Sprovedena je detaljna farmakokinetička analiza ovog jedinjenja na animalnom eksperimentalnom modelu pacova. Dobijeni rezultati pokazali su 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 konstrikcione povrede infraorbitalnog živca je potvrđen kao pouzdan ekperimentalni model trigeminalnog neuropatskog bola kod pacova. Primenjen je protokol hronične konstrikcione povrede, u kome su životinje sa razvijenom neuropatijom tokom 14 dana primale 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. Analizom rezultata dobijenih RT-PCR metodom, pokazano je statistički značajno smanjenje $\alpha 6$ podjedinice u levom u odnosu na desni trigeminalni ganglion, kao i smanjenje ekspresije oba ispitivana hlorna kotransportera, koji u učestvuju u regulaciji hlorne ravnoteže. Pozitivna modulacija GABAA $\alpha 6$ receptora primenom biokompatibilne formulacije DK-I-56-1 pogodne za hroničnu primenu, a dobijeni rezultati ukazuju da ovo jedinjenje može predstavljati novu terapijsku opciju za lečenje trigeminalnog neuropatskog bola.

C. Uporedna analiza doktorske disertacije

Imajući u vidu analizu mehanizama razvoja neuropatskog bola, posebno sa aspekta nastanka centralne senzitivacije i hiperalgezije povezane sa povredama nerva (Kaila i sar. 2014), neurofiziološka istraživanja su pokazala značajnu modatornu ulogu GABA neurotransmitera u

inhibiciji bola na nivou trigeminalnog gangliona (Hayasaki i sar. 2006). Pokazano je, takođe, da promene u jonskim razmenama, posebno hloridnih jona u trigeminalnom ganglionu, mogu da menjaju inhibitornu ulogu GABA-e u nastanku neuropatskog bola i razvoju alodinije (Wei i sar. 2013). Nadalje, patofiziološka istraživanja na eksperimentalnom modelu inflamatorne hiperalgezije temporomandibularnog zgloba pacova, ukazala su na činjenicu da, pored neurona, GABA aktivnost može da bude registrovana i u satelitskim glijama ćelijama trigeminalnog gangliona, čija inhibitorna aktivnost značajno redukuje inflamatornu reakciju u temporomandibularnom zglobu (Puri i sar. 2012). Takođe, regulatorna funkcija GABAA receptora u redukcija inflamacije registrovana je i na eksperimentalnom modelu miofacijalnog bola, gde je zabeležena značajna ekspresija aktivnosti gabra6 podjedinica GABAA receptora u uslovima razvijene inflamacije (Kramer, Bellinger 2013). Iako je od skora poznata pojava neuropatskog bola i kod pacijenata sa ortodontskim nepravilnostima, kod kojih može da bude razvijena i inflamatorna hiperalgezija temporomandibularnog zgloba i mišića orofacijalne regije, u literaturi postoje oskudni podaci koji bi ukazali na mehanizme razvoja i preporuke u lečenju trigeminalne neuropatije na modelu konstriktione hronične povrede nerva. S tim u vezi, od skora sintetisani metabolički stabilniji deuterisani analozi pirazolohinolinona – ligandi DK-I-56-1 i DK-I-87-1, funkcionalno selektivni za $\alpha 6$ podjedinicu GABAA receptora u trigeminalnom ganglionu (Knutson i sar. u pripremi).

D. Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Dina Vasović, Branka Divović, Marco Treven, Daniel E. Knutson, Friederike Steudle, Petra Scholze, Aleksandar Obradović, Jure Fabjan, Božidar Brković, Werner Sieghart, Margot Ernst, James M. Cook and Miroslav M. Savić. Trigeminal neuropathic pain development and maintenance in rats are suppressed by a positive modulator of $\alpha 6$ GABAA receptors. *European Journal of Pain* (2019), 23: 973-984.

D. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija **SELEKTIVNA MODULACIJA GABAA RECEPTORA KOJI SADRŽE $\alpha 6$ PODJEDINICU NA EKSPERIMENTALNOM MODELU TRIGEMINALNOG NEUROPATSKOG BOLA**, dr Dine Vasović, ima značajan i originalan naučni doprinos u otkrivanju novih terapijskih protokola za lečenje trigeminalnog neuropatskog bola. Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja, sa precizno definisanim ciljevima, originalnim naučnim pristupom, savremenom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i diskutovanim rezultatima i jasno uobličanim zaključcima. Pored toga, u dokorskoj disertaciji je primenjen nov eksperimentalni model istraživanja i savremene metode za procenu smanjenja bolnog odgovora kod eksperimentalnih životinja. Na osnovu svega napred navedenog, i imajući u vidu objavljeni rad iz oblasti doktorske disertacije, Komisija predlaže Nastavno - naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod naslovom **SELEKTIVNA MODULACIJA GABAA RECEPTORA KOJI SADRŽE $\alpha 6$ PODJEDINICU NA EKSPERIMENTALNOM MODELU TRIGEMINALNOG NEUROPATSKOG BOLA** dr Dine Vasović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora stomatoloških nauka.

U Beogradu, 2019. godine

Članovi komisije:

Prof. dr Ivana Šćepan

Prof. dr Gavriilo Brajović

Doc. Dr Jelena Roganović

Prof. dr Aleksandar Trbović
