

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET**

**Sonja Lj. Joksimović**

**Ispitivanje uloge kalcijumovih kanala T-  
tipa u animalnom modelu  
postincizionog bola**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2019**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY**

**Sonja Lj. Joksimović**

**Investigation of the role of T-type  
calcium channels in an animal model of  
postincisional pain**

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2019**

**MENTORI:**

---

Prof. dr Radica Stepanović-Petrović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Prof. dr Slobodan Todorović, redovni profesor  
Univerzitet u Koloradu – Medicinski fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

Prof. dr Sonja Vučković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

---

Prof. dr Maja Tomić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Doc. dr Ana Micov, docent  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

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

*Neizmernu zahvalnost dugujem profesorki Radici Stepanović-Petrović na strpljenju, konstruktivnim kritikama, pomoći i bezrezervnoj podršci koje mi je pružala sve ove godine. Profesoru Slobodanu Todoroviću sam veđito zahvalna na šansi i poverenju koje mi je ukazao kada je prihvatio da bude mentor mojoj doktorskoj disertaciji, kao i na svom znanju i iskustvu koje sam stekla uz njega.*

*Dugujem veliku zahvalnost i članovima Komisije prof. dr Maji Tomić, prof. dr Sonji Vučković i doc. dr Ani Micov, na svim stručnim sugestijama i dragocenim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Takođe želim da se zahvalim prof. dr Vesni Jevtović-Todorović na ukazanoj podršci tokom izrade doktorske disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem dr. Vesni Tešić na savetima i pomoći u vezi za molekularnim tehnikama korišćenim u doktorskoj disertaciji, ali i pre svega na nesebičnoj podršci i prijateljstvu kako u, tako i van laboratorije.*

*Osećam potrebu da se takođe zahvalim i svim ostalim članovima laboratorija prof. Slobodana Todorovića kao i prof. Vesne Jevtović-Todorović Univerziteta u Koloradu. Frančeska i Tamara, hvala Vam što ste bile uz mene i bodrile me svojim pozitivnim mislima i savetima u trenucima kada je to bilo potrebno.*

*Bez podrške porodice nije moguće ostvariti svoje snove. Ne postoje reči kojima bih mogla da opišem zahvalnost mom suprugu Srđanu na ljubavi, poštovanju i razumevanju. Njegovi saveti i pomoć oko eksperimenata bili su od neprocenjivog značaja za mene.*

*Konačno, sve što bih dalje rekla bilo bi suvišno i može se sažeti u delić stihova poeme "Ako" velikana Radjarda Kiplinga:*

. . .

*"Ako možeš da ispuniš minut koji ne prašta  
Sa šezdeset skupocenih sekunda,  
Tada je ceo svet tvoj i sve što je u njemu,  
I što je mnogo više, tada ćeš biti veliki Čovek, sine moj. "*

*Preveo Ivo Andrić*

*Za moju ćerku Sofiju i majku Svetlanu.*

# Ispitivanje uloge kalcijumovih kanala T-tipa u animalnom modelu postincizionog bola

## REZIME

**Svrha studije:** T-tip kalcijumovih kanala (T-kanal) je uključen u regulaciju neuronske ekscitabilnosti kako u fiziološkim, tako i u patološkim uslovima, kao što su epilepsija i hronični bol. Poznato je da antagonisti T-kanala, uključujući i neurosteroidne i njihove sintetske analoge, ublažavaju neuropatski bol. Ipak, uloga T-kanala nije ispitana u akutnom hirurškom modelu bola. Stoga je cilj našeg rada bio da se ispita: **1)** pojava hiperekscitabilnosti senzornih neurona spinalnih gangliona i promene u biofizičkim karakteristikama T-kanala u postincizionom modelu bola, **2)** antinociceptivni efekat antagonista T-kanala (TTA-P2, epipregnanolona i njegovog sintetskog analoga  $3\beta$ -OH) u postincizionom modelu bola, **3)** uticaj antinociceptivnih doza antagonista T-kanala na motornu spretnost eksperimentalnih životinja.

**Metode:** Kao model postoperativnog bola korišćen je *postincizioni model bola* u miševa i pacova. U ovom modelu bola hiperalgezija je merena u testovima termičke i mehaničke nocicepcije. *In vivo* ispitivanje uloge T-kanala u razvoju nocicepcije u postincizionom modelu bola izvršeno je u miševa kod kojih je globalno obrisan gen za Cav3.2 kalcijumov kanal (Cav3.2 KO), kao i u normalnih miševa (WT). Svi *in vitro* eksperimenti u ovom modelu bola izvršeni su na telima disociranih senzornih neurona spinalnih gangliona. Promene u ekscitabilnosti, uticaj T-kanala na hiperekscitabilnost senzornih neurona, kao i promene u biofizičkim karakteristikama T-kanala su ispitane elektrofiziološkom metodom na celim ćelijama. qRT-PCR, imunoblot i imunohistohemijska metoda su korišćene za ispitivanje promena u ćelijskoj ekspresiji T-kanala. Uticaj post-translacionih modifikacija na funkcionalnost T-kanala ispitan je primenom metode imunoblotova u cilju utvrđivanja promena u ekspresiji USP5 enzima, zaduženog za deubikvitinaciju Cav3.2 podtipa T-kanala. Uloga USP5 enzima ispitana je u bihejvioralnim testovima na pacovima i miševima kod kojih je privremeno sprečena produkcija USP5 enzima primenom shRNK-USP5 pre sprovođenja incizije. U ispitivanju uticaja smanjene produkcije USP5 enzima na biofizičke karakteristike T-

kanala korišćeni su *in vitro* elektrofiziološki eksperimenti. Antihiperalgezijski efekat tat III-IV peptida, tretmana koji selektivno sprečava interakciju između USP5 enzima i Cav3.2 kanala, ispitan je u bihejvioralnim testovima u miševa. Antihiperalgezijski efekat antagonista T-kanala (TTA-P2, epipregnanolon i 3 $\beta$ -OH) je ispitan u bihejvioralnim testovima u postincizionom modelu bola u pacova. Serija testova koji procenjuju motoričku sposobnost (hodanje po gredi, uzdignuta platforma i ravna površina pod uglom) korišćena je za procenu uticaja antinociceptivnih doza antagonista T-kanala na motornu spretnost pacova.

**Rezultati: 1)** Hiperalgizija kod Cav3.2 KO miševa je trajala kraće u odnosu na WT miševe. Disocirana tela senzornih neurona spinalnih gangliona ispoljila su povećanu ekscitabilnost nakon incizije, koja je bila smanjena primenom selektivnog blokatora T-kanala. Gustina T-struja izmerena na telima senzornih neurona bila je povećana nakon incizije, međutim qRT-PCR i metoda imunoblotova nisu registrovale povećanje ekspresije T-kanala. S druge strane, imunohistohemijsko bojenje je pokazalo povećanje membranske frakcije T-kanala nakon incizije. Imunoblot analizom tkiva spinalnih gangliona nakon incizije registrovano je povećanje USP5 enzima. shRNK-USP5 signifikantno je smanjio hiperalgiziju u postincizionom modelu bola u WT miševa i pacova, ali ne i u Cav3.2 KO miševa. U istom modelu bola tat III-IV peptid je ispoljio antinociceptivni efekat u WT, ali ne i u Cav3.2 KO miševa. **2)** Intratekalna primena TTA-P2, epipregnanolona i 3 $\beta$ -OH dovela je do antinociceptivnog dejstva u postincizionom modelu bola. U ovom modelu bola 3 $\beta$ -OH primenjen intraplantarno doveo je do skraćenja trajanja hiperalgizije. Takođe, nakon sistemske primene 3 $\beta$ -OH je doveo do hipnotičkog efekta, neophodnog za izvođenje hirurške incizije, kao i do antinociceptivnog efekta tokom postoperativnog oporavka. **3)** Antinociceptivne doze ispitivanih antagonista T-kanala nisu ispoljile značajan uticaj na motornu sposobnost pacova.

**Zaključak:** U postincizionom modelu bola dolazi do pojave hiperekscitabilnosti senzornih neurona koja je delimično izazvana povećanjem struja koje potiču od T-kalcijumovih kanala. Ove promene nastaju kao posledica povećanja membranske ekspresije T-kanala, do koje dolazi usled deubikvitinacije pod uticajem povećanja ekspresije USP5 enzima. Izostanak efekta privremenog sprečavanja produkcije USP5 enzima u Cav3.2 KO miša, kao i efekat tat III-IV peptida ukazuju na specifičnost

interakcije između ovog enzima i kanala. Brisanje gena za Cav3.2 kalcijumov kanal skraćuje vreme trajanja hiperalgezije u postincizionom modelu bola što ukazuje na značaj ovih kanala u razvoju hiperalgezije. Antihiperalgezijski efekat antagonista T-kalcijumovih kanala, a posebno 3β-OH ukazuje na njihovu potencijalnu efikasnost u preventivnom i suportivnom tretmanu postoperativnog bola.

**Ključne reči:** T-kanali, postincizioni bol, USP5, deubikvitinacija, antagonisti T-kanala, neurosteroidi, modulacija bola, mehanizmi razvoja bola.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmakologija

**UDK broj:** 616-092.4:[616.8-009.624:615.212(043.3)]

# Investigation of the role of T-type calcium channels in an animal model of postincisional pain

## Abstract

**Background and aim:** T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (T-channels) are implicated in regulation of neuronal excitability under physiological conditions, as well as in pathological states, such as epilepsy and chronic pain. It is known that T-channel antagonists, including neurosteroids and their synthetic analogues, alleviate neuropathic pain. However, their role in acute postoperative pain is yet to be established. Therefore, the aim of our study was to investigate: **1)** the changes in biophysical properties of T-channels and their implication in alteration of peripheral sensory neurons' excitability arising from postincisional pain model, **2)** antinociceptive potential of T-channel antagonists (TTA-P2, epipregnanolon and its synthetic analogue  $3\beta\text{-OH}$ ) in post-surgical pain model, **3)** the influence of antinociceptive doses of T-channel antagonists on motor performance in experimental animals.

**Methods:** *Incisional pain model* was used to investigate the role of T-channels in post-surgical pain in both mice and rats. For behavioral experiments, hyperalgesia assessment was examined with thermal and mechanical nociception tests. *In vivo* assessment of the role of T-channels in the development of nociception after surgical incision was performed on wild type as well as on mice with global knock-down of Cav3.2 isoform of T-calcium channel. All further *in vitro* experiments were performed on dissociated cell bodies of sensory neurons of dorsal root ganglia. The changes in excitability of peripheral sensory nociceptive neurons, the involvement of T-channels in hyperexcitability, as well as the changes in biophysical properties in T-channels were assessed using whole cell patch clamp electrophysiology technique. qRT-PCR, western blotting and immunohistochemistry were used to investigate changes in cellular expression of T-channels in incisional pain model. To study the role of posttranslational modifications on the functional properties of T-channels, western blot technique was used to assess the changes in USP5, an enzyme that promotes deubiquitination of Cav3.2 subtype of T-channels, in dorsal root ganglia of mice. Selective knock-down of USP5 with shRNA-USP5 before surgery was



used to investigate its role in the development of post-surgical hyperalgesia in behavioral tests. Changes in biophysical properties of T-channels after USP5 downregulation were assessed using electrophysiology technique. The antihyperalgesic effect of tat III-IV peptide, treatment that selectively prevents interaction between USP5 and Cav3.2 T-channel, was assessed in behavioral tests in mice. Antihyperalgesic effect of T-channel antagonists (TTA-P2, endogenous neurosteroid epipregnanolone and synthetic analogue 3 $\beta$ -OH) were assessed in incisional pain model in behavioral tests in rats. Sensory motor battery of tests (plank, elevated platform and inclined plane) were used to assess the influence of antinociceptive doses of T-channel blockers on motor performance in rats.

**Results: 1)** Cav3.2 KO mice exhibited shorter lasting postincisional hyperalgesia as compared to the WT mice. Dissociated cell bodies of sensory neurons exhibit increased excitability after incision, which can be ameliorated with T-channel blocker TTA-P2. Cell bodies of dissociated neurons exhibit increased T-currents after incision, however no apparent increase in protein production was detectable in qRT-PCR and western blot tests. On the other hand, immunohistochemistry showed an increase of membrane protein fraction of Cav3.2 T-channel. Western blot data from the tissue of dorsal root ganglia confirmed an increase in USP5 expression. Tat III-IV peptide significantly reduced hyperalgesia after the incision in WT but not in KO mice. **2)** Intrathecal application of TTA-P2, epipregnanolone and 3 $\beta$ -OH exerted antinociceptive effect in postincisional pain model. Intraplantar application of 3 $\beta$ -OH reduced the duration of hyperalgesia after incision. Also, 3 $\beta$ -OH applied systemically induced hypnotic effect necessary to produce anesthesia to perform incisional surgery, as well as antihyperalgesic effect during post-surgical recovery period in rats. **3)** TTA-P2, epipregnanolone and 3 $\beta$ -OH did not influence motor performance of the rats.

**Conclusion:** Increased T-currents partly contribute to the increased excitability of sensory neurons after surgical incision. Changes in T-currents are mediated due to the increased deubiquitination of Cav3.2 channels via increased levels of USP5, leading to the increased membrane expression of the channel. The specificity of this mechanism is confirmed with the lack of antihyperalgesic effect of either selective knock-down of USP or treatment with tat III-IV in Cav3.2 KO mice. Also, successful

reduction of postincisional pain by T-channel blockers,  $3\beta$ -OH in particular, may introduce a new therapeutic approach for the preemptive and supportive treatment of post-operative pain in humans.

**Keywords:** T-channels, incisional pain, USP5, deubiquitination, T-channel antagonists, neurosteroids, pain modulation, mechanism of pain development.

**Academic expertise: Pharmacy**

**Major in: Pharmacology**

**UDC N°: 616-092.4:[616.8-009.624:615.212(043.3)]**

# Sadržaj

<b>I UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Bol – definicija i klasifikacija</b> .....	<b>1</b>
1.1. Klasifikacija bolnih stanja.....	2
1.1.1. <i>Postoperativni bol i terapijski pristup</i> .....	3
<b>2. Anatomska organizacija aferentnih puteva bola</b> .....	<b>4</b>
2.1. Procesi prenosa i obrade informacije o bolu.....	4
2.1.1. <i>Trandukcija</i> .....	5
2.1.1.1. <i>Uticaoaj inflamacije na transdukciju</i> .....	6
2.1.2. <i>Transmisija</i> .....	8
2.1.2.1. <i>Uticaoaj inflamacije na transmisiju</i> .....	11
2.1.3. <i>Modulacija bola</i> .....	11
<b>3. Uloga kalcijumovih kanala u bolu</b> .....	<b>13</b>
3.1. Genetička klasifikacija kalcijumovih kanala.....	14
3.2. Distribucija kalcijumovih kanala duž puteva bola.....	16
3.3. Uloga T-kanala u bolu.....	18
3.3.1. <i>Biofizičke karakteristike T-kanala</i> .....	18
3.3.2. <i>Uloga T-kanala u modulaciji bola</i> .....	20
3.3.3. <i>Uloga T-kanala u animalnim modelima bola</i> .....	22
3.3.4. <i>Regulacija funkcije T-kanala u bolu</i> .....	23
3.3.4.1. <i>Mehanizmi regulacije membranske ekspresije T-kanala</i> .....	24
3.3.4.1.1. <i>Značaj ubikvitinacije T-kanala u bolu</i> .....	24
<b>4. Uloga antagonista kalcijumovih kanala u terapiji bola</b> .....	<b>26</b>
4.1. Antagonisti kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri višim potencijalima.....	26
4.2. Antagonisti T-kanala u terapiji bola.....	29
4.2.1. <i>TTA-P2</i> .....	30
4.2.2. <i>Neurosteroidi</i> .....	31
<b>II CILJEVI RADA</b> .....	<b>34</b>
<b>III MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>37</b>
<b>1. Eksperimentalne životinje</b> .....	<b>37</b>
<b>2. Supstance korišćene u eksperimentima</b> .....	<b>38</b>

<b>3. Eksperimentalni model bola.....</b>	<b>40</b>
3.1. Model somatskog akutnog bola – postincizioni bol u pacova i miševa.....	40
3.1.1. <i>Ispitivanje uloge T-kanala u razvoju postincizionog bola primenom miševa kod kojih je izbačen gen za Cav3.2 T-kanal.....</i>	<i>42</i>
<b>4. Bihevioralni testovi.....</b>	<b>42</b>
4.1. Testiranje mehaničke hiperalgezije u pacova i miševa.....	42
4.2. Testiranje termičke hiperalgezije u pacova.....	43
4.3. Testovi za procenu motorne spretnosti u pacova.....	44
<b>5. Elektrofiziološko ispitivanje uloge T-kanala u postincizionom bolu.....</b>	<b>45</b>
5.1. Ispitivanje ekscitabilnosti tela senzornih neurona spinalnih gangliona u postincizionom modelu bola u pacova.....	47
5.1.1. <i>Primena selektivnog blokatora T-kanala u ispitivanju ekscitabilnosti senzornih neurona gangliona dorzalnih korenova u postincizionom modelu bola u pacova.....</i>	<i>48</i>
5.2. Ispitivanje promena u biofizičkim parametrima koji karakterišu T-kanale na disociranim senzornim neuronima spinalnih gangliona u postincizionom bolu u pacova .....	48
<b>6. In vitro utvrđivanje promena u ekspresiji T-kanala u postincizionom bolu u pacova.....</b>	<b>49</b>
6.1. Ispitivanje ekspresije T-kanala pomoću kvantitativne PCR u realnom vremenu (qRT-PCR) u postincizionom bolu u pacova.....	49
6.1.1. <i>Izolacija RNK i reverzna transkripcija (RT).....</i>	<i>50</i>
6.1.2. <i>qRT-PCR.....</i>	<i>50</i>
6.2. Ispitivanje nivoa proteina T-kanala semikvantitativnom analizom imunoblotova u postincizionom bolu u pacova.....	51
6.2.1. <i>Izolovanje ukupnih ćelijskih proteina iz spinalnih gangliona regiona L4–L6 pacova.....</i>	<i>52</i>
6.2.2. <i>Elektrotransfer proteina iz uzoraka tkiva pacova.....</i>	<i>52</i>
6.2.3. <i>Imunološka detekcija proteina iz uzoraka tkiva pacova specifičnim antitelima – imunoblot metoda.....</i>	<i>53</i>
6.2.4. <i>Semikvantitativna analiza imunoblotova uzoraka tkiva pacova.....</i>	<i>53</i>
6.3. Ispitivanje ekspresije membranske frakcije imunocitohemijskim obeležavanjem T-kanala na membranama disociranih senzornih neurona spinalnih gangliona pacova u postincizionom bolu.....	54
6.3.1. <i>Određivanje intenziteta fluorescence.....</i>	<i>55</i>
<b>7. Ispitivanje uloge deubikvitinacije T-kanala enzimom USP5 u razvoju hiperalgezije nakon incizije u pacova i miševa.....</b>	<b>55</b>

7.1. Ispitivanje nivoa USP5 proteina semikvantitativnom analizom imunoblotova u postincizionom bolu u miševa.....	55
7.1.1. Izolovanje ukupnih ćelijskih ekstrakata iz spinalnih gangliona lumbalne regije L4–L6 miševa.....	55
7.1.2. Imunoprecipitacija USP5 enzima iz uzorka.....	56
7.1.3. Semikvantitativna analiza imunoblotova.....	56
7.2. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta supresije deubikvitinacije T-kanala selektivnim smanjenjem ekspresije (tzv. <i>knock-down</i> ) USP5 enzima u pacova i miševa.....	57
7.3. Ispitivanje uticaja supresije deubikvitinacije selektivnim smanjenjem ekspresije (tzv. <i>knock-down</i> ) USP5 enzima na funkcionalnost T-kanala u pacova.....	58
7.4. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta selektivne blokade veznog mesta USP5 enzima za ciljano mesto na T-kanalu primenom tat peptida u miševa.....	58
<b>8. Ispitivanje antinociceptivnog efekta antagonista T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova.....</b>	<b>59</b>
8.1. Ispitivanje antinociceptivnog efekta selektivnog blokatora T-kanala TTA-P2 nakon lokalne intratekalne primene u zdravih pacova.....	59
8.2. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta TTA-P2 nakon pojedinačne i ponovljene intratekalne primene u inciziranih pacova.....	60
8.2.1. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta TTA-P2 nakon pojedinačne intratekalne primene u inciziranih pacova.....	60
8.2.2. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta TTA-P2 nakon ponovljene intratekalne primene u inciziranih pacova.....	61
8.3. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta TTA-P2 pojedinačne preventivne intratekalne injekcije neposredno pre hirurške intervencije u inciziranih pacova.....	62
8.4. Ispitivanje antinociceptivnog efekta neuroaktivnog steroida epipregnanolona nakon pojedinačne intratekalne primene u zdravih pacova.....	63
8.5. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta epipregnanolona nakon pojedinačne intratekalne primene u inciziranih pacova.....	64
8.6. Ispitivanje antinociceptivnog efekta neuroaktivnog steroida 3β-OH nakon pojedinačne intratekalne primene u zdravih pacova.....	65

8.7. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta neuroaktivnog steroida 3 $\beta$ -OH nakon pojedinačne i ponovljene intratekalne, kao i nakon ponovljene intraplantarne primene u inciziranih pacova.....	66
8.7.1. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta neuroaktivnog steroida 3 $\beta$ -OH nakon pojedinačne intratekalne primene u inciziranih pacova.....	66
8.7.2. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta neuroaktivnog steroida 3 $\beta$ -OH nakon ponovljene intratekalne primene u inciziranih pacova.....	67
8.7.3. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta neuroaktivnog steroida 3 $\beta$ -OH nakon ponovljene intraplantarne primene u inciziranih pacova.....	68
8.8. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta neuroaktivnog steroida 3 $\beta$ -OH nakon pojedinačne intraperitonealne primene u sastavu anestezije za incizionu operaciju.....	69
<b>9. Statistička obrada rezultata.....</b>	<b>70</b>
<b>IV REZULTATI.....</b>	<b>72</b>
<b>1. In vivo uloga T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova i miševa .....</b>	<b>72</b>
1.1. Razvoj hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova.....	72
1.2. Razvoj hiperalgezije u postincizionom modelu bola u WT miševa.....	73
1.3. Razvoj hiperalgezije u postincizionom modelu bola u miševa kod kojih je izbačen gen za Cav3.2 T-kalcijumov kanal (Cav3.2 KO) – ispitivanje uloge T-kanala.....	74
<b>2. Elektrofiziološko ispitivanje uloge T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova.....</b>	<b>74</b>
2.1. Promene u ekscitabilnosti tela primarnih senzornih neurona spinalnih gangliona lumbalnog regiona L4–L6.....	75
2.1.1. Uticaj T-kanala na ekscitabilnost primarnih senzornih neurona spinalnih gangliona.....	76
2.1.2. Uticaj TTA-P2 na broj akcionih potencijala.....	76
2.1.3. Uticaj inkubacije neurona sa TTA-P2 na frekvencu akcionih potencijala.....	77
2.2. Promene u biofizičkim parametrima (veličini i gustini struja) koje karakterišu T-kanale u postincizionom bolu.....	78
<b>3. Promene u ekspresiji T-kanala na telima senzornih neurona spinalnih gangliona u postincizionom bolu u pacova.....</b>	<b>80</b>
3.1. Ispitivanje ekspresije Cav3.2 T-kanala qRT-PCR i metodom imunoblotova u pacova.....	80

3.2. Imunocitohemijsko ispitivanje ekspresije Cav3.2 T-kanala na telima senzornih neurona spinalnih gangliona nakon incizije u pacova .....	82
<b>4. Uloga deubikvitinacije T-kanala enzimom USP5 u razvoju hiperalgezije nakon incizije u miševa i pacova.....</b>	<b>83</b>
4.1. Ispitivanje nivoa ekspresije USP5 enzima u postincizionom modelu bola u miševa .....	83
4.2. Uticaj selektivne supresije produkcije USP5 enzima na razvoj mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova i miševa.....	84
4.2.1. <i>Uticaj selektivne supresije produkcije USP5 enzima na razvoj mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u miševa.....</i>	<i>84</i>
4.2.2. <i>Uticaj selektivne supresije produkcije USP5 enzima na razvoj mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova .....</i>	<i>86</i>
4.3. Uticaj selektivne supresije deubikvitinacije selektivnim smanjenjem ekspresije (tzv. <i>knock-down</i> ) USP5 enzima, na kalcijumove struje koje potiču od T-kanala, izmerenih u akutno disociranih primarnih senzornih neurona spinalnih gangliona lumbalnog regiona L4–L6 u postincizionom modelu bola u pacova.....	87
4.4. Uticaj selektivne blokade veznog mesta USP5 enzima na T-kanalu primenom tat peptida.....	88
<b>5. Efekti antagonista T-kanala u postincizionom modelu bola.....</b>	<b>91</b>
5.1. Efekat TTA-P2 u zdravih pacova.....	91
5.2. Efekat pojedinačne i ponovljene intratekalne primene TTA-P2 u postincizionom modelu bola u pacova.....	92
5.2.1. <i>Efekat pojedinačne intratekalne primene TTA-P2 u postincizionom modelu bola u pacova.....</i>	<i>92</i>
5.2.2. <i>Efekat ponovljene intratekalne primene TTA-P2 u postincizionom modelu bola u pacova.....</i>	<i>93</i>
5.3. Efekat pojedinačne preventivne intratekalne primene TTA-P2 u postincizionom modelu bola u pacova.....	97
5.4. Efekat epipregnanolona u zdravih pacova.....	98
5.5. Efekat pojedinačne intratekalne primene epipregnanolona u postincizionom modelu bola u pacova .....	99
5.6. Efekat intratekalno primenjenog 3 $\beta$ -OH u zdravih pacova.....	100
5.6.1. <i>Uticaj stereoselektivnosti na antinociceptivni efekat 3<math>\beta</math>-OH u zdravih pacova.....</i>	<i>101</i>
5.7. Efekat pojedinačne i ponovljene intratekalne, kao i ponovljene intraplantarne primene 3 $\beta$ -OH u postincizionom modelu bola u pacova.....	101

5.7.1. Efekat pojedinačne intratekalne primene $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola u pacova.....	101
5.7.2. Efekat ponovljene intratekalne primene $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola u pacova.....	103
5.7.3. Efekat ponovljene intraplantarne primene $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola u pacova.....	105
5.8. Efekat pojedinačne preventivne intraperitonealne primene $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola u pacova.....	106
<b>6. Efekat primenjenih antagonista T-kanala na motornu sposobnost pacova.....</b>	<b>107</b>
<b>V DISKUSIJA.....</b>	<b>108</b>
<b>1. Uloga T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova i miševa.....</b>	<b>108</b>
<b>2. In vitro elektrofiziološko ispitivanje uloge T-kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova.....</b>	<b>111</b>
2.1. Ekscitabilnost senzornih neurona u postincizionom bolu u pacova.....	112
2.2. Uticaj T-kanala na ekscitabilnost primarnih senzornih neurona spinalnih ganglija u postincizionom bolu u pacova.....	113
2.3. Promene u veličini i gustini struja koje potiču od T-kanala u postincizionom bolu u pacova.....	114
<b>3. In vitro ispitivanje promene u ekspresiji T-kanala na telima senzornih neurona spinalnih ganglija nakon incizije u pacova.....</b>	<b>116</b>
3.1. Promene u ekspresiji T-kanala na spinalnim ganglionima nakon incizije u pacova.....	116
3.2. Imunocitohemijska potvrda povećanja membranske frakcije Cav3.2 T-kanala na nivou disociranih tela senzornih neurona u postincizionom bolu u pacova.....	117
<b>4. Uloga deubikvitinacije T-kanala pomoću USP5 enzima u razvoju hiperalgezije nakon incizije u pacova i miševa.....</b>	<b>118</b>
4.1. Ekspresija USP5 enzima u postincizionom modelu bola u miševa.....	118
4.2. Uticaj selektivne supresije produkcije USP5 enzima na razvoj mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova i miševa.....	119
4.3. Uticaj smanjene ekspresije USP5 enzima na gustinu struja koje potiču od T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova.....	120
4.4. Uticaj selektivne blokade vezivanja USP5 enzima za T-kanal primenom tat peptida na postincizionu hiperalgeziju u miševa.....	121



<b>5. Antinociceptivni efekat antagonista T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova.....</b>	<b>122</b>
5.1. Antinociceptivni efekat TTA-P2 u zdravih pacova.....	122
5.2. Antinociceptivni efekat pojedinačne i ponovljene intratekalne primene TTA-P2 nakon incizije u pacova.....	123
5.3. Antinociceptivni efekat pojedinačne preventivne intratekalne primene TTA-P2 pre incizije na razvoj hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova.....	125
5.4. Antinociceptivni efekat intratekalne primene epipregnanolona u zdravih pacova.....	126
5.5. Antinociceptivni efekat pojedinačne intratekalne primene epipregnanolona nakon incizije u pacova.....	126
5.6. Antinociceptivni efekat intratekalne primene 3 $\beta$ -OH u zdravih pacova.....	127
5.7. Antinociceptivni efekat pojedinačne i ponovljene intratekalne, kao i ponovljene intraplantarne primene 3 $\beta$ -OH u postincizionom modelu bola.....	129
5.8. Antinociceptivni efekat pojedinačne preventivne intraperitonealne primene 3 $\beta$ -OH u postincizionom modelu bola.....	130
<b>6. Bezbednost primene antagonista T-kanala.....</b>	<b>132</b>
<b>VI ZAKLJUČCI.....</b>	<b>133</b>
<b>VII LITERATURA.....</b>	<b>136</b>

## I. UVOD

Dok je bol u fiziološkim uslovima prijatelj organizma, jer upozorava da postoji trajno ili potencijalno oštećenje tkiva, u patološkim stanjima bol je onesposoljavajući, kako fizički, tako i psihički. Stoga, bol postaje problem zdravstvenih radnika, kao i okruženja, koji zajedno pružaju podršku pacijentima koji pate od fizičkih i emotivnih posledica perzistentnih bolnih stanja. Zbog toga je od esencijalnog značaja nastaviti potragu za otkrivanjem novih mehanizama koji dovode do razvoja bolnih stanja, a samim tim i novih alternativnih analgetika, koji bi doprineli savremenim pristupima otklanjanju bola.

### 1. Bol – definicija i klasifikacija

Internacionalno udruženje za ispitivanje bola (eng. *International Association for the Study of Pain*) definiše bol kao neprijatno senzorno i emocionalno iskustvo vezano za stvarno ili potencijalno oštećenje tkiva i/ili senzornih nerava. Jedna od glavnih funkcija nervnog sistema je da obezbedi informaciju o aktuelnoj ili potencijalnoj opasnosti od povrede. Bol je u fiziološkim uslovima poželjan, jer upozorava organizam na postojeće ili potencijalno oštećenje tkiva (Millan, 1999). Međutim, ukoliko perzistira i nakon što je uzrok bola otklonjen, postaje nepotreban, pa čak i onesposobljavajući. Zbog toga je otklanjanje bola jedan od najznačajnijih ciljeva savremene medicine. Međutim, neretko se dešava da postojeća terapija nije dovoljna, jer ne može adekvatno da pomogne u lečenju svakog bolnog stanja. Otkrivanje novih mehanizama koji dovode do razvoja bolnih stanja, a samim tim i novih alternativnih analgetika, koji ciljano deluju u okviru tih mehanizama, je neophodno kako bi se unapredile terapije za ublažavanje izvesnih bolnih stanja.

Koliko je značaj detekcije bolnih stimulusa važan, evidentno je kod individua sa kongenitalnom neosetljivošću na različite vrste bola, kao što je probadajući bol od oštrog predmeta, bol kod opekotina ili preloma kosti (Danziger i sar., 2009). Usled izostanka osećaja za bol, kod ovih pacijenata izostaje protektivno ponašanje koje bi zaštitilo organizam od daljeg oštećenja ili povrede, pa čak i životno-ugrožavajućih stanja. S druge strane, ukoliko bol perzistira i nakon zaceljivanja oštećenog tkiva, bol gubi fiziološku funkciju i postaje vrlo često onesposobljavajući, utičući negativno na

kvalitet života pacijenta. Ovakav bol je patološke prirode i zahteva primenu adekvatne terapije.

### 1.1. Klasifikacija bolnih stanja

Bol se može klasifikovati na različite načine u zavisnosti od posmatranog kriterijuma. Prema dužini trajanja, bol može biti **akutni, subakutni i hronični**, a prema mehanizmu nastanka deli se na **nociceptivni i neuropatski**. Akutni bol traje do 30 dana, subakutni od jednog do šest meseci, a hroničan bol duže od šest meseci (Thienhaus i Cole, 2002).

**Nociceptivni bol** se razvija pod štetnim uticajem noxi (štetnih stimulusa), koje mogu biti mehaničke, termičke i hemijske prirode. Pod uticajem ovih stimulusa, dolazi do senzitivizacije ogoljenih nervnih završetaka perifernih senzornih vlakana, odnosno nociceptora. Ovaj tip bola predstavlja prirodan odgovor nervnog sistema na stimulus koji ugrožava organizam (Stenkowski i sar, 2012), pa je stoga prirodna reakcija organizma na nociceptivni bol averzivna (npr. trzaj ruke na vruć stimulus). Prema mestu nastanka, nociceptivni bol može biti **visceralni i somatski** (Tomić i Stepanović–Petrović, 2017).

**Visceralni bol** nastaje usled povrede ili ishemije unutrašnjih organa (npr. srca, pluća, jetre, bubrega), kao i usled spazma ili distenzije glatke muskulature žučnih i bubrežnih puteva. Ovaj tip bola je obično nejasne lokalizacije i reflektuje se i na okolne organe. Visceralni bol je praćen simptomima aktivacije autonomnog nervnog sistema (mučnina, povraćanje, znojenje, hipotenzija i dr.), jer se visceralna senzorna vlakna nalaze u sastavu autonomnih nerava. Prema dužini trajanja, i ovaj tip bola može biti akutni (npr. bol kod akutnog infarkta miokarda, bubrežne i žučne kolike) i hronični (npr. kancer jetre, ovarijuma i dr.).

**Somatski bol** nastaje kao posledica aktivacije somatskih senzornih nervnih vlakana, koja inervišu površinska tkiva (kožu, potkožno tkivo), ekstremitete (mišiće, zglobove, kosti i ligamente) i glavu i obično je jasne lokalizacije. Prema dužini trajanja, somatski nociceptivni bol može biti akutni (npr. zubobolja, tenziona glavobolja, opekotine, frakture, postoperativni bol) i hronični (npr. migrena i artritis).

**Neuropatski bol** nastaje usled strukturnih i funkcionalnih promena na nivou nervnih vlakana bolnog puta. Ove patološke promene dovode do pojave povećane aktivnosti tj. hiperekscitabilnosti dela nervnog sistema zaduženog za bol, usled čega se javljaju *hiperalgezija* (prekomerna bolna reakcija na dejstvo blagih bolnih stimulusa), *alodinija* (bol izazvan nebolnim stimulusima, npr. dodirrom) i *spontani bol* (bol nastao bez prethodnog stimulusa). Neuropatski bol može biti **centralni** (bol nakon moždanog udara) i **periferni** (postherpetička neuralgija, bolna dijabetesna neuropatija) (Schaible, 2007; Tomić i Stepanović–Petrović, 2017). Ovaj tip bola je uvek hroničnog toka i ne ispunjava nikakvu fiziološku funkciju, jer traje duže i nakon što je tkivo zacelilo (Poliakov i sar., 2011).

### ***1.1.1. Postoperativni bol i terapijski pristup***

Postoperativni bol nakon incizije kože i potkožnih struktura (fascije i mišića) predstavlja jedinstvenu i uobičajenu formu akutnog somatskog bola, koja sadrži nociceptivnu, kao i inflamatornu komponentu koja se javlja usled dejstva hemijskih noksi koje se oslobađaju na mestu povrede (Spofford i Brennan, 2012). Usled incizije kože i potkožnih struktura, razvija se hiperalgezija (prekomerna bolna reakcija na blagi bolni stimulus). Ukoliko nakon incizije dođe do oštećenja nerava, vremenom se može razviti i neuropatska komponenta, te akutni može preći u hroničan postoperativni bol. Postincizioni bol se po etiologiji, a delom i patofiziološkom mehanizmu, razlikuje od drugih oblika inflamatornog bola, kao i od neuropatskog bola (Honore i sar., 2000; Hunt i Mantyh, 2001; Obata i sar., 2004).

Uobičajena terapija postoperativnog bola zasniva se na primeni opioida i NSAIL. Brojne studije ukazuju da ukoliko je postoperativna terapija bola adekvatna i blagovremena, u velikom procentu se redukuje morbiditet nakon operacija, poboljšava ishod operacije i smanjuju bolnički troškovi lečenja (Kehlet i Holte, 2001; Kehlet i Wilmore, 2002).

Adekvatna analgezija neposredno nakon hirurške intervencije smanjuje postoperativne kognitivne poremećaje (Vaurio i sar., 2006), poboljšava kvalitet života i smanjuje rizik od nastanka hroničnog/perzistentnog bola (Perkins i Kehlet, 2000; Kehlet i sar., 2006; Gottschalk i Raja, 2004). Nedavno sprovedene studije

ukazuju na to da se 50–70% pacijenata žali na umeren do intenzivan bol nakon operacije, što govori da postoperativna analgezija predstavlja veliki izazov za savremenu medicinu, i pored razvoja novih lekova i tehnika analgezije (Apfelbaum i sar., 2003; Pavlin i sar., 2002). Jedan od najbitnijih razloga je nedovoljno poznavanje mehanizama nastanka ove vrste bola.

S druge strane, primena konvencionalnih analgetika u postoperativnom toku nosi sa sobom određene neželjene reakcije. Naime, usled upotrebe opioidnih analgetika u lečenju postincizionog bola, neretko dolazi do pojave opstipacije, retencije urina i kognitivne disfunkcije. Pored opioida, nesteroidni anti-inflamatorni lekovi, kao što je ketorolak, najčešće se primenjuju za kratkoročno ublažavanje bola nakon operacije (Denson i Katz, 1992). S obzirom da NSAIL ispoljavaju i antiinflamatorni i analgetički efekat, korist od upotrebe ove grupe lekova je višestruka. Međutim, i ovi lekovi vrlo često mogu dovesti do neželjenih reakcija, pre svega na nivou gastrointestinalnog i kardiovaskularnog sistema. Zbog svega navedenog, javlja se potreba za razvojem novih lekova kako bi se optimizovala terapija bola.

U cilju ispitivanja mehanizama razvoja bolnih stanja, kao i novih analgetika, primenjuju se odgovarajući životinjski modeli bola. Za ispitivanje postincizionog bola, koji je predmet našeg istraživanja, koristi se istoimeni model bola nakon incizije šape pacova ili miša (Brennan i sar., 1997; Pogatzki i Raja, 2003).

## **2. Anatomska organizacija aferentnih puteva bola**

Informacija o bolu se prenosi duž struktura koje su sastavni deo perifernog i centralnog nervnog sistema. Oštećenje tkiva, kao najčešći uzročnik bola u različitim patološkim stanjima, dovodi do oslobađanja brojnih medijatora koji stimulišu nervne terminale i dovode do nastanka bolnog signala.

### **2.1. Procesi prenosa i obrade informacije o bolu**

Četiri glavna procesa su uključena u prenos i obradu nociceptivnih informacija: transdukcija, transmisija, modulacija i percepcija (Berry i sar., 2006; Marchand, 2010). **Transdukcija** obuhvata procese uključene u aktivaciju nociceptora i

generisanje akcionih potencijala (bolnih impulsa). **Transmisija** podrazumeva prenos bolnih impulsa do kičmene moždine, a potom do viših nervnih centara. **Modulacija** bola je neuralna aktivnost koja kontroliše proces transmisije bolnih impulsa. **Percepcija** bola je proces integracije prispelih bolnih impulsa u kortikalnim strukturama odgovornim za senzornu i afektivnu komponentu obrade bola (Marchand, 2010).

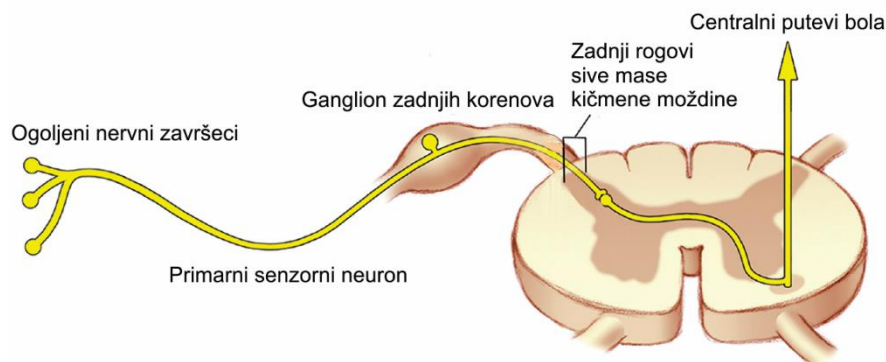
### **2.1.1. Transdukcija**

Transdukcija informacije o bolu otpočinje stimulacijom nociceptora, koji predstavljaju ogoljene periferne nervne završetke primarnih aferentnih senzornih neurona (Wall i Melzack, 2013). Glavna uloga nociceptora je detekcija bolnog stimulusa (nokse) koji potencijalno može dovesti do oštećenja tkiva. Pod štetnim uticajem nokse dolazi do stimulacije nociceptora, usled čega se generiše akcioni potencijal. Akcioni potencijal je direktan proizvod energije bolnog stimulusa, koja može biti mehanička, termička i hemijska (Rang i sar., 2014).

Nociceptori na svojoj površini ekspimiraju receptore za različite ligande, kao i brojne jonske kanale. Prilikom oštećenja tkiva, usled inflamacije i ishemičnih procesa, oslobađaju se medijatori koji mogu direktno, ali i indirektno da stimulišu nociceptore, što može dovesti do generisanja akcionog potencijala. Među ovim medijatorima pored vodonikovih ( $H^+$ ) jona mogu se naći i medijatori koje oslobađaju ćelije imunskog odgovora kao i mastociti, polimorfonuklearne ćelije i trombociti, i to su: ATP (adenozin trifosfat), arahidonska kiselina, serotonin, histamin, bradikinin, prostaglandini, interleukini i TNF (*tumor necrosis factor*) (Marchand 2010; Ossipov, 2012). Stimulacija nociceptora ovom takozvanom "inflamatornom supom" dovodi do njihove *periferne senzitivacije*, usled čega se snižava prag za okidanje akcionog potencijala. Takođe, periferni nociceptori oslobađaju sa svojih perifernih terminala i peptide poput supstance P i CGRP (*calcitonin-gene-related peptide*) (Basbaum i Jessel, 2000), kao i glutamat (Carlton i sar., 1995), čime se dodatno pospešuje inflamacija, vazodilatacija i ekstravazacija. Konačno, ovi procesi dovode do oslobađanja faktora koji privlače ćelije inflamacije

(npr. makrofage), usled čega dolazi do razvoja fenomena *neurogene inflamacije* (Schaible, 2007; Marchand, 2010).

Primarni aferentni senzorni neuroni, čija se tela nalaze u spinalnim ganglijama su pseudounipolarni: njihova dugačka aksonalna vlakna inervišu periferiju, dok kraća vlakna ostvaruju primarnu sinapsu u centralnom nervnom sistemu, na nivou zadnjih rogova sive mase kičmene moždine, sa sekundarnim neuronima bolnog puta. Ova sinapsa se ostvaruje na nivou lamina I, II (tzv. *substantia gelatinosa*) i V zadnjih rogova sive mase kičmene moždine (Slika 1).



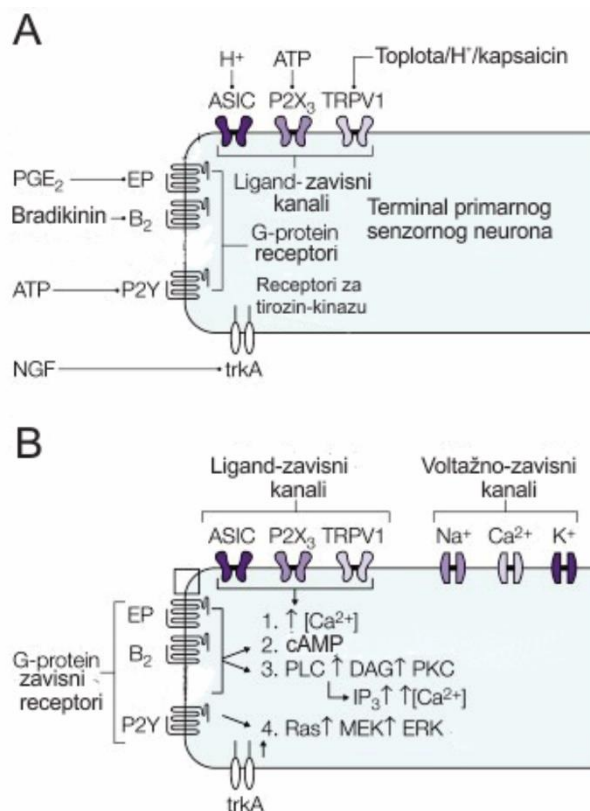
**Slika 1.** Anatomaska organizacija ushodnih puteva bola. Ogoljeni nervni završeci primarnih senzornih neurona u perifernim tkivima primaju senzornu informaciju koja se šalje duž aksona pseudounipolarnog neurona čije se telo nalazi u spinalnoj gangliji. Kraći akson ovog pseudounipolarnog neurona gradi primarnu centralnu sinapsu sa projekcionim neuronom (Preuzeto i prilagođeno prema referenci Gorlin i sar., 2016).

### 2.1.1.1. Uticaj inflamacije na transdukciju

Kao što je već istaknuto, inflamatorni medijatori direktno ili indirektno utiču na aktivaciju nociceptora (Slika 2A). *Direktni* efekat se ispoljava vezivanjem medijatora za ligand-zavisne jonske kanale. Na taj način,  $H^+$  joni aktiviraju ASIC (*acid sensing ionic channels*), ATP aktivira  $P_2X$  (purinoreceptor), a noksična toplota,  $H^+$  joni i kapsaicin (pronociceptivna supstanca) aktiviraju TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid receptor 1*) kanale. Usled aktivacije ovih receptora, dolazi do otvaranja jonskih kanala i ulaska natrijuma u ćeliju, ali i drugih monovalentnih i divalentnih katjona kao što je kalcijum (Slika 2B).

Za razliku od direktne, *indirektna* aktivacija postiže se vezivanjem medijatora, kao što su bradikinin, serotonin, prostaglandini i hemokini, za G-protein zavisne receptore. Aktivacija ovih receptora dovodi do odgovarajućeg biohemijskog

odgovora ćelije, koji zavisi od tipa aktiviranog G proteina. Aktivacija  $G_s$  dovodi do stimulacije aktivnosti adenilat ciklaze, usled čega se povećava intracelularna koncentracija cikličnog adenzin monofosfata (cAMP) i aktivira se protein kinaza A (PKA). S druge strane, aktivacija  $G_i$  inhibira aktivnost adenilat ciklaze i dovodi do smanjenja intracelularne koncentracije cAMP (Slika 2B). Pored toga što cAMP ispoljava svoje efekte putem aktivacije PKA, takođe može aktivirati i  $\epsilon$  izoformu protein kinaze C (PKC). Aktivacija protein kinaza dovodi do fosforilacije membranskih proteina što posledično utiče na njihovu funkciju. Konačno, stimulacija  $G_{q/11}$  aktivira fosfolipazu C (PLC), usled čega dolazi do hidrolize prekursora membranskog lipida fosfatidilinozitol 4,5-bifosfata ( $PIP_2$ ), te stvaranja sekundarnih glasnika inozitol-3-fosfata ( $IP_3$ ) i diacil-glicerola (DAG) (Slika 2B).



**Slika 2.** Periferna senzitivizacija nociceptivnih neurona. **(A)** Prikazani različiti stimuli (kao i njihovi receptori) koji dovode do aktivacije i senzitivizacije perifernih terminala nociceptivnih neurona. **(B)** Glavni mehanizmi direktne i indirektno aktivacije nociceptora. ASIC: acid sensing ionic channel; P2X<sub>3</sub>: purinoreceptor; NGF, nerve growth factor; PGE<sub>2</sub> – prostaglandin E<sub>2</sub>; TRPV1 kanal: transient receptor potential vanilloid 1. (Preuzeto i adaptirano iz Wall i Melzack, 2013).

Indirektna aktivacija nociceptora se takođe ostvaruje putem aktivacije citokinskih receptora sa tirozin-kinaznom aktivnošću (Slika 2B). Ovi receptori se aktiviraju pod uticajem interleukina-1 (IL-1), TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) i neurotrofičkih faktora, kao što su faktor rasta nerava NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic*



*factor*) i artemin. Aktivacija ovih receptora dovodi do aktivacije kinaza koje utiču na transkripciju gena, ali mogu i akutno uticati na funkciju neurona.

Svi ovi procesi direktnog ili indirektnog uticaja medijatora inflamacije dovode do senzitivacije senzornih nerava, usled čega se povećava verovatnoća da će doći do aktivacije voltažno ili ligand zavisnih jonskih kanala, poput kanala za natrijum, kalcijum i kalijum, te do ulaska i povećanja unutarćelijskog pozitivnog naelektrisanja, neophodnog za generisanje akcionog potencijala i ćelijsku ekscitabilnost (Schulz i sar., 2008; Dubin i Patapoutian, 2010). Olakšano generisanje akcionog potencijala i povećanje ekscitabilnosti senzornih neurona pospešuju prenos informacije o bolu (Slika 2B).

### **2.1.2. Transmisija**

U transmisiji, kao i u transdukciji, učestvuju aksonalni nastavci primarnih senzornih neurona, čija su tela smeštena u dorzalnim spinalnim ganglijama ili u trigeminalnoj gangliji, dok se njihovi centralni terminali završavaju u superficijalnim slojevima zadnjih rogova sive mase kičmene moždine (lamine I, II i V). U slučaju primarnih senzornih neurona trigeminusa, primarni terminali se završavaju u moždanom stablu (Basbaum i sar., 2009).

Uloga tela senzornog neurona u prenosu senzornih informacija još uvek nije jasno definisana (Devor, 1999). Vlakna primarnih aferentnih senzornih neurona, kojima se prenose informacije o bolu, svrabu, proprioceptiji i dodiru, klasifikovana su na osnovu sledećih karakteristika (Perl, 2007):

- brzina prenosa senzornih informacija
- debljina vlakna
- mijelinizacija.

A $\alpha$  i A $\beta$  vlakna su mijelinizovana, prenose informacije velikom brzinom (70–130 m/s), najveće su debljine (5–20  $\mu$ m) i imaju najveća tela neurona (> 40  $\mu$ m). Oba tipa ovih vlakana su zadužena za proprioceptiju i dodir. A $\beta$  vlakna zadužena su za prenos taktilnih informacija, ali mogu prenositi i nociceptivne signale (Djouhri i sar., 2004; Fang i sar., 2005).

Primarna senzorna aferentna vlakna koja učestvuju u transdukciji i transmisiji nociceptivnih signala su *A $\delta$  i C vlakna*. A $\delta$  vlakna prenose informacije nešto sporije (12–30 m/s), s obzirom da su manjeg dijametra (2–5  $\mu$ m), manjih tela neurona (30–40  $\mu$ m) i manje mijelizovana od A $\alpha$  i A $\beta$  vlakana. Ova vlakna zadužena su za prenos akutnog, jasno–lokalizovanog prvobitnog bola. Postoje dve grupe A $\delta$  vlakana:

- vlakna osetljiva na intenzivne, štetne mehaničke i, izuzetno, termičke stimuluse
- vlakna osetljiva na sva tri tipa noksi.

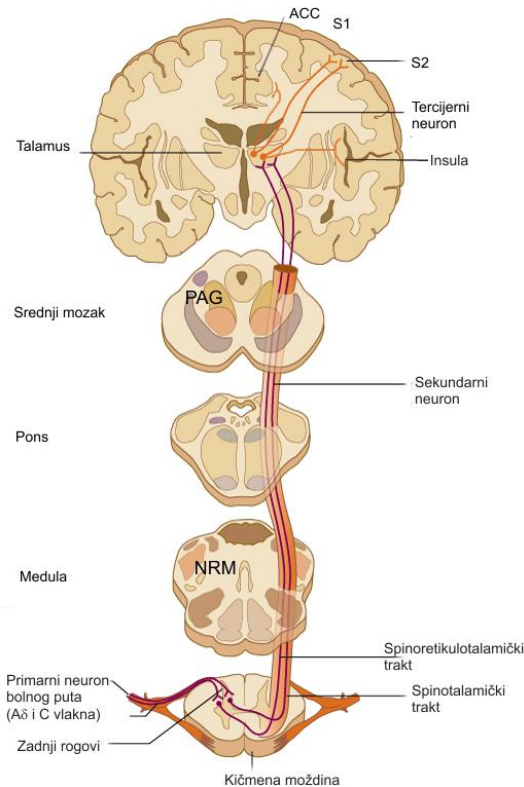
C–vlakna najsporije prenose informacije (0,5–2 m/s), aksoni su tanki (0,4–1,2  $\mu$ m) i nemijelizovani, a tela neurona su manja od 30  $\mu$ m. S obzirom da nisu mijelinizovana, C–vlakna su zadužena za prenos sekundarnog sporog bola koji nije jasno lokalizovan. Glavna uloga ovih vlakana je u detekciji bola, svraba kao i dodira (Julius i Basbaum., 2001; Zotterman Y, 1939).

Nociceptivni neuroni predstavljaju izuzetno heterogenu grupu neurona u morfološkom, anatomskom i funkcionalnom smislu. Elektrofiziološke studije su pokazale da postoje dva tipa nociceptivnih neurona sa A $\delta$  vlaknima, koji se razlikuju u osetljivosti na termički stimulus (Lallemend i Ernfors, 2012; Marmigere i Ernfors, 2007). C–nociceptori su specifični zbog svoje polimodalnosti, tj. osetljivosti na hemijski, kao i na mehanički i termički stimulus (Perl, 2007). Od posebnog značaja je grupa C–nociceptora koji su osetljivi na termički, ali ne i na mehanički stimulus u fiziološkim uslovima. Međutim, u prisustvu povrede, oni postaju osetljivi i na mehanički stimulus (Schmidt i sar., 1995). Konačno, Snider i McMahon (1998) pokazali su da se C–polimodalni nociceptori dele na peptidergičke (proizvode neuropeptide supstancu P i CGRP) i ne–peptidergičke. Ne–peptidergička populacija C nociceptora je poznata po tome da vezuje IB4 izolektin (IB4 pozitivni neuroni). Nociceptori se takođe mogu razlikovati po ekspresiji različitih jonskih kanala koji učestvuju u transdukciji, kao što su kanali osetljivi na toplotu (TRPV1), hladnoću (TRPM8), na promenu pH (ASIC) ili na hemijske nokse (TRPA1) (Julius i Basbaum, 2001).

Akcioni potencijal generisan u primarnim senzornim neuronima (pre svega A $\delta$  i C–tipa) pod uticajem noksi, dovodi do oslobađanja glutamata i neuropeptida

(supstanca P, CGRP, neurokinin, vazoaktivni intestinalni peptid), kao i brojnih drugih nepeptidnih modulatora (aspartat, ATP, NO) iz presinaptičkih terminala koji omogućavaju sinaptičku transmisiju informacije o bolu na neurone u laminama I, II i V (Millan, 2002).

Lamine I i II, koje dobijaju nociceptivne informacije pre svega od A $\delta$  i C-vlakana primarnih aferentnih neurona, sadrže izuzetno heterogenu populaciju neurona koji se značajno razlikuju morfološki i funkcionalno. Od najvećeg značaja je prisustvo inhibitornih i ekscitatornih interneurona koji ostvaruju sinapse sa primarnim i sekundarnim neuronima bolnog puta. Na ovaj način, interneuroni mogu uticati inhibitorno, ali i facilitujuće na sinaptičku transmisiju, modulišući tako prenos nociceptivnih signala. Sekundarni (projekcioni) neuroni bolnog puta se dalje projektuju kontralateralno putem spinotalamičkog i spinoretikulotalamičkog trakta do viših nervnih centara (Slika 3). Dva glavna ascendentna puta za prenos informacije o bolu u više nervne centre su spinotalamički i spinoretikulotalamički trakt. Neuroni spinotalamičkog puta projektuju se do lateralnih, dok se neuroni spinoretikulotalamičkog puta projektuju do medijalnih jedara talamusa, kao i do jedara srednjeg mozga (periakveduktalna siva masa-PAG i *nucleus raphe magnus*-NRM) (Schaible, 2007; Marchand, 2010). Iz talamičkih jedara, sa tercijarnog neurona bolnog puta informacija o bolu se dalje projektuje u kortikalne strukture (somatosenzorni korteks S1 i S2, ACC-*anterior cingulate cortex* i insula) (Slika 3).



**Slika 3.** Centralno procesuiranje informacije o bolu. Po ulasku u kičmenu moždinu, bolni impulsi se sa primarnog (A $\delta$  i C-vlakna) prenose na sekundarni neuron bolnog puta u zadnjim rogovima kičmene moždine. Sekundarni senzorni neuroni ulaze u sastav dva glavna ushodna puta, spinotalamički i spinoretikulotalamički, kojim se bolni signali prenose u više nervne centre. U talamusu se informacija sa sekundarnog prenosi na tercijarni neuron bolnog puta, koji daje projekcije u somatosenzorni korteks (S1 i S2) i limbičke strukture (ACC, anterior cingulate cortex i insulu). PAG – periakveduktalna siva masa; NRM – nucleus raphe magnus (Preuzeto i prilagođeno iz reference Prentice i sar., 2011).

### 2.1.2.1. Uticaj inflamacije na transmisiju

Kao što je već prethodno pomenuto, oslobođeni medijatori zapaljenja snižavaju prag okidanja nociceptora i dovode do njihove periferne senzitivacije. Kao posledica toga, na spinalnom nivou odigravaju se promene koje dovode do facilitacije prenosa signala o bolu: 1) povećava se oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera (glutamata, supstance P, neurokinina A i CGRP) sa centralnih terminala primarnog senzornog neurona; 2) povećava se oslobađanje prostaglandina i citokina iz neurona i glija ćelija; 3) dolazi do ushodne regulacije određenih podjedinica receptora za glutamat (NR1 i GluR1) i povećane osetljivosti sekundarnog neurona bolnog puta, što doprinosi nastanku *centralne senzitivacije* (Saegusa i sar., 2001; Schaible, 2007; Takeda i sar., 2011).

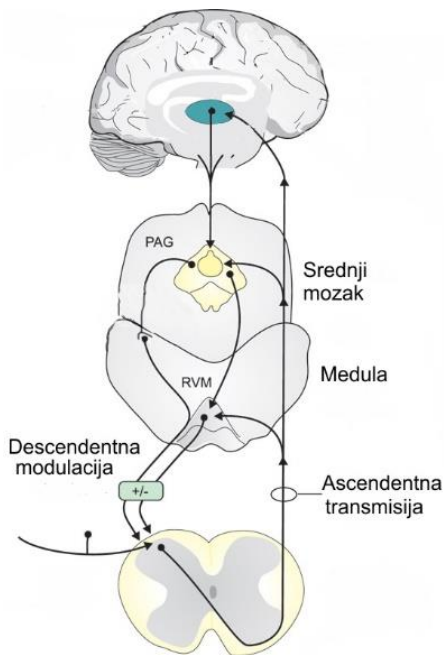
### 2.1.3. Modulacija bola

Modulacija bola se odvija na perifernom, spinalnom i supraspinalnom nivou. Rezultat modulacije je facilitacija (olakšavanje prenosa impulsa, pojačavanje) ili inhibicija bolnih impulsa (Schaible, 2007; Marchand, 2010).

Modulatorni uticaji pronociceptivnih supstanci, koje se oslobađaju na **periferiji**, obično olakšavaju prenos informacije o bolu. Ove supstance dovode do sniženja praga osetljivosti nociceptora, što posledično dovodi do povećanja njihove senzitivacije na različite bolne stimulse, širenja receptivnog polja i gubitka centralne inhibicije na mestu povrede, odnosno do razvoja primarne hiperalgezije (Millan, 2002; Marchand, 2010).

**Spinalni** deo puteva bola smatra se najznačajnijim u modulaciji prenosa informacije o bolu. Prema „teoriji kapije” u **spinalnom** delu zadnjih rogova kičmene moždine koji se naziva *substantia gelatinosa* (SG) susreću se ushodni (ascendentni) uticaji sa periferije i nishodni (descendentni) uticaji viših nervnih centara. Ascendentni uticaji facilituju, dok descendentni uglavnom inhibiraju prenos bolnih impulsa. Usled toga, konačan uticaj može biti facilitacija ili inhibicija, što zavisi od toga koja komponenta prevlada (Millan, 2002; Marchand, 2010). Takođe i lokalni interneuroni, koji ostvaruju inhibitorne ali i ekscitatorne sinapse i sa primarnim i sa sekundarnim neuronom bolnog puta, dovode do modulacije prenosa bolnog signala na **spinalnom nivou**. Većina inhibitornih interneurona ima GABA–ergičku i/ili glicinergičku aktivnost i njihova glavna uloga je sprečavanje nekontrolisanog širenja ekscitacije (Millan, 1999; Schaible, 2007; Pan i sar., 2008).

Iz **supraspinalnih** centara polaze descendentni putevi koji modulišu transmisiju bolnih impulsa na spinalnom nivou (Slika 4) (Marchand, 2010). Njihov modulatorni efekat je inhibitorni. Najznačajniji modulatorni uticaji potiču iz centara moždanog stabla: periakveduktalne sive mase (PAG) i jedara rostroventralne medule (RVM): *nucleus raphe magnus* (NRM), *nucleus reticularis gigantocellularis pars alpha* i *nucleus reticularis paragigantocellularis lateralis*. Jedra PAG predstavljaju glavne releje preko kojih viši nervni centri (hipotalamus, talamus, limbičke strukture i korteks) kontrolišu nociceptivnu “kapiju” u zadnjim rogovima kičmene moždine. PAG daje nishodne projekcije do jedara RVM, a manjim delom direktno do spinalnih neurona (Millan, 2002; Schaible, 2007). RVM se dalje projektuje do kičmene moždine, ostvarujući sinapsu sa inhibitornim interneuronima u SG ili sekundarnim neuronima bolnog puta. Serotonin, enkefalin i noradrenalin su glavni neurotransmiteri na ovim sinapsama, i oni ostvaruju inhibitorni uticaj na bolnu transmisiju (Schaible, 2007; Ossipov, 2012).



**Slika 4.** Sistem za modulaciju bolnih impulsa. Prikaz modulacije bola na spinalnom nivou, kao i prikaz modulatornih uticaja iz centara u srednjem mozgu, kao i iz viših moždanih struktura (Preuzeto i prilagođeno iz reference Brodin i sar., 2016).

Još jedan važan descendentni inhibitorni put potiče iz *locus coeruleus*-a (LC), jedra ponsa moždanog stabla. Descendentne projekcije iz ove strukture ostvaruju noradrenergičke inhibitorne sinapse na nivou kičmene moždine (Rang i sar., 2014).

Uzevši sve u obzir, zadnji rogovi sive mase kičmene moždine predstavljaju integralnu komponentu puteva bola jer se na ovom nivou vrši integracija informacije dobijene od perifernih nociceptora, lokalnih interneurona i descendentnih modulatornih projekcija.

### 3. Uloga kalcijumovih kanala u bolu

Kalcijumovi kanali spadaju u jonske kanale izgrađene od transmembranskih proteina koji formiraju poru za prolazak jona. Ovi kanali se klasifikuju u dve velike grupe: ligand-zavisni i voltažno-zavisni kalcijumovi kanali (Zamponi i sar., 2016). Aktivnost ligand-zavisnih kalcijumovih kanala, koji se mogu naći i intra i ekstracelularno, moduliše se vezivanjem liganada. Za razliku od njih, voltažno-zavisni kalcijumovi kanali nalaze se pre svega na ćelijskoj membrani i otvaraju se i zatvaraju prilikom promena u potencijalu (voltaži) ćelijske membrane.

Voltažno-zavisni kalcijumovi kanali nalaze se na ćelijskim membranama svih ekscitabilnih ćelija, uključujući nervne i mišićne ćelije (Snutch i Catterall, 1993;

Catterall, 2000). Čelije koje ispoljavaju izrazitu ekscitabilnost, poput senzornih neurona, obično poseduju nekoliko različitih tipova kalcijumovih kanala (Catterall, 2000; Catterall i sar., 2005; Yunker i McEnery, 2003). Njihova primarna funkcija je da obezbede ulazak kalcijuma u ćeliju, koji igra ulogu sekundarnog glasnika u brojnim procesima unutar ćelije. Takođe, ulazak kalcijumovih jona u ćeliju često dovodi do depolarizacije ćelijske membrane, povećavajući tako verovatnoću generisanja akcionog potencijala.

Kalcijumove kanale je moguće razlikovati na osnovu njihovih biofizičkih i farmakoloških karakteristika. Glavna biofizička karakteristika na osnovu koje je moguće razlikovati ove kanale je količina depolarizacije potrebne da bi se kanali otvorili (Bean, 1989, 1991; Nowycky i sar., 1985). Kalcijumovi kanali za koje je potrebna mala količina depolarizacije pripadaju grupi kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri nižim potencijalima (tzv. *low voltage-activated*). Kalcijumovi kanali koji zahtevaju veću depolarizaciju kako bi se aktivirali spadaju u grupu kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri višim potencijalima (tzv. *high voltage-activated*).

### 3.1. Genetička klasifikacija kalcijumovih kanala

Osnovna i zajednička komponenta svih kalcijumovih kanala je  $\alpha_1$ -podjedinica, koja formira poru kroz koju prolaze kalcijumovi joni i za koju postoji više od deset gena (Bourinet i sar., 1999; Perez-Reyes, 2003).  $Cav\alpha_1$  podjedinica (CACNA – *Calcium Voltage-Dependent Channel Subunit*), veličine 250 kDa, sastoji se od 4 transmembranska domena povezana citoplazmatskim regionima, čiji NH<sub>2</sub> i COOH terminusi su takođe citoplazmatski. Svaki membranski domen sadrži šest membranskih heliksa (S1 do S6) koji uključuju region sa senzorom za promenu potencijala, kao i P-petlju koja formira poru i kontroliše propustljivost za pojedine tipove jona (Slika 5A).

Evolutivno, svi kalcijumovi kanali potiču od istog primordijalnog gena za kalcijumove kanale (Perez-Reyes, 2003). U osnovi strukture kalcijumovih kanala je  $Cav\alpha_1$  podjedinica koja formira poru za prolazak kalcijumovih jona (Slika 5B). Postoje dva gena za  $Cav\alpha$  podjedinicu za kalcijumove kanale koji se aktiviraju pri višim potencijalima: **Cav1** i **Cav2**. Pored  $Cav$  podjedinice, ovi kalcijumovi kanali mogu

---

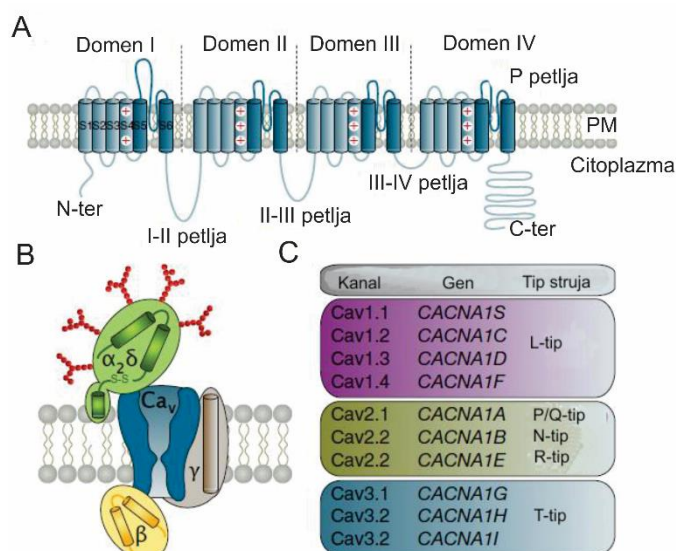
sadržati i pomoćne podjedinice, kao što su  $\alpha_2\delta$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , usled čega su ovi kanali predstavljeni kao heteromultimerni proteinski kompleksi koji se formiraju povezivanjem Cav $\alpha$ 1, Cav $\beta$  i Cav $\alpha$ 2 $\delta$  podjedinica u stehiometrijskom odnosu 1:1:1 (Catterall i sar., 2005) (Slika 5B). U zavisnosti od sastava podjedinica koje sačinjavaju kanal, kalcijumovi kanali koji se aktiviraju pri višim potencijalima dele se na L, N, P/Q i R tip (Slika 5C).

Kao što je već pomenuto, Cav $\alpha$ 1 familija voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri višim voltažama deli se na dve velike podfamilije. Cav1 familija sadrži četiri gena (Cav1.1–Cav1.4), koji kodiraju četiri različita kanala L tipa. Cav2 familija uključuje Cav2.1 gen za P/Q tipove, Cav2.2 za N-tip i Cav2.3 za R-tip kalcijumovih kanala. Cav $\beta$  podjedinicu kodira četiri gena kod kičmenjaka. Cav $\beta$  podjedinica spada u citoplazmatske proteine koji se vezuju za Cav $\alpha$ 1 na nivou domena I–II, i promovišu membransku ekspresiju kanala tako što sprečavaju ubikvitinaciju i zadržavanje na nivou endoplazmatskog retikuluma (Weiss i Zamponi, 2017). Klasifikacija svih tipova voltažno-zavisnih kanala za kalcijum prikazana je na Slici 5C.

Takođe postoje i četiri različita tipa  $\alpha$ 2 $\delta$  podjedinice. Slično kao i Cav $\beta$ , i Cav $\alpha$ 2 $\delta$  podjedinica promoviše membransku ekspresiju Cav $\alpha$ 1 podjedinice. Pored toga što regulišu ekspresiju i internalizaciju, ova pomoćna podjedinica takođe može menjati funkcionalne i farmakološke karakteristike kalcijumovih kanala, kao i osetljivost za sekundarne glasnike (Dolphin, 2013; Geisler i sar., 2014).

Kalcijumovi kanali koji se aktiviraju pri nižim potencijalima (T-tip) javljaju se samo u obliku podgrupe **Cav3** (Slika 5C). Genetski kod sisara sadrži gene za tri različite  $\alpha$ 1 podjedinice T tipa kalcijumovih kanala: Cav3.1 (CACNA1G), Cav3.2 (CACNA1H) i Cav3.3 (CACNA1I) (Slika 5C). U strukturi sva tri podtipa nalazi se samo ova podjedinica.





**Slika 5.** Struktura kalcijumovih kanala. **(A)** osnovna struktura  $Ca_v$  ( $\alpha_1$ ) podjedinice. **(B)** Opšta struktura podjedinica koje mogu sačinjavati kalcijumove kanale. **(C)** klasifikacija tipa kalcijumovih kanala, gen koji kodira svaki kanal pojedinačno i tip kalcijumovih struja (Preuzeto i prilagođeno iz reference Weiss i Zamponi, 2017).

### 3.2. Distribucija kalcijumovih kanala duž puteva bola

Distribucija različitih izoformi kalcijumovih kanala zavisi od tipa tkiva. **N-tip** kalcijumovih kanala je eksprimiran na neuronima zadnjih rogova sive mase kičmene moždine, zatim na telima neurona spinalnih gangliona, kao i na centralnim terminalima primarne sinapse u zadnjim rogovima sive mase kičmene moždine (Westenbroek i sar., 1992; Catterall i Few, 2008; Gohil i sar., 1994). Ovaj tip kanala dobio je ime usled toga što ne pripada grupi ni L- ni T-tipa kalcijumovih kanala. Kako blokatori ovih kanala inhibiraju oslobađanje supstance P i CGRP, jasno je da N-tip kalcijumovih kanala reguliše sinaptičku transmisiju C- i  $A\delta$ - nociceptora (Santicioli i sar., 1992; Maggi i sar., 1990; McGivern i sar., 2004; Evans i sar., 1996). Ovaj tip kalcijumovih kanala se može naći i na dendritskim nastavcima odakle učestvuje u regulaciji ulaska kalcijumovih jona (Kisilevsky i sar., 2008).

**P/Q tip** kalcijumovih kanala nalazi se takođe na presinaptičkim terminalima u zadnjim rogovima sive mase kičmene moždine i učestvuje u oslobađanju neurotransmitera (Catterall i Few, 2008; Westenbroek i sar., 1995, 1998; Wheeler i sar., 1994). Ovaj tip kalcijumovih kanala dobio je ime po Purkinjeovim neuronima, gde je prvi put i otkriveno njihovo prisustvo. Tačna uloga P/Q kanala u transmisiji bolnih signala nije poznata, međutim pokazano je da mutacija na ovim kanalima dovodi do nasledne hemiplegijske migrene (de Vries i sar., 2009). Takođe, dosadašnje istraživanje je pokazalo da P/Q-tip kalcijumovih kanala učestvuje u

oslobađanju ekscitatornih i inhibitornih neurotransmitera u zadnjim rogovima sive mase kičmene moždine (Araque i sar., 1994; Takahashi i Momyiama, 1993), ali da ne utiče na oslobađanje supstance P i CGRP (Westenbroek i sar., 1998).

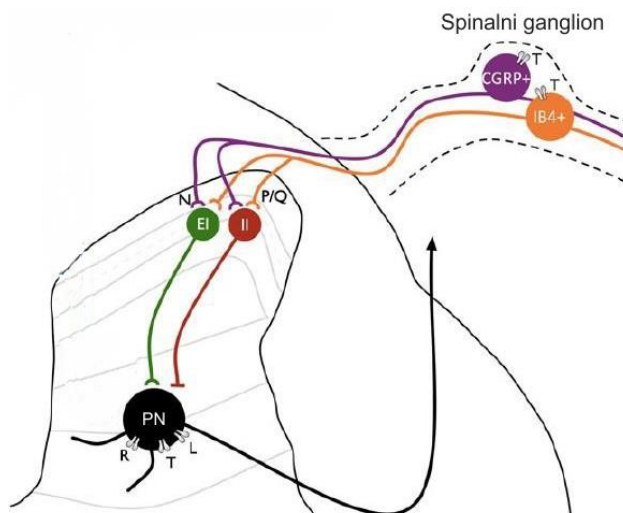
**L-tip** kalcijumovih kanala nalazi se u centralnom nervnom sistemu, srčanom mišiću, glatkim i skeletnim mišićima, kao i u retini, sinoatrijalnom čvoru i kohlearnim ćelijama (Dolphin, 2009; Calin-Jageman i Lee, 2008). U superficijalnom sloju zadnjih rogova sive mase kičmene moždine, L tip kalcijumovih kanala zastupljen je na telima i dendritima neurona, odakle učestvuje u regulaciji aktivnosti kalcijum-zavisnih enzima, transkripciji gena, sinaptičkoj aktivnosti i plastičnosti, kao i u aktivaciji drugih jonskih kanala, kao što su kalcijum-zavisni kalijumovi kanali (Westenbroek i sar., 1998; Dolmetsch i sar., 2001; Kim i sar., 2001; Hell i sar., 2008).

Poput drugih kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri višim potencijalima i **R-tip** (*R-resistant*, usled njihove neosetljivosti na antagoniste za L, N i P/Q kalcijumove kanale) reguliše oslobađanje neurotransmitera i ekscitabilnost neurona (Dietrich i sar., 2003; Brown i sar., 2004). Saegusa i sar. (2000) su pokazali da globalno brisanje gena za Cav2.3 kanal (R-tip) u miševa može dovesti do antinociceptivnog, ali i pronociceptivnog ponašanja, u zavisnosti od promena na spinalnom i supraspinalnom nivou duž bolnih puteva.

Od posebnog značaja za naše istraživanje su **kalcijumovi kanali T-tipa (T-kanali)**, koji su zastupljeni u svim delovima nervnog sistema (Trimmer i Rhodes, 2004). Za razliku od voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri višim potencijalima ćelijske membrane, ovi kanali se generalno aktiviraju pri potencijalima ćelijske membrane negativnijim od -40 mV. Štaviše, T-kanali se inaktiviraju relativno brzo nakon otvaranja, te su stoga idealni za regulisanje ćelijske ekscitabilnosti kroz modulaciju aktivnosti kanala za natrijum i kalcijum, i obezbeđivanje tzv. pejsmejkerske aktivnosti u sinoatrijalnom čvoru srca (Bourinet i Zamponi, 2005a; Bourinet i sar., 2014). Dodatno, T-kanali učestvuju u sekreciji neuroendokrinih ćelija (Okayama i sar., 2006; Gackière i sar., 2008), kao i sinaptičkom oslobađanju neurotransmitera iz vezikula (Weiss i sar., 2012).

Studije *in situ* hibridizacije pokazale su da je podtip **Cav3.2** T-kanala najzastupljeniji na telima perifernih senzornih neurona i u zadnjim rogovima sive

mase kičmene moždine (Talley i sar., 1999), što ukazuje na njihov veliki značaj u transmisiji bolnih stimulusa. Cav3.2 kanali su eksprimirani na CGRP–pozitivnim (peptidergičkim) i IB4–pozitivnim (nepeptidergičkim) neuronima spinalnih ganglija, kao i na perifernim terminalima ovih nervnih vlakana u koži (Rose i sar., 2013). Slika 6 prikazuje distribuciju kalcijumovih kanala u kičmenoj moždini.



**Slika 6.** Ekspresija voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala u zadnjim rogovima sive mase kičmene moždine. Cav2.1 (P/Q-tip) i Cav2.2 (N-tip) kanali su uglavnom eksprimirani u specifičnim populacijama primarnih aferentnih neurona. N-tip se može naći u peptidergičkim (CGRP–pozitivni). T-kalcijumovi kanali su zastupljeni na oba tipa primarnih aferentnih neurona koji grade sinapse sa inhibitornim i ekscitatornim interneuronima, kao i sa projekcionim senzornim neuronima (PN). Postsinaptički, R-, L- i T-tip pre svega regulišu ekscitabilnost neurona (Preuzeto i prilagođeno iz reference Patel i sar., 2017).

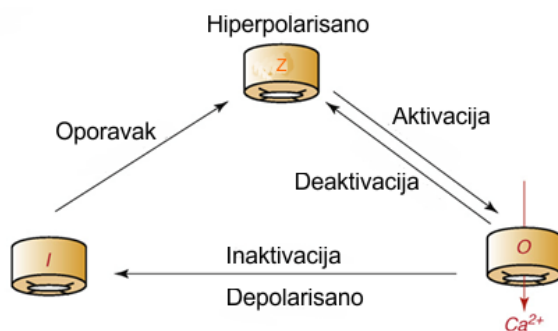
### 3.3. Uloga T-kanala u bolu

#### 3.3.1. Biofizičke karakteristike T-kanala

Kalcijumovi kanali T-tipa imaju krucijalan značaj u ekscitabilnosti različitih ćelija utičući na okidanje, kao i na frekvencu akcionih potencijala (Cain i Snutch, 2010). Specifična osetljivost ovih kanala na promenu potencijala ćelijske membrane obezbeđuje im važnu ulogu u regulisanju ćelijske ekscitabilnosti i oscilacija koje se odigravaju na potencijalima bliskim membranskom potencijalu mirovanja. Fiziološka uloga T-kalcijumovih kanala se jasno ogleda u regulisanju načina okidanja akcionih potencijala u stanju sna (Molineux i sar., 2006; Lee i sar., 2004; Destexhe i sar., 1994; Steriade, 2005), dok je patološka uloga opisana u stanjima kao što je epilepsija (Khosravani i Zamponi, 2006). T-kalcijumovi kanali dovode do pojave hipersinhronih talamokortikalnih oscilacija koje su u osnovi apsans napada (Tsakiridou i sar., 1995), kao i repetitivnog visoko–frekventnog okidanja akcionih

potencijala piramidalnih neurona temporalnog lobusa u *status epilepticus*-u (Su i sar., 2002). Poznato je da su T-struje povećane u tzv. kindling modelu epilepsije (Faas i sar., 1996). Kindling je pojava u kojoj malo fokalno električno pražnjenje dovodi do pojave epileptičnog napada, pri čemu je svaki sledeći napad intenzivniji od prethodnog (Bertram, 2007). Interesantno je da je pojava kindlinga vrlo slična pojavi *wind up* fenomena na nivou kičmene moždine u neuropatskom bolu (Herrero i sar., 2000), te bi se moglo očekivati da T-kalcijumovi kanali imaju značajnu ulogu i u bolnoj transmisiji.

T-kalcijumovi kanali prolaze kroz tri biofizička stanja u zavisnosti od potencijala ćelijske membrane: aktivisano, inaktivisano i deinaktivisano (Iftinca, 2011) (Slika 7). U stanju aktivacije, kanal je otvoren, što omogućava prolazak kalcijumovih jona u ćeliju. Pri potencijalu mirovanja (-60 do -70 mV) T-kanali se nalaze u inaktivisanom stanju, usled čega nisu propusni za prolazak kalcijumovih jona. Jedna od glavnih karakteristika ovih kanala je da usled blage hiperpolarizacije ćelijske membrane (npr. -80 mV) ovi kanali prelaze prvo u deinaktivisano stanje, odakle mogu ponovo preći u stanje aktivacije. S obzirom da su ovako nastale kalcijumove struje prolaznog karaktera, jer se kanal vrlo brzo inaktivira, ovi kanali su dobili ime „prolazni” (eng. *Transient*).



**Slika 7.** Stanja kroz koja prolazi T-kalcijumov kanal pri promenama potencijala ćelijske membrane. Z – kanal je zatvoren, O – kanal je otvoren, I – kanal je inaktivisan. (Preuzeto i prilagođeno iz Iftinca i Zamponi, 2009).

Kada se ćelijska membrana kratko hiperpolarizuje, a zatim vrati na potencijal mirovanja, dolazi do pojave tzv. LTCS (eng. *low threshold calcium spiking*) struja karakterističnih upravo za ove kanale (Perez-Reyes, 2003). Kao posledica nastanka LTCS, dolazi do ulaska kalcijuma u ćeliju, koji dalje dovodi do ćelijske depolarizacije i pokretanja različitih unutarćelijskih procesa u kojima kalcijum učestvuje kao sekundarni glasnik. Amplituda ovih struja je oko 25 mV, što je dovoljno da depolariše ćelijsku membranu do blizu -40 mV. Poznato je da su natrijumovi kanali aktivni pri potencijalu oko -40 mV, kao i kalcijumovi kanali koji se aktiviraju pri

višim potencijalima ćelijske membrane, usled čega dolazi do generisanja akcionog potencijala.

### **3.3.2. Uloga T-kanala u modulaciji bola**

S obzirom da T-kanali značajno doprinose generisanju akcionih potencijala, jasno je da imaju važnu ulogu u prenosu informacija o bolu. Prve elektrofiziološke karakterizacije kalcijumovih kanala T-tipa su izvršene na senzornim neuronima embriona pileta, kao i na telima neurona spinalnih gangliona novorođenih pacova (Carbone i Lux, 1984; Fedulova i sar., 1985), a nakon toga je usledilo otkriće njihove uloge u senzornoj transmisiji u bolu u studiji na telima senzornih neurona spinalnih gangliona adultnih pacova (Todorovic i sar., 2001; Todorovic i Jevtovic-Todorovic, 2011). Studije koje su usledile potvrdile su da T-kanali nisu podjednako zastupljeni na svim **perifernim** senzornim neuronima spinalnih gangliona: senzorni neuroni srednje veličine su najbogatiji ovim kanalima, a za njima i oni najmanje veličine (Scroggs i Fox, 1992). Studije ispitivanja kinetike T-kanala, kao i rezultati *in situ* hibridizacije, su dalje utvrdile da je Cav3.2 podtip najzastupljeniji na srednjim i malim senzornim neuronima, koji spadaju u grupu C-polimodalnih nociceptora (Todorovic i Lingle, 1998) i A $\delta$  mehanoreceptora (Dubreuil i sar., 2004; Wang i Lewin, 2011). Dodatno, miševi kod kojih je globalno obrisan Cav3.2 kanal, pokazuju smanjenu bolnu reakciju na hemijski, termički i mehanički stimulus (Choi i sar., 2007).

Na **spinalnom** nivou, u laminama I i II zadnjih rogova sive mase kičmene moždine, opisano je da blokada presinaptičkih T-kanala primenom selektivnog blokatora T-kanala (TTA-P2) na ćelije preparata kičmene moždine smanjuje spontano sinaptičko oslobađanje glutamata, bez uticaja na oslobađanje GABA-e (Jacus i sar., 2012). Ovaj rezultat ukazuje na veliki uticaj T-kanala na ekscitabilnost neurona koji učestvuju u spinalnoj transmisiji bolnog signala. Uloga Cav3.2 podtipa je posebno ispitivana lokalnom primenom antisense oligonukleotida, koji lokalno ukidaju produkciju ovog, ali ne i druga dva podtipa T-kanala na spinalnom nivou, čime se signifikantno smanjuje osetljivost pacova na termički i mehanički stimulus (Bourinet i sar., 2005b).

I na **supraspinalnom** nivou pokazan je značaj T-kanala u prenosu bolnih impulsa. Naime, Kim i sar. (2003) su otkrili da sistemska primena mibefradila, neselektivnog blokatora T-kalcijumovih kanala, dovodi do smanjenja nociceptivnog odgovora (broja grčeva) izazvanih intraperitonealnom injekcijom sirćetne kiseline. S druge strane, u istoj studiji je pokazano da direktna intratalamička primena ovog blokatora povećava nociceptivni odgovor u normalnih (eng. *wild type* – WT) miševa. Povećanje nociceptivnog bihevioralnog odgovora usled intraperitonealne injekcije sirćetne kiseline je takođe uočeno i u miševa u kojih je genetskom modifikacijom izbačen gen za Cav3.1 podtip T-kanala.

Prethodno pomenuti nalazi ukazuju na kompleksnu ulogu T-kanala u transmisiji bolnog stimulusa, koja zavisi od njihove lokalizacije na različitim strukturama uključenih u nociceptivne puteve. Na nivou neurona ventroposteriolateralnog (VPL) talamičkog jedra, koji se aktiviraju u visceralnom modelu bola u pacova i primata (Willis i sar., 1999), blokada ili izostanak Cav3.1 podtipa T-kanala remeti funkcionisanje neuronskog kola između VPL i susednog retikularnog jedra (*nucleus reticularis thalami*), glavnog inhibitornog jedra talamusa (Kim i sar., 2003). Naime, usled blokade ili brisanja Cav3.1 podtipa T-kanala na neuronima VPL jedra dolazi do gubitka visoko-frekventnih akcionih potencijala ovih neurona, koji su neophodni za aktivaciju inhibitornih neurona retikularnog jedra. Izostanak ovog inhibitornog odgovora retikularnog jedra posledično dovodi do facilitacije prenosa nociceptivne informacije ka kortikalnim strukturama i povećanja nociceptivnog bihevioralnog odgovora.

Na nivou periakveduktalne sive mase (PAG), pokazano je da endogeni opiodi, kao i direktna primena morfina (Park i sar., 2010), aktiviraju  $\mu$ -opiodne receptore na gabergičkim neuronima, usled čega dolazi do hiperpolarizacije ovih tonički aktivnih GABA neurona, te do dezinhibicije neurona PAG (tzv. model dezinhibicije; Basbaum i Fields, 1984) koji se dalje projektuju na RVM. Na ovaj način se aktivira put descendente inhibicije bola koji preko RVM ostvaruje inhibiciju prenosa nociceptivnih informacija na nivou zadnjih rogova sive mase kičmene moždine (Yakshi sar., 1976; Reichling i sar., 1988; Dostrovsky i Deakin, 1977; Lewis i Gebhart, 1977).

Park i sar. (2010) su otkrili da je ovaj efekat morfina na tonički aktivne GABA neurone, koji dovodi do smanjenja okidanja brzih pojedinačnih akcionih potencijala i oslobađanja neurotransmitera (North i Williams, 1983; Pan i sar., 1991), zavisano od prisustva Cav3.1 kanala na ovim GABA-ergičkim neuronima. Naime, usled efekta opioida na  $\mu$ -opioidne receptore, dolazi do hiperpolarizacije ćelijske membrane neurona, koja je dovoljna da se Cav3.1 kanali prvo deaktiviraju, a potom i aktiviraju, i da dovedu do okidanja akcionih potencijala na nižim voltažama (tzv. low threshold spiking), čime se sprečava generisanje pojedinačnih akcionih potencijala, kao i oslobađanje GABA-e, te dolazi do aktivacije RVM i descendentnog puta bola. S druge strane, globalno brisanje ili selektivni gubitak ovog podtipa T-kalcijumovih kanala na nivou PAG dovodi do gubitka okidanja akcionih potencijala na nižim voltažama (tzv. low threshold spiking), usled čega se umanjuje dezinhibicija i dalja aktivacija projekcionih neurona na RVM.

### **3.3.3. Uloga T-kanala u animalnim modelima bola**

Lokalna injekcija lipoične kiseline dovodi do inhibicije Cav3.2 podtipa T-kanala u senzornim neuronima, što ima za posledicu smanjenje osetljivosti na noksičan termički i mehanički stimulus u miševa (Lee i sar., 2009). Značaj Cav3.2 kanala je opisan i u inflamatornim (Shin i sar., 2008) i visceralnim modelima bola (Tsubota-Matsunami i sar., 2012). Smanjenje ekspresije Cav3.2 kanala na telima malih primarnih senzornih neurona gangliona dorzalnih korenova dovodi do ublažavanja nociceptivnog odgovora u akutnom visceralnom modelu bola (Choi i sar., 2007). Takođe je pokazano da su Cav3.2 kanali eksprimirani i na primarnim senzornim neuronima koji inervišu kolon, te da brisanje gena za ovaj kanal ublažava nociceptivno ponašanje u Cav3.2 KO (eng. *knock-out*) miševa u modelu hroničnog visceralnog bola (Marger i sar., 2011). Na osnovu ovih nalaza, zaključeno je da gastrotransmitter, vodonik sulfid iz kolona, deluje pronociceptivno na kolon preko redoks modulacije T-kanala. U formalinskom testu je pokazano da miševi kod kojih je globalno izbačen gen za Cav3.2 kanal ispoljavaju smanjeni nociceptivni odgovor u obe faze testa (Choi i sar., 2007).

Nedavno je otkriven i značaj Cav3.2 podtipa T-kanala u različitim modelima hroničnog bola. Aktivnost Cav3.2 populacije, kao i njihova ekspresija, povećani su kod gojaznih miševa sa dijabetesom tipa II (Latham i sar., 2009). Njihov značaj u dijabetesnoj neuropatiji je potvrđen u istoj studiji, gde je efikasno smanjena hiperalgezija kod ovih životinja, nakon primene selektivnog blokatora T-kanala iz grupe sintetskih neuroaktivnih steroida. U modelu dijabetesa tipa I, koji je indukovao intraperitonealnom injekcijom streptozotocina, takođe je uočeno povećanje ekscitabilnosti i ekspresije T-kanala (Messinger i sar., 2009). U istoj studiji je smanjenje hiperalgezije (osećaj bola na blag bolni stimulus) i alodinije (osećaj bola na stimulus koji normalno ne izaziva bol) uspešno postignuto primenom oligonukleotida koji sprečavaju aktiviranje informacione RNK neophodne za proizvodnju Cav3.2 kanala. Takođe, u neuropatiji izazvanoj podvezivanjem išijadikusa (Jagodic i sar., 2008), kao i kod podvezivanja L<sub>5</sub> i L<sub>6</sub> spinalnih nerava (Yue i sar., 2013), ustanovljeno je da su kalcijumske T-struje značajno povećane. Konačno, ukidanje ili smanjenje ekspresije gena za Cav3.2 kanal genetskom manipulacijom kod životinja, rezultiralo je smanjenjem bolne hiperosetljivosti usled smanjene ekscitabilnosti primarnih aferentnih vlakana (Choi i sar., 2007; Bourinet i sar., 2005b).

### **3.3.4. Regulacija funkcije T-kanala u bolu**

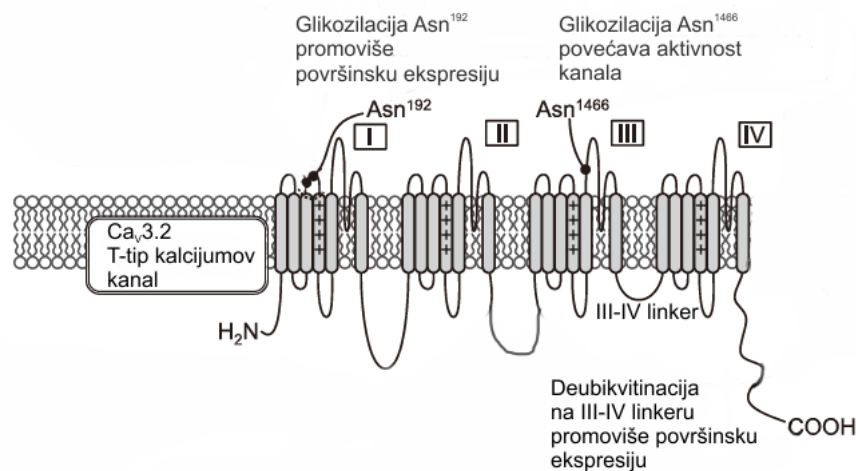
Različiti mehanizmi utiču na promenu biofizičkih karakteristika, kao i ekspresije, a samim tim i amplitude i dužine trajanja jonskih kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala. Ovi regulatorni mehanizmi mogu biti direktni, ali i indirektni. U direktne mehanizme modulacije spada direktna interakcija sa dvovalentnim katjonima kao što su nikel ( $Ni^{2+}$ ) i cink ( $Zn^{2+}$ ). Vezivanjem  $Zn^{2+}$  za asparagin – glicin – histidin sekvencu petlje III–IV i aspartat petlje II Cav3.2 kalcijumovog kanala, dolazi do stabilizacije kanala u zatvorenoj konformaciji (Kang i sar., 2010). Nikel ( $Ni^{2+}$ ) takođe utiče na smanjenje kalcijumovih struja koje potiču od Cav3.2 kanala usled vezivanja za histidin na položaju 191 petlje III–IV (Kang i sar., 2006). Sa druge strane, redukujuća jedinjenja, kao što su ditiotreitol i L–cistein, dovode do stvaranja helatnih kompleksa sa cinkom, usled čega se raskida veza između ovog metala i Cav3.2 kanala, i dolazi do povećanja T-kalcijumovih struja i senzitivacije C



polimodalnih nociceptora (Nelson i sar., 2007). U indirektno mehanizme spada modulacija funkcije T-kanala putem protein–kinaza, uključujući fosforilaciju (Zhang i sar., 2013), modulacija genske ekspresije (Lipscombe i sar., 2013) i post-translacione modifikacije na nivou samog kanala koje utiču na njegovu membransku ekspresiju (Weiss i Zamponi, 2017).

### 3.3.4.1. *Mehanizmi regulacije membranske ekspresije T-kanala*

Posebnoj grupi mehanizama regulacije pripadaju i oni koji utiču na sam proces ekspresije proteina na ćelijskoj membrani, kao i na proces njegove degradacije internalizacijom u proteazomima (tzv. *trafficking* proteina). U ove mehanizme spadaju **N-glikozilacija** i **ubikvitinacija** (Slika 8). Oba mehanizma su značajna za uticaj T-kalcijumovih kanala u bolu. Nedavno je pokazano da N-glikozilacija, proces enzimski zavisne konjugacije glikana oligosaharidnog lanca za N-asparaginsku reziduu proteina, utiče na povećanje ekspresije i aktivnosti T-kalcijumovih kanala u dijabetesnoj neuropatiji (Latham i sar., 2009; Orestes i sar., 2013).



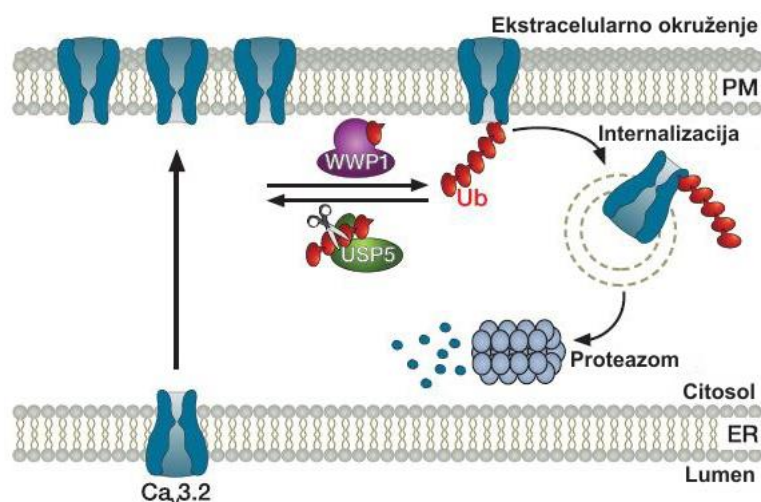
**Slika 8.** Prikaz lokalizacije N-glikozilacije i deubikvitinacije na Ca<sub>v</sub>3.2 kalcijumovom kanalu. N-glikozilacija asparagina promoviše ekspresiju i povećava aktivnost Ca<sub>v</sub>3.2 kalcijumovih kanala, dok deubikvitinacija na linkeru III–IV promoviše površinsku ekspresiju kanala (Preuzeto i prilagođeno iz reference Sekiguchi i Kawabata, 2013).

#### 3.3.4.1.1. *Značaj ubikvitinacije T-kanala u bolu*

Ubikvitin–zavisna degradacija voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala putem ubikvitin–proteazom sistema važan je mehanizam regulacije broja jonskih kanala

na površini ćelijske membrane (Slika 9) (Felix i Weiss, 2016). Ubikvitinacija proteina je proces koji se zasniva na obeležavanju proteina sekvencom ubikvitina uz pomoć ubikvitin ligaze (Hershko i Ciechanover, 1998). Ovaj proces obeležavanja proteina omogućava njegovu dalju internalizaciju i degradaciju u proteazomima. Nedavno je ubikvitinacija prepoznata kao važan mehanizam regulisanja funkcije kalcijumovih kanala. Pokazano je da ubikvitinacija Cav1.2 (Altier i sar., 2011), kao i Cav2.2 (Waithe i sar., 2011; Page i sar., 2016), dovodi do smanjenja njihove ekspresije na ćelijskoj membrani, što za posledicu ima i smanjenje kalcijumovih struja koje potiču od ovih kanala.

U slučaju T-kalcijumovih kanala, nedavno je pokazano da se ubikvitinacija na nivou Cav3.2 kanala odigrava u sklopu III–IV petlje kanala, u prisustvu ubikvitin ligaze WWP1 (García–Caballero i sar., 2014) (Slika 9). S druge strane, deubikvitinacija je proces odvajanja ubikvitinske sekvence uz pomoć ubikvitin proteaze USP5 (eng. *ubiquitin-specific protease*). Shodno tome, USP enzim kontroliše nivo ubikvitinacije i deubikvitinacije, utičući na taj način na ekspresiju kanala na ćelijskoj površini (García–Caballero i sar., 2014).



**Slika 9.** Proces ubikvitinacije  $Ca_v3.2$  kanala. Enzim WWP1 obeležava kanal za degradaciju vezujući ubikvitinsku sekvencu za protein. Kanal obeležen ubikvitinskom sekvencom se internalizuje i degradira u proteazomu. Proces ubikvitinacije je kontrolisan procesom deubikvitinacije, putem koga enzim USP5 raskida vezu ubikvitinske sekvence i kanala. (Preuzeto i prilagođeno iz Weiss i Zamponi, 2017).

Uloga ubikvitinacije i deubikvitinacije Cav3.2 kanala u modulaciji bola nedavno je pokazana *in vivo*. Naime, García–Caballero i sar. (2014, 2016) su otkrili da selektivna blokada sinteze USP5 enzima, zaduženog za deubikvitinaciju Cav3.2 kanala, dovodi do pojave analgezije u inflamatornom i neuropatskom modelu bola u

miševa. S druge strane, ometanje vezivanja enzima za deubikvitinaciju za ciljno vezno mesto na proteinu je takođe mehanizam pomoću koga se može uticati na funkcionalnost proteina. Ovaj efekat se može postići primenom malih peptidnih molekula tzv. tat peptida. Ovi mali molekuli zovu se drugačije i peptidi koji penetriraju u ćeliju (eng. *cell penetrating peptides*) zahvaljujući primeni tat tehnologije: tat predstavlja transaktivator transkripcije (TAT) humanog virusa imunodeficijencije i omogućava velikim molekulima da penetriraju kroz lipofilnu ćelijsku membranu i tako ispolje svoje efekte na unutarćelijskom nivou (Guidotti i sar., 2017). Terapija tat peptidima postaje sve popularniji koncept u istraživanju. Trenutno se nekoliko tat peptida nalazi u pretkliničkim, kao i u kliničkim ispitivanjima novih lekova za terapiju kancera (Guidotti i sar., 2017). Za terapiju bolnih stanja, u kliničkim ispitivanjima našao se tat peptid za lečenje post-herpetičke neuralgije (Cousins i sar., 2013).

Od velikog značaja za naše istraživanje je nalaz da primena organskih molekula ili tat peptida koji sprečavaju vezivanje USP5 enzima za Cav3.2 kanal, ispoljava antihiperalgzijski efekat u inflamatornim i neuropatskim modelima bola u miševa (García-Caballero i sar., 2014; Gadotti i sar., 2015).

## **4. Uloga antagonista kalcijumovih kanala u terapiji bola**

### **4.1. Antagonisti kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri višim potencijalima**

Poznato je da blokada ili modulacija na nivou kalcijumovih kanala, koji se aktiviraju pri višim potencijalima ćelijske membrane, dovodi do ublažavanja bola. S tim u vezi, intratekalno primenjen  $\omega$ -konotoksin GVIA, blokator kalcijumovog kanala **N-tipa**, uspešno umanjuje neuropatski bol u pacova (Chaplan i sar., 1994). U postincizionom bolu je pokazano da zikonotid ( $\omega$ -konotoksin MVIIA), sintetski analog ovog toksina i selektivni blokator kalcijumovih kanala N-tipa, smanjuje termičku i mehaničku hiperalgziju incizirane šape (Wang i sar., 2000), kao i hiperalgziju u neuropatskim i inflamatornim modelima bola (Miljanich, 2004).

Primena antagonista **P/Q-tipa** daje oprečne rezultate u animalnim modelima bola. Intratekalno primenjen  $\omega$ -agatoksin IVA, antagonist P/Q kanala, nije ispoljio efekat na mehaničku alodiniju i termičku hiperalgeziju u neuropatskom modelu bola (Chaplan i sar., 1994; Yamamoto i sar., 1998). S druge strane, miševi kod kojih je genetičkom manipulacijom izbačen gen za ovaj kanal (Cav2.1) ispoljavaju smanjen nociceptivni odgovor u drugoj fazi formalinskog testa, kao i smanjenu mehaničku alodiniju u modelu neuropatskog bola, ali paradoksalno i povećanu akutnu nocicepciju na termički stimulus (Luisetto i sar., 2006). Takođe je pokazano da  $\omega$ -agatoksin IVA ublažava bolnu transmisiju na nivou kičmene moždine u modelu inflamatorne artropatije u pacova (Nebe i sar., 1997).

Vrlo malo se zna o ulozi **L-tipa** kalcijumovih kanala u modelima bola. U modelima neuropatskog bola otkriveno je da dolazi do promene u ekspresiji podtipova L kalcijumovih kanala (Kim i sar., 2001; Fossat i sar., 2010). Takođe se smatra da selektivna blokada ekspresije Cav1.2 podtipa ovih kanala u anteriornom cingulatnom korteksu može uticati na bihevioralni odgovor životinja u bolnim stanjima (Jeon i sar., 2010). Selektivna blokada ekspresije istog kanala u kičmenoj moždini sprečava nastanak hiperekscitabilnosti i bolne hiperosetljivosti u neuropatskom modelu bola, ukazujući da ovi kanali mogu uticati na održavanje hroničnog bola (Fossat i sar., 2010). Nasuprot ovom nalazu, intratekalno primenjeni antagonisti L-kanala, kao što su verapamil, diltiazem i nimodipin, nisu ispoljili analgetički efekat u neuropatskim modelima bola (Chaplan i sar., 1994; Calcutt i Chaplan, 1997; Fukuizumi i sar., 2003). S druge strane, intratekalna primena ovih antagonista, potencirala je analgetički efekat morfina i sprečila nastanak tolerancije, ukazujući tako na značajan uticaj povećanja intracelularnog sadržaja kalcijuma na razvoj tolerancije na morfin (Michaluk i sar., 1998; Ray i sar., 2008; Welch i Olson, 1991).

Antagonista **R-tipa** kalcijumovih kanala, SNX-482, dobijen iz otrova pauka tarantule (*Hysteroocrates gigas*), inhibira prenos bolnih impulsa sa C i A $\delta$  nociceptora na spinalnom nivou u neuropatskom modelu bola u pacova (Matthews i sar., 2007). Takođe je pokazano da u prvoj fazi formalinskog testa SNX-482 potencira, dok u drugoj fazi inhibira nociceptivno ponašanje u miševa (Murakami i sar., 2004).

Takođe, rezultati novijih studija ukazuju da gabapentin i pregabalin ispoljavaju svoj analgetički efekat u neuropatskom bolu i fibromijalgiji (Moore i sar., 2009, 2011), preko modulacije  $\alpha 2\delta$  podjedinice (Field i sar., 2006; Patel i sar., 2013), neophodne za funkcionisanje neuronskih kalcijumovih kanala N i P/Q-tipa (Davies i sar., 2007). Vezujući se za  $\alpha 2\delta$  podjedinicu voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala, ovi antiepileptici dovode do direktne blokade aktivnosti kalcijumovog kanala (Gee i sar., 1996; Hendrich i sar., 2008). Efikasnost gabapentina potvrđena je u različitim modelima inflamatornog (Munro i sar., 2007; Zhang i sar., 2009), kao i neuropatskog bola (Tomić i sar., 2010; Yasuda i sar., 2005). Slično tome, i pregabalin efikasno ublažava bol kako u visceralnom (Ohashi-Doi i sar., 2010), tako i u neuropatskom modelu bola (Hahm i sar., 2012; Ling i sar., 2008).

Trenutno su u fazi kliničkih ispitivanja antagonisti N-tipa kalcijumovih kanala: CNV2197944 (NCT01848730 i NCT01893125) u pacijenata sa postherpetičkom neuralgijom i dijabetesnom neuropatijom, kao i Z160 (NCT1655849) u pacijenata sa postherpetičkom neuralgijom. Podaci u vezi sa njihovom kliničkom efikasnošću još uvek nisu dostupni. Očigledno je da bi trebalo slediti primer blokatora natrijumovih kanala (antikonvulziva, lokalnih anestetika i antiaritmika), koji se vezuju pre svega za kanale u inaktivisanom stanju. Na ovaj način ovi molekuli ciljano deluju samo na hiperekscitabilne ćelije, štedeći pritom aktivnost kanala u tkivima koja normalno funkcionišu (Hille, 1977; Ragsdale i sar., 1991; Willow i sar., 1985). Prateći ovaj primer, moguće je postići aninociceptivni efekat ciljano delujući na abnormalno aktivne neurone bolnog puta.

Kada govorimo o kliničkoj upotrebi antagonista kalcijumovih kanala, bitno je napomenuti da postoji nekoliko problema sa peptidnim molekulima kao što su  $\omega$ -konotoksini i njihovi derivati, koji limitiraju njihovu kliničku upotrebu. Ovi peptidni molekuli prirodnog porekla (dobijeni iz otrova morskih puževa) blokiraju seriju jonskih kanala tako što fizički vrše okluziju  $\alpha_1$  podjedinice koja formira poru kanala (Bourinet i Zamponi, 2017), čime blokiraju protok jona kroz ove kanale. Usled toga, pored željenih analgetičkih efekata, dovode i do niza neželjenih efekata kao što su mučnina, nesvestica, nistagmus, retencija urina, poremećaj memorije i halucinacije. Zbog svega navedenog, do kliničke faze ispitivanja došao je samo zikonotid (MVIIA), sintetski analog  $\omega$ -konotoksina. Kliničke studije su potvrdile efikasnost zikonotida

u pacijenata kod kojih su drugi lekovi, primenjeni sistemski ili intratekalno, neefikasni (za tretiranje kancerskog bola, kao i u neuropatiji koja je u vezi sa HIV infekcijom) (Sanford, 2013). Međutim, i pored toga, njegova upotreba je limitirana na intratekalno i spinalno davanje, jer se radi o relativno velikom molekulu, koji ne može da prođe kroz krvno-moždanu barijeru.

Gabapentin se u kliničkoj praksi primenjuje za lečenje perifernih neuropatija (BNF 66, 2013), s obzirom da je njegova efikasnost potvrđena u perifernoj dijabetesnoj neuropatiji, postherpetičkoj neuralgiji, u fantomskom i kancerskom bolu, kao i u neuropatiji koja je u vezi sa HIV infekcijom, ali ne i u hemoterapijom-indukovanoj neuropatiji (Rice i Maton, 2001; Bone i sar., 2002; Hahn i sar., 2004; Rao i sar., 2007; Sandercock i sar., 2009; Mishra i sar., 2012). Pregabalin, derivat gabapentina, ispoljio je efikasnost u kliničkim studijama koje su ispitivale neuropatski bol centralnog i perifernog porekla, kao i fibromijalgiju i kancerski bol (Lesser i sar., 2004; Crofford i sar., 2005; van Seventer i sar., 2006; Mishra i sar., 2012).

#### 4.2. Antagonisti T-kanala u terapiji bola

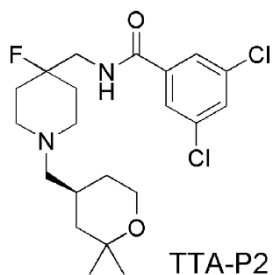
Poznato je da blokatori T-kanala, kao što su etosuksimid i mibefradil, dovode do analgezije u eksperimentalnim neuropatijama u glodara (Dogrul i sar., 2003; Flatters i Bennett, 2004; Matthews i Dickenson, 2001; Munro i sar., 2007; Obradovic i sar., 2014; Todorovic i sar., 2002), kao i u inflamatornom modelu bola (Cheng i sar., 2007). Dodatno, novi molekuli koji blokiraju T-kanale sa velikom selektivnošću takođe potvrđuju njihovu ulogu u razvoju hiperalgije. Naime, ML218 (3,5-dihloro-N-[[[(1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6-egzo,6 $\alpha$ )-3-(3,3-dimetilbutil)-3 azabiciklo [3.1.0] heks-6-il]metil]-benzamid hidrohlorid), eksperimentalna supstanca koja selektivno blokira T-kanale, smanjuje hiperosetljivost na mehanički stimulus u pacova sa neuropatijom izazvanom paklitakselom (Li i sar., 2017).

U kliničkim ispitivanjima, ABT-639, antagonista Cav3.2 podtipa T-kalcijumovih kanala, koji blokira ove kanale u aktivisanom stanju, nije ispoljio analgetički efekat u fazi II kliničkog ispitivanja (NCT01345045) u tretmanu bola kod pacijenata sa dijabetesnom neuropatijom (Ziegler i sar., 2015). Za razliku od ovog molekula, Z944,

antagonista Cav3.2 podtipa T-kanala, pokazao je pozitivne rezultate u fazi I dvostruko slepog, placebom kontrolisanog kliničkog ispitivanja bezbednosti, podnošljivosti i farmakokinetike pojedinačnog i ponovljeng doziranja (Bourinet i sar., 2014; Lee, 2014). Primećeni neželjeni efekti na nivou centralnog nervnog sistema bili su blagog karaktera i očekivani. U fazi Ib (Lee, 2014), Z944 je primenjen u dozama od 20, 40 i 80 mg na svaka 2 h (ukupno 4 primene po dozi) i efekat je meren u klinički relevantnom modelu merenja svetlom izazvanih potencijala (eng. *light evoked potentials*) na koži na koju je primenjen kapsaicin (modelovanje neuropatskog bola i centralne senzitivizacije), kao i u modelu izloženosti ultraljubičastom svetlu (modelovanje inflamatornog bola). Z944 je ispoljio efikasnost u ova oba testa, međutim nema daljih informacija o tome da li je ovaj molekul ispitivan u sledećim fazama kliničkog ispitivanja.

#### 4.2.1. TTA-P2

Od posebnog značaja za naše istraživanje je 3,5-dihloro-N-[1-(2,2-dimetil-tetrahidro-piran-4-ilmetil)-4-fluoro-piperidin-4-ilmetil]-benzamid (TTA-P2, Slika 10), razvijen kao blokator T-kanala koji ispoljava efekat pre svega na kanale u inaktivisanom stanju.



**Slika 10.** Hemijska struktura TTA-P2 (3,5-dihloro-N-[1-(2,2-dimetil-tetrahidro-piran-4-ilmetil)-4-fluoro-piperidin-4-ilmetil]-benzamid).

Pokazano je da TTA-P2 selektivno blokira T-kanale na telima primarnih senzornih neurona spinalnog gangliona pacova (Choe i sar., 2011), kao i da uspešno smanjuje termičku hiperalgeziju kod dijabetičnih pacova (Choe i sar., 2011). U formalinskom testu u miševa, TTA-P2 smanjuje nociceptivno ponašanje odn. vreme provedeno u grickanju i lizanju regije tela u koju je ubrizgan formalin kao algogena supstanca (Choe i sar., 2011). Drugi molekul iz iste familije, (R)-2-(4-ciklopropilfenil)-N-(1-(5-(2,2,2-trifluoro-etoksi)piridin-2-il)etil) acetamid (TTA-A2), koji ima nešto izraženiji afinitet za Cav3.2 u odnosu na Cav3.1, uspešno smanjuje

bolnu hiperosetljivost na dozno-zavisan način u modelu sindroma iritabilnog kolona u pacova (François i sar., 2014).

#### **4.2.2. Neurosteroidi**

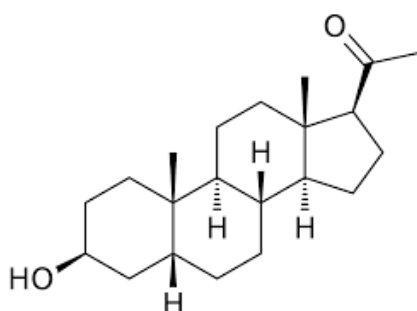
S obzirom na već opisanu ulogu T-kanala u bolnoj transmisiji, pojavila se jasna potreba za lekovima koji bi, blokirajući ove kanale, doveli do analgezije. U grupi antagonista T-kanala važno mesto zauzimaju i neuroaktivni steroidi. Ovi molekuli predstavljaju grupu organskih jedinjenja za koje je poznato da modulišu neuronsku aktivnost u perifernom i centralnom nervnom sistemu, uzrokujući različite bihejvioralne i neuroendokrine promene u ljudi i životinja (Schumacher i sar., 2012, 2014; Brinton, 2013). Pokazano je da holesterol, kada se injektuje intravenski, dovodi do anestezije i analgezije kod mačaka, te je posledično bilo moguće uspešno sprovesti abdominalnu operaciju (Cashin i Moravek, 1927). Detaljno je opisan i efekat seksualnih hormona na percepciju bola, pa tako fluktuacije progesterona i estrogena tokom estrusnog ciklusa različito utiču na prag bola (Frye i sar., 1992, 1993; Kuba i Quinones-Jehab, 2005). Konačno, otkriće prisustva enzima koji učestvuju u steroidogenezi u centralnom nervnom sistemu, ukazuje na njihovu značajnu ulogu u modulaciji senzorne transmisije. S tim u vezi, otkriveno je da se aktivna sinteza neurosteroida odigrava i u zadnjim rogovima sive mase kičmene moždine, koja predstavlja okosnicu modulacije senzorne transmisije (Mensah-Nyagan i sar., 2008).

Do sada se smatralo da su modulatorni efekti neurosteroida na nociceptivnu transmisiju posredovani uglavnom GABA<sub>A</sub> receptorima (Belelli i Lambert, 2005; Lambert i sar., 2001), međutim novije studije ukazuju na ulogu T-kanala u njihovom antinociceptivnom efektu. Naime, supkutano primenjeni progesteron umanjuje alodiniju u neuropatskom modelu bola u pacova (Coronel i sar., 2011). I njegov derivat, 5 $\alpha$ -redukovani neurosteroid alopregnanolon, uspešno je umanjio termičku i mehaničku hiperosetljivost u pacova sa neuropatskim bolom, posredstvom modulacije i GABA<sub>A</sub> receptora i T-kanala (Pathirathna i sar., 2005a, 2005b).

Pokazano je da i 5 $\beta$ -redukovani endogeni neurosteroidi ispoljavaju antinociceptivno dejstvo. **Epipregnanolon** (3 $\beta$ -hidroksi-5 $\beta$ -pregnan-20-on),

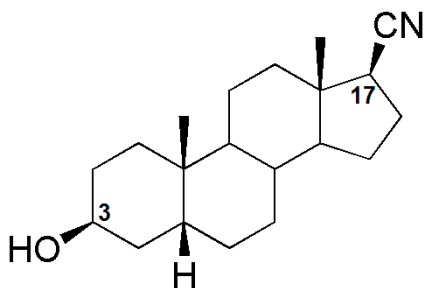


dobijen iz progesterona pod dejstvom  $5\beta$ -reduktaze i  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze (Slika 11), ispoljio je antinociceptivni efekat nakon intraplantarne primene u pacova, ali ne i u miševa kod kojih je izbačen gen za Cav3.2 kanal (Ayoola i sar., 2014). Ovaj nalaz ukazuje na značaj T-kalcijumovih kanala u ispoljavanju analgetičkog efekta  $5\beta$ -redukovanih neuroaktivnih steroida.



**Slika 11.** Hemijska struktura epipregnanolona ( $3\beta$ -hidroksi- $5\beta$ -pregnan-20-on).

S tim u vezi, od posebnog značaja je grupa sintetskih neuroaktivnih steroida sa  $5\beta$ -redukovanom grupom, koji ispoljavaju potentnu blokadu T-kanala usled čega dovode do njihove stabilizacije u inaktivisanom stanju (Todorovic i sar., 2004). U ovoj grupi jedinjenja, neurosteroid sa hidroksilnom grupom u  $3\beta$  položaju ( **$3\beta$ -OH**), sintetski analog epipregnanolona (Slika 12), pokazao je najpotentnije antihiperalgezijsko dejstvo u testu termičke nocicepcije u pacova, iako usled specifične strukture ne potencira GABA-ergičku transmisiju.



**Slika 12.** Hemijska struktura  $3\beta$ -OH neurosteroida ( $(3\beta,5\beta,17\beta)$ -3-hidroksiandrostan-17-karbonitril).

Konačno, nedavno publikovana studija pokazala je da  $3\beta$ -OH poseduje i hipnotički efekat kada se primeni u pacova uzrasta od 7 dana, bez ispoljavanja poznatih neurotoksičnih efekata koji se javljaju kod primene konvencionalnih hipnotika i anestetika (Atluri i sar., 2018). Ovi rezultati ukazuju na njegov izuzetan potencijal za bezbednu upotrebu u anesteziji u pedijatrijskoj populaciji. Takođe, lokalna intraplantarna primena ovog neurosteroida je umanjila nocicepciju u zdravih pacova u testu izmicanja šape pod uticajem toplote, ukazujući na njegov antinociceptivni potencijal (Todorović i sar., 2004).

Na osnovu svega navedenog, evidentno je da su potrebna dodatna ispitivanja uloge T-kalcijumovih kanala u akutnom somatskom bolu. Takođe je potrebno ispitati i potencijalni analgetički efekat antagonista ovih kanala u postincizionom modelu bola, koji predstavlja oblik akutnog somatskog bola.

## II. CILJEVI RADA

Naučni ciljevi ove doktorske disertacije su:

- 1. Ispitati *in vivo* ulogu T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova i miševa.**
  - 1.1. Ispitati razvoj postincizione hiperalgezije u pacova.
  - 1.2. Ispitati razvoj postincizione hiperalgezije u WT miševa.
  - 1.3. Ispitati ulogu T-kanala u razvoju postincizionog bola primenom miševa kod kojih je izbačen gen za Cav3.2 T-kanal (Cav3.2 *knock out* – KO miševi).
  
- 2. Ispitati elektrofiziološki ulogu T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova.**
  - 2.1. Ispitati promene u ekscitabilnosti (frekvenci i broju akcionih potencijala) akutno disociranih primarnih senzornih neurona u postincizionom modelu bola, na disociranim telima senzornih neurona spinalnih gangliona lumbalnog regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub> u pacova. Utvrditi da li selektivni blokator T-kanala utiče na ekscitabilnost ovih neurona.
  - 2.2. Ispitati promene u biofizičkim parametrima koji karakterišu T-kanale na akutno disociranim senzornim neuronima spinalnih gangliona lumbalnog regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub> u postincizionom modelu bola u pacova.
  
- 3. Ispitati *in vitro* da li dolazi do promene u ekspresiji T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova.**
  - 3.1. Ispitati promene u ekspresiji iRNK za T-kanale na nivou spinalnih gangliona lumbalnog regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub> pomoću kvantitativne PCR u realnom vremenu (qRT-PCR) kao i metodom imunoblotova u postincizionom modelu bola u pacova.
  - 3.2. Ispitati promene u ekspresiji membranske frakcije T-kanala na nivou spinalnih gangliona lumbalnog regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub> imunocitohemijским obeležavanjem T-kanala na membranama disociranih tela senzornih neurona spinalnih gangliona u postincizionom modelu bola u pacova.

- 4. Ispitati ulogu deubikvitinacije T-kanala enzimom USP5 u razvoju hiperalgezije nakon incizije u pacova i miševa.**
  - 4.1. Utvrditi promene u ekspresiji USP5 enzima koji vrši deubikvitinaciju T-kanala nakon incizije u miševa metodom imunoblotova.
  - 4.2. Ispitati da li selektivna supresija deubikvitinacije selektivnim smanjenjem ekspresije (tzv. *knock-down*) USP5 enzima zaduženog za deubikvitinaciju T-kanala, dovodi do antihiperalegijskog efekta u pacova i miševa.
  - 4.3. Ispitati da li smanjenje ekspresije USP5 enzima dovodi do smanjenja kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala, izmerenih u akutno disociranih primarnih senzornih neurona spinalnih gangliona lumbalnog regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub> u postincizionom modelu bola u pacova.
  - 4.4. Ispitati efekte selektivne blokade veznog mesta USP5 enzima za ciljno mesto na T-kanalu primenom tat peptida na razvoj mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u miševa.
  
- 5. Ispitati da li selektivni antagonisti T-kalcijumovih kanala ispoljavaju antinociceptivno dejstvo u postincizionom modelu bola u pacova.**
  - 5.1. Ispitati efekte selektivnog blokatora T-kanala (TTA-P2) na termičku i mehaničku nocicepciju u zdravih pacova, kako bi se utvrdila efektivna doza koja će se koristiti u daljim eksperimentima sa postincizionim modelom bola.
  - 5.2. Ispitati efekte pojedinačne i ponovljene intratekalne primene TTA-P2 nakon incizije, na termičku i mehaničku hiperalgeziiju u postincizionom modelu bola u pacova.
  - 5.3. Ispitati efekte pojedinačne preventivne intratekalne primene TTA-P2 neposredno pre incizije, na termičku i mehaničku hiperalgeziiju u postincizionom modelu bola u pacova.
  - 5.4. Ispitati efekte intratekalno primenjenog epipregnanolona na termičku i mehaničku nocicepciju u zdravih pacova, kako bi se utvrdila efektivna doza koja će se koristiti u daljim eksperimentima sa postincizionim modelom bola.

- 5.5. Ispitati efekte pojedinačne intratekalne primene epipregnanolona nakon incizije, na mehaničku hiperalgeziju u postincizionom modelu bola u pacova.
  - 5.6. Ispitati efekte novosintetisanog neuroaktivnog steroida ( $3\beta$ -OH), koji sa visokom selektivnošću blokira T-kanale, na termičku i mehaničku nocicepciju u zdravih pacova, kako bi se utvrdila efektivna doza koja će se koristiti u daljim eksperimentima sa postincizionim modelom bola. Utvrditi da li stereoselektivnost utiče na antinociceptivni efekat primenom enantiomera  $3\beta$ -OH (*ent-3 $\beta$ -OH*).
  - 5.7. Ispitati efekte pojedinačne i ponovljene intratekalne, i efekte ponovljene intraplantarne primene  $3\beta$ -OH nakon incizije na termičku i mehaničku hiperalgeziju u postincizionom modelu bola u pacova.
  - 5.8. Ispitati efekte pojedinačne preventivne intraperitonealne primene  $3\beta$ -OH, primenjenog u sklopu anestezije neophodne za izvođenje hirurške incizije, na termičku i mehaničku hiperalgeziju u postincizionom modelu bola u pacova.
6. **Ispitati uticaj najvećih antinociceptivnih doza TTA-P2, epipregnanolona i  $3\beta$ -OH na motornu koordinaciju pacova.**

### III. MATERIJAL I METODE

#### 1. Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su izvedeni na sledećim životinjama: na ženjkama pacova *Sprague-Dawley* soja telesne mase 180–220 g; na ženjkama miševa soja C57BL/6J; na mužjacima i ženjkama miševa soja C57BL/6J (eng. *wild type*; WT miševi) kod kojih je genetskom delecijom izbačen CACNA1H gen za Cav3.2 T-kalcijumov kanal (eng. *knock out*; KO miševi). Tkivo dorzalnih spinalnih ganglija pacova je korišćeno u *in vitro* eksperimentima u kojima je ispitivana uloga T-kanala u razvoju postincizionog modela bola. Pacovi su takođe korišćeni u *in vivo* eksperimentima u kojima je ispitivan razvoj hiperalgezije nakon hirurške incizije, kao i anitnociceptivni efekat blokatora T-kanala. Tkivo WT miševa je korišćeno u *in vitro* eksperimentima u kojima je ispitivana promena ekspresije T-kanala na telima senzornih neurona dorzalnih spinalnih ganglija. Miševi (WT i KO) su korišćeni u *in vivo* eksperimentima ispitivanja doprinosa Cav3.2 podtipa T-kanala razvoju hiperalgezije u postincizionom modelu bola.

Životinje korišćene u eksperimentima bile su uzrasta 8–12 nedelja i čuvane su u vivarijumu pod standardnim laboratorijskim uslovima: temperatura od 20–25 °C sa prirodnim ciklusom dan i noć (12/12 h) i relativna vlažnost vazduha od 60%. Sve eksperimentalne životinje su bile smeštene u specijalnim kavezima od pleksiglasa, sa žičanom rešetkom postavljenom odozgo. Kao podloga u kavezima korišćena je strugotina od drveta ili od posebnog mekanog papira visoke apsorptivne moći. U jednom kavezu bilo je smešteno po 5 miševa ili 3 pacova. Hrana u formi specijalnih briketa za ishranu eksperimentalnih glodara (Envigo/Harlan, Teklad, SAD) i voda bili su dostupni 24 h dnevno, osim tokom trajanja eksperimenta. Na dan eksperimenta, životinje su iz vivarijuma prenošene u sobu za bihejvioralne eksperimente koja je u sklopu vivarijuma, najmanje 1 h pre početka eksperimenta. Svi eksperimenti su izvođeni uvek u isto doba dana (od 8 do 16 h), kako bi se izbegle cirkadijalne varijacije u bihejvioralnim testovima.

Eksperimentalnu grupu činilo je 5–13 životinja. Za svaku vrstu eksperimenata postojala je kontrolna grupa koja je u istoj zapremini dobijala vehikulum za rastvaranje ili suspendovanje ispitivanih supstanci i bila je podvrgnuta istoj

eksperimentalnoj proceduri. Svaka životinja je korišćena u eksperimentu samo jednom. Nakon izvršenog testiranja, životinje su eutanazirane asfiksijom ugljen-dioksidom, nakon čega je izvršena cervikalna dislokacija kao sekundarni metod.

Sve eksperimentalne procedure odobrene su od strane Etičke komisije za rad sa eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta Univerziteta u Virdžiniji (SAD), kao i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Koloradu (SAD). Prilikom rada sa eksperimentalnim životinjama i izvođenju eksperimenata primenjivani su etički principi definisani u sklopu NIH Vodiča za čuvanje i upotrebu laboratorijskih životinja (eng. *National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, 2011).

## 2. Supstance korišćene u eksperimentima

U *in vitro* eksperimentima ispitivanja uloge T-kalcijumovih kanala u postincizionom bolu korišćene su sledeće supstance:

- TTA-P2 (3,5-dihloro-N-[1-(2,2-dimetil-tetrahydro-piran-4-ilmetil)-4-fluoro-piperidin-4-ilmetil]-benzamid, čista supstanca, Alomone Labs, Izrael)
- DMSO (dimetil-sulfoksid, Sigma Aldrich, SAD)

Za *in vitro* eksperimente TTA-P2 je rastvoren u 100% dimetil sulfoksidu.

U *in vivo* eksperimentima ispitivanja antinociceptivnog efekta antagonista kalcijumovih kanala T-tipa korišćene su sledeće supstance:

- TTA-P2 (3,5-dihloro-N-[1-(2,2-dimetil-tetrahydro-piran-4-ilmetil)-4-fluoro-piperidin-4-ilmetil]-benzamid, čista supstanca, Alomone Labs, Izrael)
- 3 $\beta$ -OH ((3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,17 $\beta$ )-3-hidroksiandrostan-17-karbonitril, čista supstanca; laboratorija kolaboratora prof. dr Dagleasa Kavija, Medicinski fakultet Univerzitet u St. Louis-u, SAD)
- *Ent*-3 $\beta$ -OH (*ent*-(3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,17 $\beta$ )-3-hidroksiandrostan-17-karbonitril, čista supstanca; laboratorija kolaboratora prof. dr Dagleasa Kavija, Medicinski fakultet Univerzitet u St. Louis-u, SAD)

- Epipregnanolon (3 $\beta$ -hidroksi-5 $\beta$ -pregnan-20-on, Steraloids, Inc. Newport, RI, SAD)
- tat III-IV peptid (Tat-Cav3.2<sup>1569-1589</sup>-III-IV, Genemed synthesis, Houston)
- shRNK-USP5 (Thermo Scientific, Open Biosystems)
- 45% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin (Santa Cruz Biotech, SAD)

**Sistemska primena.** Za intraperitonealnu primenu, 3 $\beta$ -OH je rastvoren u 25% rastvoru 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina. Za pripremanje ovog rastvora, 45% rastvor 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina razblažen je do dobijanja 25% rastvora pomoću sterilne vode. Rastvaranje 3 $\beta$ -OH u 25% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinu se odvijalo u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 60 minuta. Intraperitonealne injekcije su primenjene u volumenu od 10 mL/kg telesne mase pacova.

**Lokalna primena.** U *in vivo* eksperimentima, TTA-P2, 3 $\beta$ -OH, *ent*-3 $\beta$ -OH i epipregnanolon su suspendovani u 15% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrinu. 15% rastvor 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina dobijen je razblaživanjem 45% rastvora 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina u fiziološkom rastvoru kome je pH podešen na 7,4. Suspenzije su homogenizovane na vorteks-mešalici 10 minuta, a potom u ultrazvučnom kupatilu još 60 minuta. Tat III-IV peptid i shRNK-USP5 su rastvoreni u sterilnoj vodi. TTA-P2, 3 $\beta$ -OH, *ent*-3 $\beta$ -OH, epipregnanolon, tat III-IV peptid i shRNK-USP5 su primenjeni intratekalno. Dodatno je 3 $\beta$ -OH primenjen i intraplantarno u pacova u zadnju šapu. Rastvori supstanci su pripremani neposredno pred početak eksperimenta.

**Intratekalna primena.** Intratekalna primena omogućava da primenjene supstance ispoljavaju svoje efekte na spinalnom nivou, i predstavlja uobičajen put primene anestetika i analgetika u kliničkoj praksi (Bennett i sar., 2000). Intratekalno aplikovanje lekova je poseban vid lokalne primene, koji je sproveden tako što su životinje anestezirane izofluranom (2,5% za uvođenje u anesteziju i 2,5% za održavanje anestezije), nakon čega je životinjama obrijana dlaka sa lumbalnog dela leđa, i taj region dezinfikovao povidon-jodom i 70%-tnim alkoholom naizmenično tri puta. Nakon toga, životinji je ispod abdomena podmetnut jastuk od gaze kako bi se lumbalni deo izdigao, te trnasti nastavak L<sub>4</sub> ili L<sub>5</sub> pršljena postao palpabilan. Za intratekalnu aplikaciju, korišćeni su insulinski špricci sa iglom od 28 G za pacove i



30 G za miševе. Injektovani volumen u pacova je bio 50  $\mu\text{L}$ , a u miševa 10  $\mu\text{L}$ . Injekcije su date u subarahnoidni prostor lumbalnog regiona između L<sub>4</sub> i L<sub>5</sub> ili L<sub>5</sub> i L<sub>6</sub>. Trzaj repa životinje je smatran pokazateljem da je igla na pravom mestu, tj. u subarahnoidnom prostoru, te da se ispitivana supstanca može injektovati. Dužina injektovanja obično je trajala oko jedan minut.

**Intraplantarna primena.** Intraplantarna primena omogućava ispitivanje efekata supstanci na lokalnom perifernom nivou. Pomoću igle od 28 G rastvor supstance se injektuje u plantarnu površinu zadnje šape pacova u volumenu od 100  $\mu\text{L}$ .

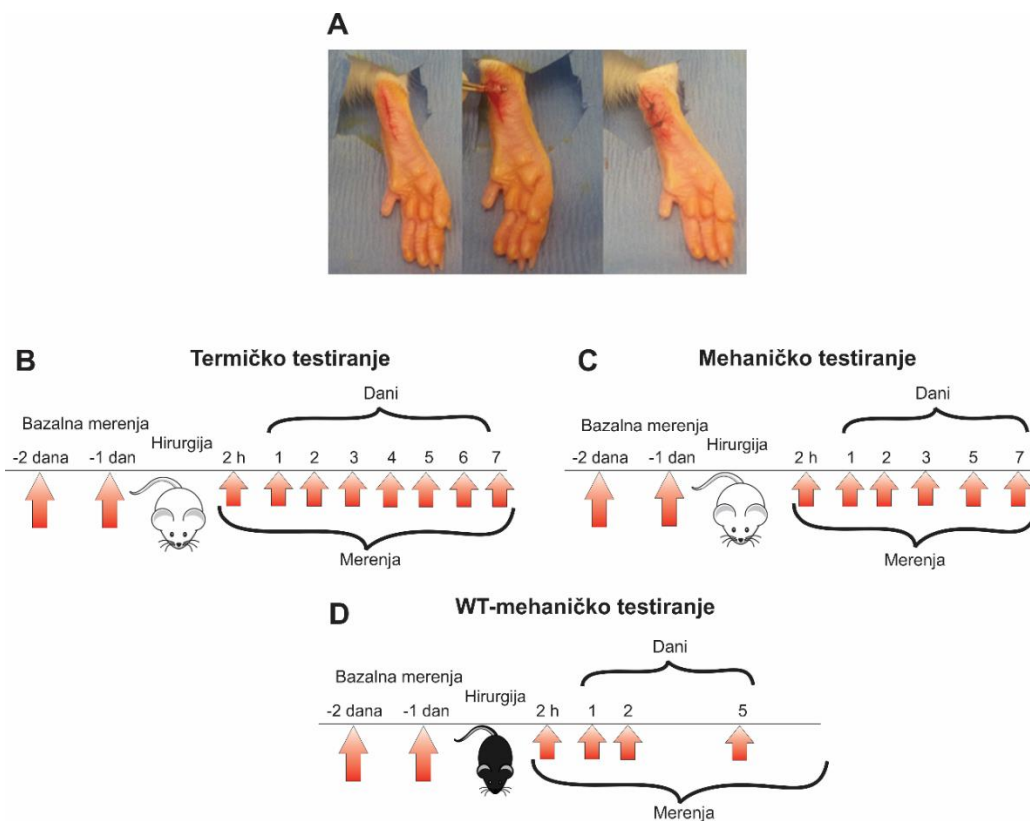
### 3. Eksperimentalni model bola

U cilju pretkliničkog ispitivanja uloge kalcijumovih kanala T-tipa u akutnom somatskom bolu, kao i analgetičkog efekta antagonista ovih kanala, korišćen je postincizioni model bola. Nakon izazivanja hirurške povrede dolazi do promena u bolnom putu, koje se mogu registrovati promenama u odgovoru životinja na bolni stimulus u nociceptivnim testovima (izmicanje šape pred termičkim ili mehaničkim stimulusom). Isti testovi su korišćeni za utvrđivanje da li ispitivana supstanca umanjuje nociceptivni odgovor životinje na štetni stimulus (noksu).

#### 3.1. Model somatskog akutnog bola – postincizioni bol u pacova i miševa

Koristili smo model postincizionog bola izveden po metodi koju su prvobitno ustanovili Brennan i sar. (1997) za pacove i za miševе Pogatzki i Raja (2003). Životinje su prvo anestetizirane izofluranom (2,5% za uvođenje u anesteziju i održavanje anestezije), nakon čega je anestetiziranoj životinji uzdužno incizirana plantarna površina zadnje šape sečivom br. 11, u dužini od 1 cm u pacova i aproksimativno 5–6 mm kod miša. Nakon zaustavljanja krvarenja, inciziran je uzdužno i plantarni mišić do potpunog razdvajanja mišićnih vlakana (Slika 13A). Nakon zaustavljanja krvarenja, rana je zašivena pomoću dva šava najlonskim koncem (debljine 5–0 sa iglom FS–2 sa obrnutim sečivom za pacove, i debljine 8–0 sa oftalmičkom iglom TG175–8 za miševе). Životinje su nakon hirurške intervencije vraćene u kavez da se oporave. Već 2 h nakon operacije javlja se bolna

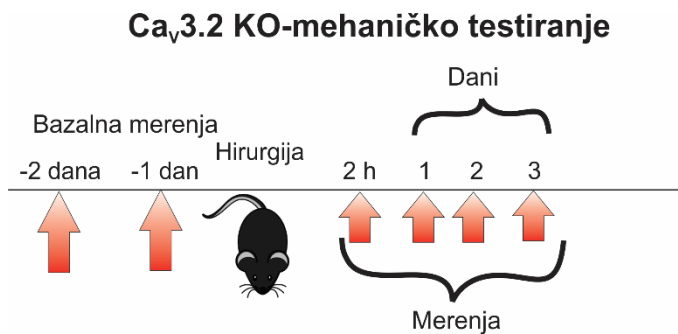
hiperosetljivost (hiperalgezija). Stabilna termička i mehanička hiperalgezija praćene su u pacova, i to dva sata, prvog, drugog, trećeg, četvrtog, petog, šestog i sedmog dana u testu termičke (Slika 13B), odnosno dva sata, prvog, drugog, trećeg, petog i sedmog dana u testu mehaničke (Slika 13C) osetljivosti. U WT miševa je takođe praćen razvoj postincizione mehaničke hiperalgezije i to dva sata, prvog, drugog i petog dana (Slika 13D). Najveći intenzitet bola postignut je tokom prvog i drugog dana od incizije. Postincizioni model pokazuje primarnu hiperalgeziiju – preosetljivost u regionu uz samu povredu, koja traje i do 7 dana. Primarna hiperalgezija predstavlja proces senzitivacije perifernih nociceptora najčešće pod uticajem medijatora inflamacije, usled čega se podstiče bolna transmisija duž perifernih puteva bola.



**Slika 13.** Sprovođenje hirurške incizije u pacova i miševa. **(A)** Fotografija šape pacova tokom incizione hirurgije: s leva na desno prikazano je zasecanje kože i potkožnog tkiva, potom podizanje plantarnog mišića nakon čega se vrši uzdužno zasecanje mišića, i na kraju je prikazana rana nakon ušivanja. **(B)** Eksperimentalni protokol za ispitivanje razvoja termičke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova. **(C)** Eksperimentalni protokol za ispitivanje razvoja mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova. **(D)** Eksperimentalni protokol za ispitivanje razvoja mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u WT miševa.

### 3.1.1. Ispitivanje uloge T-kanala u razvoju postincizionog bola primenom miševa kod kojih je izbačen gen za Cav3.2 T-kanal

U cilju ispitivanja uloge T-kanala u razvoju postincizionog bola, korišćeni su genetski modifikovani miševi kod kojih je izbačen gen za Cav3.2 T-kanal (tzv. Cav3.2 KO). Kao kontrolna grupa korišćene su ženke normalnog (WT) soja (C57BL/6J), koje su bile podvrgnute istom eksperimentalnom protokolu. Adultne ženke WT soja (Slika 13D), kao i ženke Cav3.2 KO soja (Slika 14), su podvrgnute hirurškoj inciziji, nakon čega je praćen razvoj postincizione hiperalgezije u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa dva sata, kao i prvog, drugog i petog dana kod WT (Slika 13D), odnosno dva sata, prvog, drugog i trećeg dana nakon incizije kod Cav3.2 KO miševa (Slika 14).



**Slika 14.** Eksperimentalni protokol za ispitivanje razvoja postincizionog bola kod Cav3.2 KO miševa.

## 4. Bihevioralni testovi

### 4.1. Testiranje mehaničke hiperalgezije u pacova i miševa

Za utvrđivanje mehaničke hiperalgezije nakon incizije, kao i za ispitivanje uticaja različitih tretmana na hiperalgeziiju, korišćen je test izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa (von Frey test; Deuis i sar., 2017). U ovom testu mehanički bolni stimulus aplikuje se pomoću čvrstog metalnog filameta elektronskog von Frey aparata (Ugo Basile, Italija). Metoda se zasniva na merenju maksimalnog intenziteta pritiska na plantarnu površinu šape (intenzitet pritiska eng. *paw withdrawal response* – *PWR*), izraženog u gramima, koji je potreban da se kod životinje dostigne prag mehaničke osetljivosti. Životinje su tokom eksperimenta smeštene u kutijama od pleksiglasa na rešetkastoj površini. Filament je kroz rešetkastu podlogu dovođen u kontakt sa plantarnom površinom šape pacova ili

miševa. Postepeno je povećavan intenzitet pritiska filameta na šapu, do pojave naglog povlačenja šape životinje, usled toga što je stimulus postao bolan. Povlačenje šape automatski je zaustavljalo merenje i očitavan je maksimalni intenzitet pritiska aplikovanog na šapu.

Životinje (pacovi i miševi) su prvo navikavane tokom dva uzastopna dana na uslove eksperimenta, kao što je boravak u kutijama od pleksiglasa na rešetkastoj površini, kao i boravak u bihevioralnoj sobi vivarijuma. Tokom ovog perioda, vršeno je merenje bazalnih vrednosti pritiska koje životinja (pre incizije šape) može da izdrži. Nakon bazalnog-kontrolnog merenja, izvedena je hirurška incizija, nakon čega je merena hiperalgezija, sa ili bez primene tretmana i/ili rastvarača u različitim vremenskim tačkama. U svakoj vremenskoj tački merenja mehaničke i termičke hiperalgezije su izvršene na isti način, u triplikatu za svaku šapu na svakoj životinji. Pojedinačne vrednosti za svaku životinju, u svakoj vremenskoj tački, dobijene su izračunavanjem prosečne vrednosti iz pomenuta tri merenja.

#### **4.2. Testiranje termičke hiperalgezije u pacova**

Za testiranje razvoja termičke hiperalgezije nakon incizije, kao i za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta ispitivanih supstanci, korišćen je test izmicanja šape pod toplotnim stimulusom (Hargreaves-ov test) (Allen i Yaksh, 2004; Le Bars, 2001). Test je izveden primenom toplotnog stimulusa na plantarnu površinu šape pacova. Metoda se zasniva na merenju reakcionog vremena u sekundama koje je potrebno da se kod životinje dostigne prag osetljivosti na toplotni stimulus (reakciono vreme eng. „*paw withdrawal latency*” – *PWL*). Aparat proizveden u laboratoriji prof. Dr Tonija Jakša (Univerzitet u Kaliforniji – San Diego) sastoji se iz pokretnog nosača koji sadrži projektorsku sijalicu koja emituje svetlost visokog toplotnog intenziteta. Ručica sa toplotnim izvorom je pomična i pozicionira se ispod staklene površine koja se zagreva, a na kojoj su smešteni pacovi u kutijama od pleksiglasa.

Pacovi su najpre trenirani dva dana kako bi se utvrdile bazalne vrednosti reakcionog vremena. Potom su nakon izvršene incizije i/ili primenjenog tretmana, izvršena merenja eksperimentalnih reakcionih vremena pod toplotnim stimulusom. Ručica sa izvorom toplotnog stimulusa je pozicionirana ispod plantarne površine

šape i aparat uključen pritiskom na dugme, čime se aktiviraju i izvor svetlosti i štoperica. Pojedinačne vrednosti za svaku životinju, u svakoj vremenskoj tački, dobijene su izračunavanjem prosečne vrednosti iz pomenuta tri merenja. U slučaju da životinja ne izmakne šapu u roku od 20 s, automatski se zaustavlja emitovanje toplote iz izvora. Intenzitet toplotnog stimulusa je tako podešen, da su bazalne vrednosti pre incizije u zdravih pacova između 10 i 12 s.

#### **4.3. Testovi za procenu motorne spretnosti u pacova**

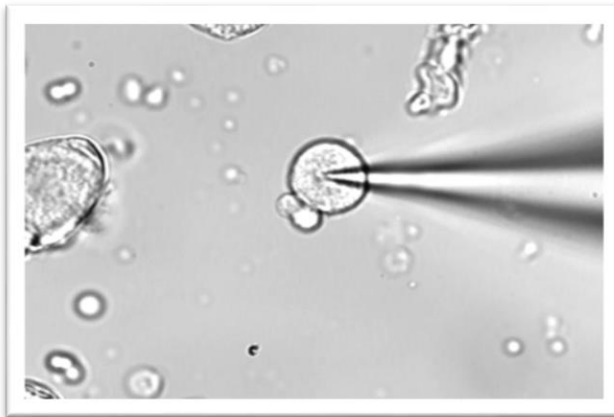
Za procenu uticaja tretmana na motornu spretnost pacova korišćen je set bihejvioralnih testova (Wozniak i sar., 1990):

- Ravna površina pod uglom: pacov je stavljen na rešetkastu površinu koja je postavljena pod uglom od 60° glavom nadole. Očekivano je da životinja ne padne sa ploče u roku od 120 s.
- Uzdignuta platforma: pacov je postavljen na platformu (7,6 cm x 12,5 cm) podignutu 61 cm od podloge, i mereno je vreme provedeno na platformi. Očekivano je da životinja izdrži 120 s na ploči, u dva testiranja.
- Hodanje po gredi: Pacov je postavljen na gredu koja je 3 cm široka i posmatrano je koliko vremena može provesti na njoj bez padanja. Očekivano je da životinja može izdržati 60 s tokom dva testiranja.

Ovi testovi su korišćeni da bi se utvrdilo da li najveće antinociceptivne/antihiperlgezijske doze TTA-P2 i 3 $\beta$ -OH, antagonista T-kalcijumovih kanala, testirane u zdravih pacova, narušavaju motornu spretnost ovih eksperimentalnih životinja, što bi moglo da interferira sa rezultatima iz nociceptivnih testova/modela. S obzirom da su pacovi korišćeni za ispitivanje antinociceptivnog efekta antagonista T-kalcijumovih kanala, testovi za procenu motorne spretnosti su izvedeni samo na ovim životinjama. Pre testiranja, životinje su trenirane u sva tri testa, u kojima je bilo potrebno da svaka životinja: 1) izdrži 120 s na ravnoj površini pod uglom; 2) izdrži na uzdignutoj platformi 120 s u dva testiranja; 3) ostane na gredi 60 s, u dva testiranja.

## 5. Elektrofiziološko ispitivanje uloge T-kanala u postincizionom bolu

Za elektrofiziološka ispitivanja neuronske ekscitabilnosti i karakteristika T-kalcijumovih kanala, upotrebljena je metoda nametnute voltaže ili struje na deliću membrane (eng. *patch-clamp*), pomoću koje se ispituju struje koje potiču od različitih jona u ekscitabilnim ćelijama, kao što su neuroni. Ovu tehniku su razvili Ervin Neher i Bert Sakman sedamdesetih godina prošlog veka i za ovo otkriće su dobili Nobelovu nagradu iz oblasti Fiziologije i Medicine 1991. Tehnika se zasniva na formiranju kontakta (*patch*) između elektrode, rastvora smeštenih u šuplju staklenu pipetu i površine ćelijske membrane neurona (Slika 15). Nakon toga se primeni blagi vakuum, čime dolazi do uvlačenja ćelijske membrane u pipetu, usled čega se kreira mala pukotina u ćelijskoj membrani što omogućava mešanje unutarćelijskog sadržaja sa internim rastvorom u pipeti (*whole cell* tehnika). Na ovaj način je moguće ispitivati jonske struje koje potiču od različitih jonskih kanala duž cele ćelijske membrane.



**Slika 15.** Fotografija metode nametnute voltaže (*patch-clamp* tehnika) koja prikazuje mikropipetu kako dodiruje membranu tela senzornog neurona spinalnog gangliona.

Detekcija struja se vrši pomoću pojačivača signala koji detektuje signal u obliku napona (u voltima) i jačine struje (u amperima). Signali prikazani u okviru ove doktorske disertacije dobijeni su korišćenjem konkretne aparature u laboratoriji Dr. Todorovića prikazane na Slici 16.



**Slika 16.** Fotografija aparature korišćene za metodu nametnute voltaže koju smo koristili za snimanje promena u biofizičkim karakteristikama kalcijumovih kanala na disociranim telima senzornih neurona. Levo je prikazan invertni fluorescentni mikroskop Nikon za mikroskopiranje ćelija. Desno su prikazani pojačivač signala AxoPatch 200B, Digidata 1440A i kontrolor manipulatora Sutter Instruments (odozgo na dole).

*Patch-clamp* elektrofiziološkom tehnikom moguće je kontrolisati potencijal ćelijske membrane, te meriti jonske struje koje potiču od kanala koji se aktiviraju na tačno određenom potencijalu ćelijske membrane (tzv. *voltage-clamp*). Alternativno, moguće je kontrolisati i jačinu primenjene struje (tzv. *current-clamp*) na ćelijskoj membrani, usled čega se meri generisani akcioni potencijal tj. ćelijska ekscitabilnost.

Sadržaj rastvora u staklenoj pipeti odgovara intracelularnom sadržaju za potrebe snimanja struja u tzv. *whole cell* sistemu. Druga elektroda se zove referentna i ona je uronjena u ekstracelularni rastvor. Ova elektroda se koristi u cilju zatvaranja strujnog kola, koga čine elektroda u pipeti, ćelijska membrana (otpornik) i referentna elektroda.

Disocirana tela senzornih neurona spinalnih gangliona potrebna za elektrofiziološke eksperimente dobijena su *ex vivo* (Todorovic i Lingle, 1998). Nakon terminalne anestezije pacova izofluranom (5%), životinja je dekapitovana i izvršena je lateralna laminektomija od torakalnog ka lumbalnom regionu. Nakon ekscizije gangliona dorzalnih korenova L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> pršljenova, tkivo je inkubirano na 35 °C u Tajrodovom rastvoru (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glukoza i 10 mM

Hepes pufer, podešenog pH 7,4 pomoću NaOH) koji sadrži dispazu II (Roche, SAD) i kolagenazu H (Sigma-Aldrich, SAD) tokom sat vremena. Uloga ovih enzima je da izvrše digestiju tkiva koje okružuje tela senzornih neurona. Nakon toga, tkivo je trituirano u Tajrodovom rastvoru propuštanjem kroz otvor tri Pasterove pipete različitog promera, u cilju oslobađanja tela senzornih neurona od ostatka tkiva. Disocirana tela senzornih neurona dorzalnih gangliona su potom ostavljena na staklenim pločicama oko sat vremena kako bi se fiksirala za dno posude. Nakon toga, izvršeno je ispiranje tkiva koje se nije fiksiralo za dno, kako bi se izbeglo eventualno začepljenje staklene pipete. Elektrofiziološki eksperimenti su sprovedeni na disociranim senzornim neuronima spinalnih gangliona (eng. *dorsal root ganglion* – DRG) iz regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub> u zdravih i inciziranih pacova, u kome se nalaze tela senzornih neurona išijadikusa. Tkivo je prikupljeno u dve vremenske tačke (24 i 48 sati nakon incizije) i elektrofiziološka merenja su izvedena istog dana na sobnoj temperaturi.

### **5.1. Ispitivanje ekscitabilnosti tela senzornih neurona spinalnih gangliona u postincizionom modelu bola u pacova**

Kako bi se ispitivala ekscitabilnost ćelija nakon hirurške incizije, sniman je broj kao i režim okidanja akcionih potencijala senzornih neurona. Sva snimanja u tzv. *current-clamp* režimu izvedena su u Tajrodovom rastvoru, koji je korišćen kao spoljašnji rastvor koji imitira ekstracelularnu tečnost. Otpor ćelije ( $R_m$ ) i kapacitet membrane kao kondenzatora u strujnom kolu ( $C_m$ ) su detektovani preko pojačivača signala, nakon automatske korekcije za prolazni kapacitet. Gustina struje je preračunata tako što je jačina struje podeljena sa ćelijskim kapacitetom. Režim okidanja akcionih potencijala tela senzornih neurona dorzalnih gangliona je određen tako što je kroz staklenu pipetu primenjena serija depolarišućih strujnih pulseva u trajanju od 500 ms u inkrementima od po 10 pA, nakon čega je snimljeno spontano okidanje akcionih potencijala neurona.



### **5.1.1. Primena selektivnog blokatora T-kanala u ispitivanju ekscitabilnosti senzornih neurona gangliona dorzalnih korenova u postincizionom modelu bola u pacova**

Kako bismo ispitivali ulogu T-kanala u spontanoj ćelijskoj aktivnosti, primenili smo TTA-P2 u posudu sa disociranim ćelijama izolovanih iz pacova podvrnutih inciziji, a zatim smo merili promenu u frekvenci okidanja akcionih potencijala u odnosu na bazalne uslove.

### **5.2. Ispitivanje promena u biofizičkim parametrima koji karakterišu T-kanale na disociranim senzornim neuronima spinalnih gangliona u postincizionom bolu u pacova**

U cilju ispitivanja promena u biofizičkim parametrima T-kanala, snimane su kalcijumove struje koje potiču od ovih kanala i određivani su parametri kao što su krive zavisnosti struje i potencijala (I-V) tokom aktivacije i inaktivacije T-kanala, kao i gustina struje i vremenska konstanta ( $\tau$ ) koja određuje vreme potrebno za otvaranje/zatvaranje kanala. Kako bi se izolovale kalcijumske struje koje potiču isključivo od T-kanala, koristio se spoljašnji rastvor koji se sastoji od 152 mM tetraetilamonijumhlorida (TEA)-Cl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> i 10 mM Hepes. Tetraetil amonijum-hidroksid (TEA-OH) je korišćen za podešavanje pH na 7,4. Kako bi se što bolje izolovale struje koje potiču od protoka kalcijuma kroz T-kanale, ali i smanjile struje koje potiču kalcijumovih kanale koji se aktiviraju pri višim potencijalima, koristili smo unutrašnji rastvor koji sadrži 135 mM tetrametilamonijum hidroksid, 40 mM HEPES, 10 mM EGTA i 2 mM MgCl<sub>2</sub>, a pH 7,2 je podešen sa HF (Todorovic i Lingle, 1998).

Krive zavisnosti struje i potencijala (I-V) za aktivaciju T-kanala generisane su tako što je potencijal ćelijske membrane održavan na -90 mV, pri kome je ćelija hiperpolarisana (tzv. *holding potential*), a T-kanali se nalaze u zatvorenom (deinaktivisanom) stanju. Nakon toga se primenjuje postepeno povećanje voltaže u inkrementima od po 5 mV, čime se potencijal ćelijske membrane dovodi do vrednosti na kojima su T-kanali otvoreni i aktivni (-75 do -30 mV). Krive inaktivacije

T-kanala generisane su tako što je potencijal ćelijske membrane variran od -90 mV ka potencijalima u intervalu od -110 do -50 mV sa voltažnim inkrementima od 5 mV, u cilju otvaranja što više T-kanala. Nakon toga, kanali su naglo inaktivirani promenom potencijala na -30 mV.

Kako bismo ispitali da li dolazi do promena u deaktivaciji T-kanala u postincizionom modelu bola, snimali smo struje koje zaostaju nakon što je T-kanal deaktivisan (tzv. *tail currents*). Ove struje su snimane u intervalu potencijala ćelijske membrane od -160 mV do -60 mV, u inkrementima od po 10 mV, nakon što je ćelija depolarisana tokom 8 ms na -30 mV.

Zavisnost aktivacije i inaktivacije od potencijala prikazana je pomoću Boltzmanove distribucije i izračunata je na osnovu sledećih formula:

Aktivacija:  $G(V) = G_{\max} / (1 + \exp[-(V - V_{50})/k])$

Inaktivacija:  $I(V) = I_{\max} / (1 + \exp[(V - V_{50})/k])$ .

U navedenim formulama,  $G_{\max}$  predstavlja maksimalnu provodljivost ćelije (izračunava se tako što se podeli amplituda struje sa potencijalom),  $I_{\max}$  predstavlja maksimalnu amplitudu struje,  $V_{50}$  predstavlja potencijal na kome se 50% kanala nalazi u aktivisanom ili inaktivisanom stanju, dok  $k$  predstavlja nagib distribucije.

## 6. *In vitro* utvrđivanje promena u ekspresiji T-kanala u postincizionom bolu u pacova

### 6.1. Ispitivanje ekspresije T-kanala pomoću kvantitativne PCR u realnom vremenu (qRT-PCR) u postincizionom bolu u pacova

Promena u ekspresiji iRNK za T-kanale utvrđena je metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu (qRT-PCR, eng. *quantitative real time polymerase chain reaction*). Slično ostalim RT-PCR pristupima, metoda obuhvata najpre korak reverzne transkripcije u kome se ukupna informaciona RNK (iRNK) prevodi u komplementarnu DNK (cDNK), a potom sledi korak umnožavanja odnosno amplifikacije dela cDNK od interesa. Kod PCR-a u realnom vremenu u svakom

ciklusu PCR-a se prati zastupljenost sintetisanog produkta što omogućava pouzdanu kvantifikaciju nivoa ekspresije ispitivanog gena.

### **6.1.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija (RT)**

Uzorci tkiva za izolaciju RNK su dobijeni tako što je životinja terminalno anestezirana izofluranom (5%) u plastičnoj posudi za anesteziju, nakon čega je dekapitovana. Nakon dekapitacije, sa lumbalnog regiona trupa životinji je prvo isečena koža, a potom lateralno duž lumbalnog stuba od lumbalnog ka torakalnom regionu se iseca potkožno tkivo i mišići. Potom je poprečno presečen kičmeni stub na nivou poslednjeg rebra, i nastavljeno sa sečenjem longitudinalno sa strane lumbalnog stuba ka lumbalnom regionu. U nivou sakruma životinje, kičmeni stub je ponovo poprečno presečen i tako izolovano tkivo prebačeno u Petrijevu posudu sa ledenim fiziološkim rastvorom koji je puferovan fosfatnim puferom na pH 7,4. Kičmena moždina je pažljivo odvojena od ostatka tkiva, i dorzalni ganglioni regiona L<sub>4</sub> do L<sub>6</sub> pažljivo odstranjeni i preneti u epruvetu, koja je potom prebačena u tečni azot kako bi se tkivo momentalno zamrzlo. Nakon toga je tkivo (50–70 mg) spinalnih gangliona homogenizovano pomoću homogenizera u QIAzol reagensu (Qiagen, SAD) po specifikaciji proizvođača. Nakon homogenizacije, iRNK je izolovana iz uzoraka tkiva uz pomoć RNeasy Microarray Tissue Mini Kit-a sa reagensom za liziranje. Za dobijanje cDNK iz iRNK (postupak reverzne transkripcije), korišćeni su komercijalno dostupni reagensi iz seta RT2 First Strand (Qiagen, SAD). Kako bi se eliminisala kontaminacija koja potiče od DNK uzorka, dodavao se miks regenerasa za eliminaciju DNK, i uzorak se inkubirao na 42 °C 5 minuta, nakon čega je uzorak prenet na led, kako bi se hladio tokom 1 minuta. Nakon dodavanja miksa za reverznu transkripciju, uzorak je inkubiran tačno 15 minuta na 42 °C, nakon čega je reakcija zaustavljena inkubacijom uzorka na 95 °C tokom 5 minuta. Nakon toga su uzorci prebačeni na led.

### **6.1.2. qRT-PCR**

Za analizu zastupljenosti iRNK koja odgovara CACNA genskim transkriptima za sintezu T-kanala, uzorci pripremljeni na prethodno pomenut način su inkubirani sa

komercijalno dostupnom RT2 SYBR Green qPCR Mastermix reakcionom smešom i prajmerima (Qiagen, SAD). Za analizu uzoraka korišćen je aparat BioRad Icyler CFX Connect sa pločicama od 96 bunarića, sa sledećim programom: 1 ciklus od 10 minuta na 95 °C, a potom 40 ciklusa sa naizmenično 15 sekundi na 95 °C, pa potom 1 minut na 60 °C. Kataloški brojevi za informacije o sekvencama prajmera za sva tri podtipa T-kanala su sledeće: CACNA1G NM\_031601.4; CACNA1H NM\_153814.2; CACNA1I NM\_020084.3), a za interni standard ciklofilin Ppid NM\_001004279.1.

Svaki uzorak je obrađen u triplikatu, a srednja Ct vrednost (*Cycle threshold* predstavlja nivo ekspresije gena) je korišćena za dalju analizu. Zarad korekcije internih razlika u efikasnosti amplifikacije svaki uzorak je normalizovan u odnosu na nivo ekspresije odgovarajućeg internog stanadarda (ciklofilin). Kvantifikacija je urađena  $2^{-\Delta Ct}$  metodom (Pfaffl, 2001).

## **6.2. Ispitivanje nivoa proteina T-kanala semikvantitativnom analizom imunoblotova u postincizionom bolu u pacova**

Imunoblot ili Western blot tehnika se koristi za detekciju i određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorku. Detekcija proteina se vrši tako što se proteini prvo elektroforetski razdvoje na osnovu njihove molekulske mase, a potom se detektuju na bazi specifične reakcije antigen–antitelo. Primenjeno primarno antitelo je visoko–specifično za odgovarajući epitop na proteinu od interesa. Sekundarno antitelo je obično poliklonsko, vezuje se za primarno antitelo, i obeleženo je molekulima koji su neophodni za detekciju, kao što su enzimi, fluorofore ili boje. Detekcija nivoa proteina vrši se indirektno i zavisi od tipa primenjenog sekundarnog antitela. Primena sekundarnih antitela obeleženih enzimima iziskuje upotrebu supstrata. Enzim u interakciji sa odgovarajućim supstratom obično daje proizvod određene boje koji se detektuje spektrofotometrijski. Intenzitet fluorescence se koristi za detekciju i kvantifikaciju proteina, kada se kao sekundarna antitela koriste ona koja su obeležena specifičnim fluoroforama. Kako bi se ispitala promena u nivou zastupljenosti (ekspresije) ukupnog proteina koji sačinjava T-kanale na ćelijskoj membrani, kao i u samim

ćelijskim telima, primarnih senzornih neurona spinalnih gangliona, primenjena je pomenuta metoda imunoblotova.

### **6.2.1. Izolovanje ukupnih ćelijskih proteina iz spinalnih gangliona regiona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> pacova**

Ekscizirani ganglioni lumbalnog dela L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> kontrolnih i inciziranih pacova, čuvani su u epruvetama od 1,5 mL zaleđeni na -80 °C, potom je takvo tkivo usitnjeno specijalnim tučkom za mikroepruvete i homogenizovano u 5 volumena RIPA pufera (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Na-deoksiholat; 0,1% SDS) sa rastvorenim proteaznim inhibitorima (Pierce tablete proteaznih inhibitora, Thermo Scientific, SAD). Kako bi se oslobodila i membranska frakcija proteina, uzorci su prošli tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, potom su lizirani u ultrazvučnom kupatilu i konačno centrifugirani 30 minuta na 14000 obrtaja u minuti (eng. *revolutions per minute* – rpm). Dobijeni supernatanti koji predstavljaju ukupne ćelijske proteinske ekstrakte dorzalnih spinalnih gangliona su čuvani na -80 °C do dalje analize. Ovakva priprema uzorka obezbeđuje određivanje ukupnih proteina, bez mogućnosti određivanja samo membranske frakcije, s obzirom da centrifugiranjem na malom broju obrtaja nije moguće razdvojiti membransku frakciju od ostatka ćelijskih struktura.

### **6.2.2. Elektrotransfer proteina iz uzoraka tkiva pacova**

Nakon centrifugiranja, supernatant je izdvojen u posebne čiste epruvete i određena je koncentracija ukupnih proteina BCA metodom (metoda sa bicinkoninskom kiselinom). Ova metoda se zasniva na redukciji kupri (Cu<sup>2+</sup>) jona do kupro (Cu<sup>+</sup>) jona proteinom, pri čemu je količina kupro jona koji nastaju direktno proporcionalna ukupnoj količini proteina. Bicinkoninska kiselina se dalje koristi za detekciju koncentracije Cu<sup>+</sup> jona (razvija se boja čiji se intezitet određuje kolorimetrijski). Koncentracije proteina u nepoznatim uzorcima dobijaju se očitavanjem sa standardne krive koja je generisana očitavanjem signala za rastuće poznate koncentracije proteinskog standarda. Nakon određivanja koncentracije proteina, uzorci su inkubirani u 2X LaemmLi puferu 1 sat na 24 °C, potom su naneti na tris-glicin poliakrilamidski gel sa gradijentom (4-20%) i elektroforetski

razdvojeni u puferu za elektroforezu standardnog sastava (192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3; 0,1% SDS) pod konstantnim naponom od 120 V, dok front boje nije stigao do kraja gela. Za prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF membranu, gel je najpre ekvilibrisan 15 minuta u puferu za transfer (20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3), a elektrotransfer proteina je vršen preko noći, pod konstantnim naponom od 120 V i na 2–8 °C.

### ***6.2.3. Imunološka detekcija proteina iz uzoraka tkiva pacova specifičnim antitelima – imunoblot metoda***

Po završenom transferu membrane su bojene bojom Ponceau-S (1% boja Ponceau-S; 5% glacijalna sirćetna kiselina), u cilju dobijanja vizuelne potvrde uspešnosti transfera. Membrane su zatim odbojene ispiranjem u destilovanoj vodi i potom osušene na sobnoj temperaturi. Do daljeg rada su skladištene na 4 °C. Membrane su dalje blokirane 1 h u 5% rastvoru nemasnog mLeke u TBST puferu (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,1% Tween, pH 7,5) na sobnoj temperaturi, i inkubirane preko noći (4 °C) sa primarnim antitelom (anti-Cav3.2, 1:3.000, Alomone Laboratories; GAPDH, 1:15.000, Millipore, SAD), razblaženim u 2,5% mLeku u TBST. Nakon toga je PVDF membrana isprana i inkubirana sa sekundarnim antitelom sa peroksidazom rena (1:15.000, Santa Cruz Biotechnology, SAD), koje je razblaženo u TBST (1 h; sobna temperatura). Ispiranje je ponovljeno da bi se uklonilo nevezano antitelo, nakon čega je signal razvijen uz upotrebu hemiluminiscentnog supstrata (Super Signal West Femto; Thermo Scientific, SAD).

### ***6.2.4. Semikvantitativna analiza imunoblotova uzoraka tkiva pacova***

Intenzitet imuno signala na skeniranim membranama određen je denzitometrijskom metodom pomoću aparata GBOX (Chemi XR5; Syngene, SAD) i analiziran uz pomoć programa ImageQuant 5.0 (GE Healthcare; Life sciences, SAD). GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza) je korišćen kao interna kontrola za normalizaciju sadržaja proteina T-kanala u svim ispitivanim uzorcima.

### **6.3. Ispitivanje ekspresije membranske frakcije imunocitohemijskim obeležavanjem T-kanala na membranama disociranih senzornih neurona spinalnih gangliona pacova u postincizionom bolu**

Imunobojenje je tehnika koja podrazumeva upotrebu antitela za detekciju specifičnog proteina od interesa, i koristi se u histologiji, ćelijskoj i molekularnoj biologiji. Imunocitohemija se sprovodi na izolovanim ćelijama, ili ćelijskim kulturama, i zasniva se na obeležavanju proteina od interesa primarnim antitelom, i daljom primenom sekundarnog antitela obeleženog flurohromom (npr. Alexa Fluor), koji je neophodan za detekciju proteina pomoću konfokalnog fluorescentnog mikroskopa.

Za imunocitohemijsko obeležavanje T-kalcijumovih kanala, spinalne ganglije regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub> su prikupljene nakon incizije i disocijacija pojedinačnih tela senzornih neurona je izvršena na isti način kao i za elektrofiziološka ispitivanja. Tako pripremljen rastvor ćelija je nanet na staklene pokrovne pločice smeštene u bunarićima za ćelijsku kulturu. U cilju imobilisanja preparata, ćelije su sušene 1 do 3 sata u inkubatoru na 37 °C. Nakon toga ćelije su fiksirane na pokrovnim pločicama upotrebom paraformaldehida (4%) u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,4 na 4 °C 10 minuta. Potom su ćelije ispirane sa fosfatnim puferom sa 0,01% Triton X 100 detegentom (PBSTx), tri puta po 5 minuta. Blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela je izvršeno inkubiranjem ćelija sa 5% rastvorom normalnog seruma u PBSTx puferu 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se izvršila inkubacija sa primarnim antitelom (1:500 anti-Cav3.2 antitelo Alomone Labs, ACC-025, SAD) preko noći na 2 to 8 °C. Ćelije su zatim ispirane fosfatnim puferom tri puta po 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja na prethodno pomenuti način, izvršena je inkubacija preko noći sa drugim primarnim antitelom za referentni protein kadherin (anti-kadherin, 1:200 ab22744, Abcam, SAD). Nakon još jednog ispiranja na već opisan način, ćelije su se inkubirale sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (1:2000, Alexa Fluor 488 A27034, Invitrogen, SAD) dva sata na sobnoj temperaturi, potom ponovo ispirale, da bi se konačno inkubirale sa drugim sekundarnim antitelom za drugi protein na isti način (1:2000, Alexa Fluor 568 A11004, Invitrogen, SAD). Nakon ispiranja, ćelije su prepokrivene na staklenim

pokrovnim pločicama pomoću medijuma za detekciju fluorescence koji sadrži DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Vectashield, SAD) za obeležavanje jedara ćelija i slikaju pomoću konfokalnog mikroskopa Olympus FV1000 FCS/RCIS.

### **6.3.1. Određivanje intenziteta fluorescence**

Dobijene fotomikrografije su analizirane pomoću softvera ImageJ (Nacionalni instituti za zdravlje, SAD). Za svaku pojedinačnu ćeliju, površina koja odgovara membranskoj frakciji ćelije je utvrđena na osnovu signala za protein kadherin, koji se eksprimira samo na ćelijskoj membrani. Intenzitet fluorescence membranske frakcije T-kalcijumovih kanala ipsi i kontralateralnih spinalnih gangliona, normalizovan je prema signalu kadherina kao referentnog proteina i tako dobijena gustina kanala po jedinici površine membrane je dalje analizirana.

## **7. Ispitivanje uloge deubikvitinacije T-kanala enzimom USP5 u razvoju hiperalgezije nakon incizije u pacova i miševa**

### **7.1. Ispitivanje nivoa USP5 proteina semikvantitativnom analizom imunoblotova u postincizionom bolu u miševa**

U cilju određivanja uloge deubikvitinacije T-kanala u postincizionom modelu bola, ispitivali smo promene u nivou USP5 enzima uz pomoć imunoblot tehnike na proteinima iz uzoraka spinalnih gangliona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> u miševa.

#### **7.1.1. Izolovanje ukupnih ćelijskih ekstrakata iz spinalnih gangliona lumbalnog regiona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> miševa**

U cilju ispitivanja koncentracije USP5 enzima nakon incizije, prikupljeni su ipsi i kontralateralni spinalni ganglioni C57BL/6J inciziranih miševa dva dana nakon incizije. Kontralateralni ganglioni su korišćeni kao kontrola bazalnog nivoa USP5 enzima, s obzirom da kontralateralna šapa miša nije bila incizirana. Ekscizirani ganglioni su zaleđeni na -80 °C, nakon čega je tkivo usitnjeno specijalnim tučkom i



homogenizovano u RIPA puferu (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Na-deoksiholat; 0,1% SDS) sa proteaznim inhibitorima.

### **7.1.2. Imunoprecipitacija USP5 enzima iz uzorka**

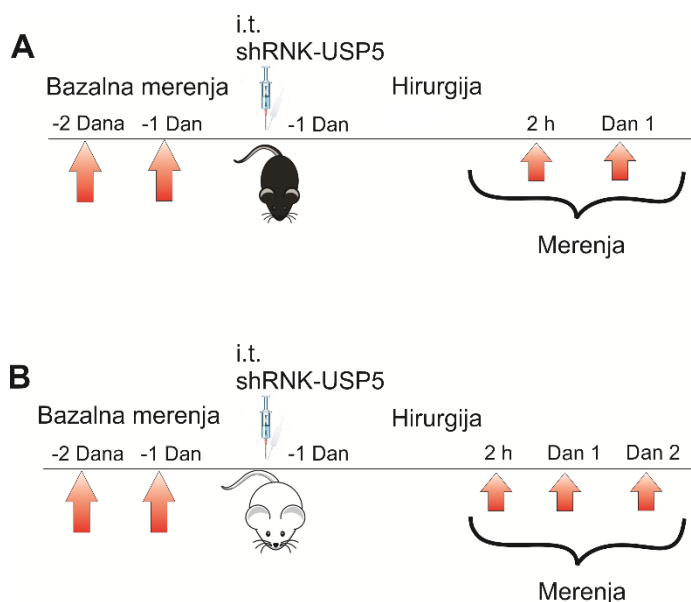
Imunoprecipitacija podrazumeva korišćenje specifičnog antitela u uzorku koje vezuje ciljani protein, nakon čega se kompleks protein-antitelo izoluje i dalje analizira imunoblot metodom. Na ovaj način, uzorak je prečišćen od nečistoća i obogaćena je ukupna zastupljenost ciljanog proteina u uzorku. Ukupni ćelijski ekstrakti iz prethodnog koraka su dalje lizirani i homogenizovani u ultrazvučnom kupatilu i centrifugirani na 13000 rpm tokom 15 minuta na 4 °C. Nakon toga, supernatanti su preliveni u nove epruvete i rastvoreni proteini inkubirani sa 50 µL perlica Protein G/A i 1 µg anti-USP5 antitela preko noći na 4 °C. Imunoprecipitati USP5 proteina su isprani dva puta u puferu (500 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5). Nakon inkubacije uzorka sa LaemmLi puferom, elektroforeza i transfer na PVDF membranu su izvršeni na već opisan način. Kao kontrolu podjednagog nanošenja proteinskog uzorka iz svih životinja, korišćena je zastupljenost α-tubulina. Korišćena su sledeća antitela su: mišje anti-alfa tubulin (1:2000; Abcam) i zečje anti-USP5 (1:500; ProteinTech Group, Inc.).

### **7.1.3. Semikvantitativna analiza imunoblotova uzoraka tkiva miševa**

Intenzitet imuno signala na dobijenim membranama određen je denzitometrijskom, kvantitativnom analizom korišćenjem programskog paketa Quantity OneBioRad. Dobijene vrednosti svakog uzorka normalizovane su najpre u odnosu na odgovarajuću endogenu kontrolu (alfa tubulin) čime su dobijene relativne vrednosti nivoa proteina. Potom su izračunate srednje vrednosti i standardna greška relativnih vrednosti za sve eksperimentalne grupe.

## 7.2. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta supresije deubikvitinacije T-kanala selektivnim smanjenjem ekspresije (tzv. *knock-down*) USP5 enzima u pacova i miševa

Za ispitivanje efekta spinalne i periferne supresije deubikvitinacije kalcijumovih kanala T-tipa na razvoj hiperalgezije nakon hirurške incizije, intratekalno je primenjena mala RNK oblika ukosnice (shRNK, eng. *small hairpin RNA*), koja sprečava produkciju RNK za USP5. Kako bi se ostvario njen efekat, shRNK-USP5 je primenjena 24 sata pre operacije, i nakon bazalnih merenja osetljivosti na mehanički stimulus (detaljan protokol prikazan na Slici 17). Hirurška incizija je izvedena na WT i Cav3.2 KO sojevima miševima (Slika 17A), kao i na pacovima (Slika 17B), a razvoj mehaničke hiperalgezije je praćen 2 sata i prvog dana kod miševa, odnosno dva sata, prvog i drugog dana kod pacova. U ovom eksperimentu, Cav3.2 KO miševi su korišćeni kako bi se pokazao izostanak efekta shRNK-USP5, čime bi se potvrdila selektivnost USP5 enzima samo za Cav3.2 kalcijumov kanal, koji je genetičkom manipulacijom izbačen u ovih miševa. Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre i.t aplikacije. Za svaki eksperiment su formirane grupe od 10-13 miševa, odnosno 7-8 pacova.



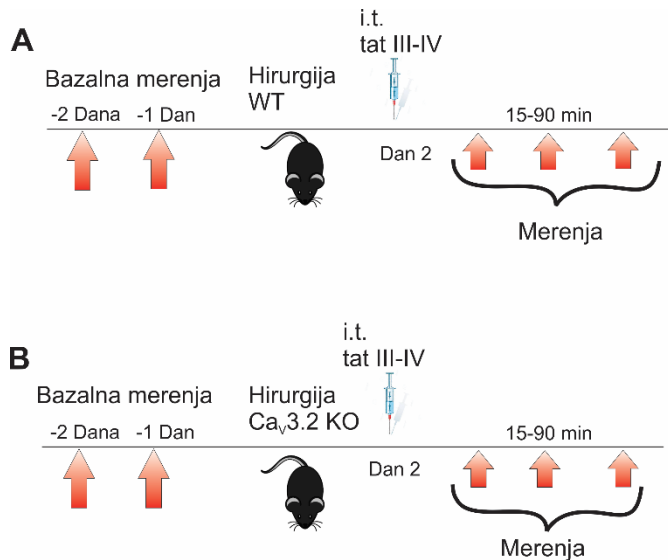
**Slika 17.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta intratekalno primenjene shRNK-USP5 u (A) WT i Cav3.2 KO miševa i (B) pacova nakon incizije.

### **7.3. Ispitivanje uticaja supresije deubikvitinacije selektivnim smanjenjem ekspresije (tzv. *knock-down*) USP5 enzima na funkcionalnost T-kanala u pacova**

Kako bi se ispitaio uticaj supresije deubikvitinacije na funkcionalnost T-kanala, shRNK-USP5 je primenjena intratekalno u pacova 24 sata pre incizije. Dva dana nakon incizije prikupljeni su spinalni ganglioni regiona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> na prethodno opisan način za *in vitro* ispitivanje gustine struja koje potiču od T-kanala u inaktivacionom protokolu. Priprema uzorka, kao i uslovi elektrofiziološkog ispitivanja, su izvršeni u skladu sa prethodno opisanim protokolom.

### **7.4. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta selektivne blokade veznog mesta USP5 enzima za ciljno mesto na T-kanalu primenom tat peptida u miševa**

Kako bi se ispitaio efekat sprečavanja deubikvitinacije, tj. olakšavanja ubikvitinacije T-kanala na postincizionu hiperalgeziju, u WT i Cav3.2 KO miševa je intratekalno primenjen tat peptid (tat III-IV), mali peptidni molekul koji se selektivno vezuje za mesto na USP5 enzimu i sprečava njegovo dalje vezivanje za III-IV petlju T-kanala. Dva dana nakon izvršene hirurške incizije, miševi su primili intratekalno tat III-IV peptid, a merenja mehaničke hiperalgezije su vršena 15, 30, 60 i 90 minuta nakon intratekalne injekcije (Slika 18A i 18B). Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre operacije. Za svaki eksperiment su formirane grupe od 6 miševa.

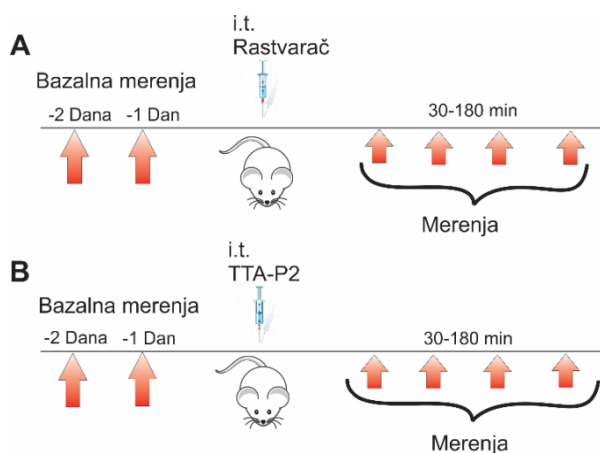


**Slika 18.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje anti-hiperalgezijskog efekta intratekalne primene tat III-IV peptida drugog dana nakon incizije kod **(A)** WT i **(B)** Ca<sub>v</sub>3.2 KO miševa.

## 8. Ispitivanje antinociceptivnog efekta antagonista T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova

### 8.1. Ispitivanje antinociceptivnog efekta selektivnog blokatora T-kanala TTA-P2 nakon lokalne intratekalne primene u zdravih pacova

Za utvrđivanje efektivnih antinociceptivnih doza TTA-P2 je primenjen intratekalno (i.t.) u zdravih pacova, nakon čega je meren antinociceptivni efekat u testu termičke i mehaničke nocicepcije. Test merenja vršena su 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta nakon i.t. injekcije rastvarača (15% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH podešen na 7,4) (Slika 19A) ili TTA-P2 (Slika 19B).



**Slika 19.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antinociceptivnog efekta intratekalno primenjenog rastvarača ili TTA-P2 u zdravih pacova. **(A)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antinociceptivnog efekta rastvarača u testovima termičke i mehaničke nocicepcije. **(B)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antinociceptivnog efekta TTA-P2 u testovima termičke i mehaničke nocicepcije.

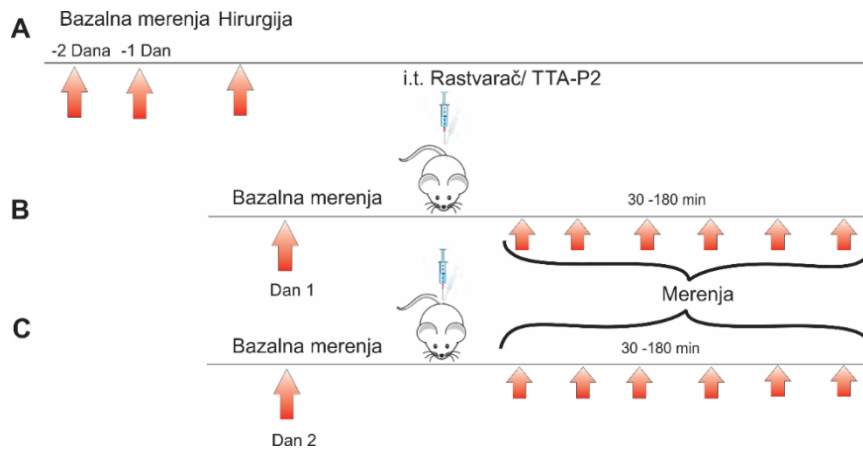
Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre i.t aplikacije. Za svaku ispitivanu dozu TTA-P2 i kontrolnu grupu životinja formirane su grupe od 6–10 pacova.

Najviša doza iz ovih eksperimenata koja je ispoljavala najveći antinociceptivni efekat je dalje korišćena u ispitivanju u postincizionom modelu bola.

## **8.2. Ispitivanje antihiperlgezijskog efekta TTA-P2 nakon pojedinačne i ponovljene intratekalne primene u inciziranih pacova**

### **8.2.1. Ispitivanje antihiperlgezijskog efekta TTA-P2 nakon pojedinačne intratekalne primene u inciziranih pacova**

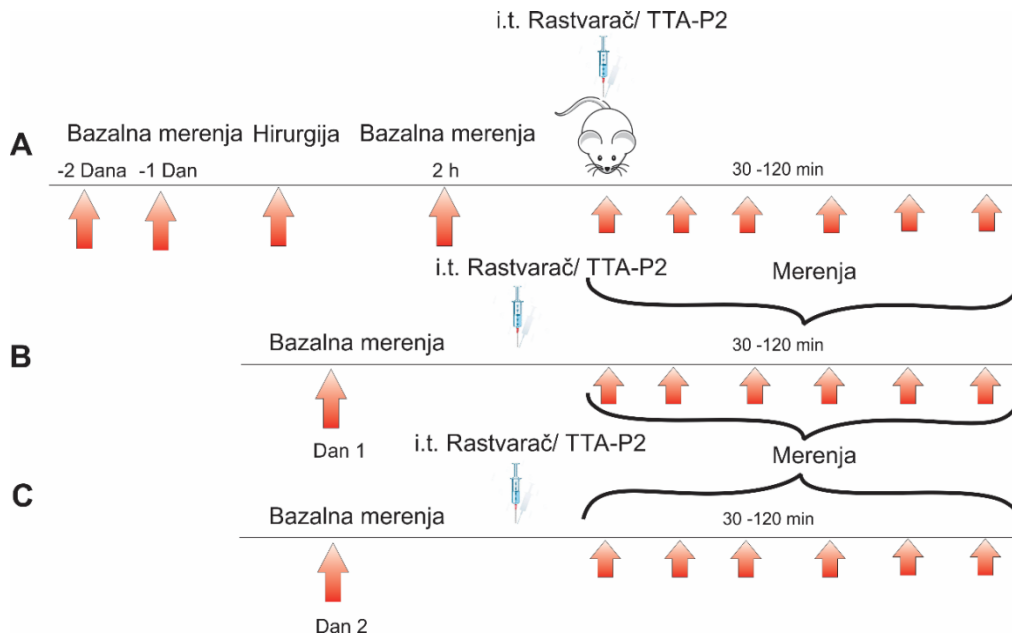
Za ispitivanje intratekalnog efekta selektivnog blokatora T-kanala, rastvarač ili najviša doza TTA-P2 koja je ispoljila antinociceptivni efekat u zdravih pacova, primenjeni su intratekalno (i.t.) u inciziranih pacova. Prvo su izvršena bazalna merenja osetljivosti na termički i mehanički stimulus nakon čega je izvedena hirurgija (Slika 20A). Dve različite grupe životinja su primile TTA-P2 i.t. u različito vreme: jedna grupa je primila i.t. TTA-P2 prvog, a druga grupa drugog postoperativnog dana Kontrolne grupe životinja su primile rastvarač i.t. (15% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH podešen na 7,4) u istom režimu kao i test grupe pacova. Antihiperlgezijski efekat rastvarača ili TTA-P2 meren je 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta nakon injekcije u testu termičke, odnosno 30, 90 i 120 minuta u testu mehaničke hiperlgezije (Slika 20B i 20C). Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre hirurške incizije, kao i pre aplikacije rastvarača ili TTA-P2 i.t. Za svaki eksperiment, formirane su grupe od 6–13 pacova.



**Slika 20.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta pojedinačne intratekalne primene rastvarača ili TTA-P2. **(A)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i hirurške incizije. **(B)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača ili TTA-P2 prvog dana nakon incizije u testovima termičke i mehaničke nocicepcije. **(C)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača ili TTA-P2 drugog dana nakon incizije u testovima termičke i mehaničke nocicepcije.

### 8.2.2. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta TTA-P2 nakon ponovljene intratekalne primene u inciziranih pacova

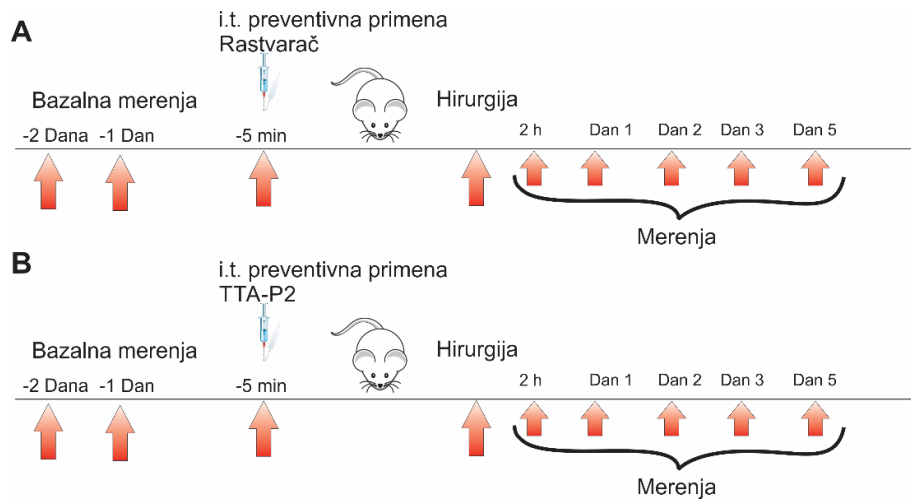
Za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta ponovljene intratekalne primene TTA-P2 u inciziranih pacova, najviša doza TTA-P2 testirana u zdravih, primenjena je intratekalno (i.t.) jednoj grupi pacova 2 sata, kao i prvog i drugog dana nakon incizije. Kontrolna grupa životinja je primila rastvarač i.t. (15% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH podešen na 7,4) u istom režimu kao i test grupa pacova. Nakon svake injekcije, antihiperalgezijski efekat rastvarača ili tretmana je meren 30, 60, 90 i 120 minuta (Slika 21A, 21B i 21C) u testovima termičke i mehaničke hiperalgezije. Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre hirurške incizije, kao i pre aplikacije TTA-P2 i.t. Za svaki eksperiment formirane su grupe od 5–9 pacova.



**Slika 21.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta ponovljene intratekalne primene rastvarača ili TTA-P2. **(A)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i hirurške incizije, kao i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača ili TTA-P2 dva sata nakon incizije. **(B)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača ili TTA-P2 prvog dana nakon incizije u testovima termičke i mehaničke nocicepcije. **(C)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača ili TTA-P2 drugog dana nakon incizije u testovima termičke i mehaničke nocicepcije.

### 8.3. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta TTA-P2 pojedinačne preventivne intratekalne injekcije neposredno pre hirurške intervencije u inciziranih pacova

Za ispitivanje efekta preventivno primenjenog selektivnog antagoniste T-kanala TTA-P2 na razvoj postincizionone hiperalgezije, TTA-P2 je primenjen i.t. 5 minuta pre hirurške incizije, nakon čega je procenjivan antihiperalgezijski efekat u testu termičke i mehaničke hiperalgezije. Kontrolna grupa životinja je primila rastvarač i.t. (15% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH podešen na 7,4) u istom režimu kao i test grupa pacova. Nakon primene rastvarača (Slika 22A) ili TTA-P2 (Slika 22B), i izvršene hirurške incizije, test merenja antihiperalgezijskog efekta su sprovedena 2 sata nakon hirurgije, kao i jednom dnevno tokom prvog, drugog, trećeg i petog dana postoperativnog oporavka. Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre hirurške incizije, kao i pre i.t. aplikacije TTA-P2.

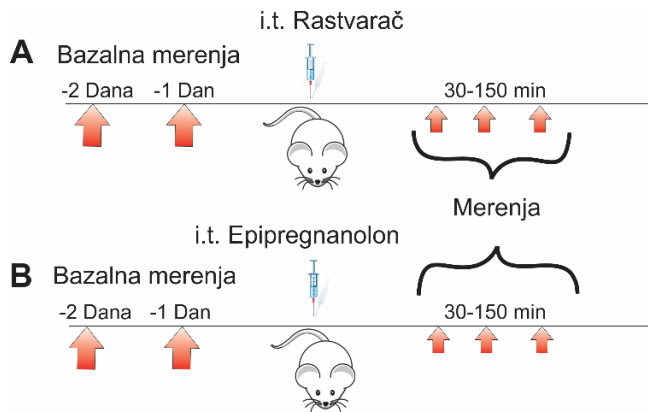


**Slika 22.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta pojedinačne preventivne intratekalne primene rastvarača ili TTA-P2. **(A)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i hirurške incizije, kao i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača u testu mehaničke nocicepcije. **(B)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i hirurške incizije, kao i merenja antihiperalgezijskog efekta TTA-P2 u testu mehaničke nocicepcije.

#### 8.4. Ispitivanje antinociceptivnog efekta neuroaktivnog steroida epipregnanolona nakon pojedinačne intratekalne primene u zdravim pacova

Za ispitivanje antinociceptivnog efekta epipregnanolona, rastvarač (15% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH podešen na 7,4; Slika 23A) ili tretman (Slika 23B) su primenjeni intratekalno (i.t.) u zdravim anesteziranih životinja, nakon čega je sniman antinociceptivni efekat u testu termičke nocicepcije tokom 30, 60, 90, 120 i 150 minuta, odnosno u testu mehaničke nocicepcije 30, 60, 90 i 120 minuta nakon injekcije. Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre primene epipregnanolona. Za svaki eksperiment, formirane su grupe od 5–12 pacova.

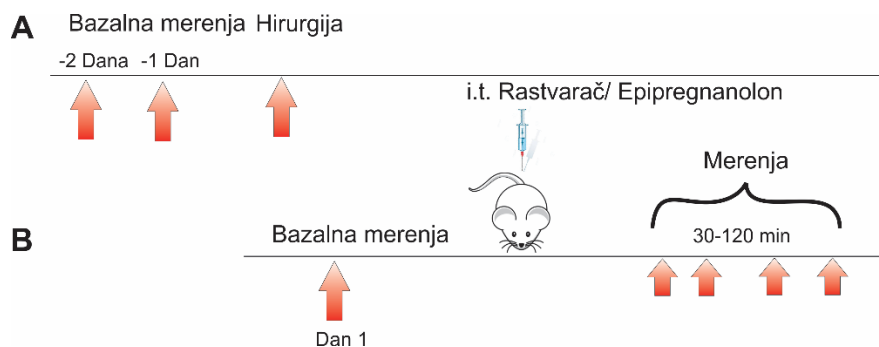




**Slika 23.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antinociceptivnog efekta intratekalno primenjenog rastvarača ili epipregnanolona u zdravih pacova. **(A)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antinociceptivnog efekta rastvarača u testovima termičke i mehaničke nocicepcije. **(B)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antinociceptivnog efekta epipregnanolona u testovima termičke i mehaničke nocicepcije.

### 8.5. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta epipregnanolona nakon pojedinačne intratekalne primene u inciziranih pacova

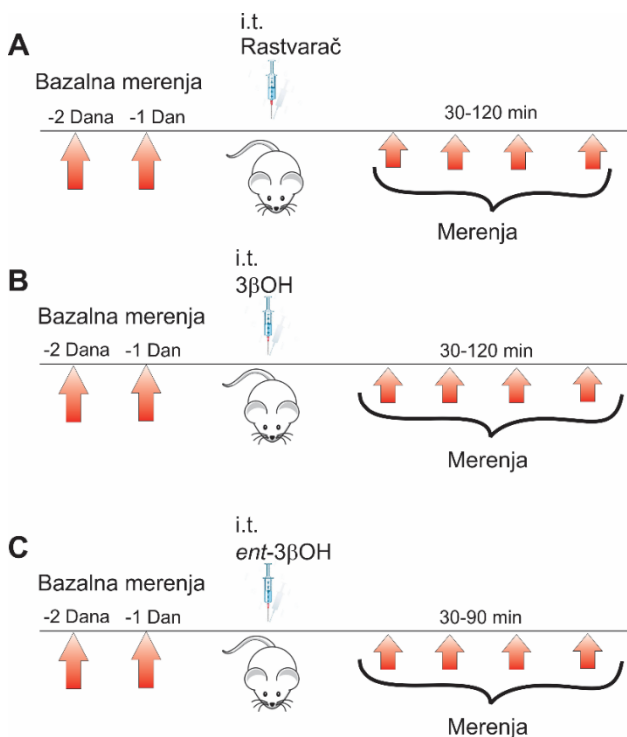
U cilju ispitivanja antihiperalgezijskog efekta epipregnanolona u postincizionom modelu bola, nakon bazalnih merenja osetljivosti šape u testu izmicanja šape pred mehaničkim stimulusom, izvedena je hirurška incizija (Slika 24A). Prvog dana nakon incizije primenjen je intratekalno (i.t.) rastvarač (15% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH podešen na 7,4) ili najveća efektivna doza epipregnanolona primenjena u zdravih pacova, nakon čega je sniman antihiperalgezijski efekat u testu mehaničke nocicepcije 30, 60, 90 i 120 minuta nakon injekcije (Slika 24B). Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre hirurške incizije, kao i pre aplikacije neuroaktivnog steroida. Za svaki eksperiment, formirane su grupe od 4–7 pacova.



**Slika 24.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta pojedinačne intratekalne primene rastvarača ili epipregnanolona. **(A)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i hirurške incizije. **(B)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača ili epipregnanolona prvog dana nakon incizije u testu mehaničke nocicepcije.

## 8.6. Ispitivanje antinociceptivnog efekta neuroaktivnog steroida $3\beta$ -OH nakon pojedinačne intratekalne primene u zdravih pacova

Za ispitivanje antinociceptivnog efekta neuroaktivnog steroida koji selektivno blokira T-kanale, različite doze  $3\beta$ -OH su primenjene intratekalno (i.t.) u zdravih životinja, nakon čega je meren antinociceptivni efekat u testovima termičke i mehaničke nocicepcije. Kontrolna grupa životinja je primila rastvarač i.t. (15% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH podešen na 7,4) i test merenja antinociceptivnog efekta su vršena u istim vremenskim tačkama. Nakon intratekalne primene rastvarača (Slika 25A) ili tretmana (Slika 25B) test merenja u testu termičke i mehaničke nocicepcije su vršena 30, 60, 90 i 120 minuta nakon injekcije. Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre i.t. aplikacije  $3\beta$ -OH. Kako bi se ispitala strukturna selektivnost i specifičnost neurosteroida  $3\beta$ -OH za T-kalcijumove kanale, enantiomer *ent*- $3\beta$ -OH, čija struktura ne dozvoljava vezivanje ovog neurosteroida za T-kanale, primenjen je intratekalno. Antinociceptivni efekat je meren 30, 60 i 90 minuta nakon primene *ent*- $3\beta$ -OH u zdravih životinja u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa (Slika 25C). Za svaki eksperiment, formirane su grupe od 8–11 pacova.

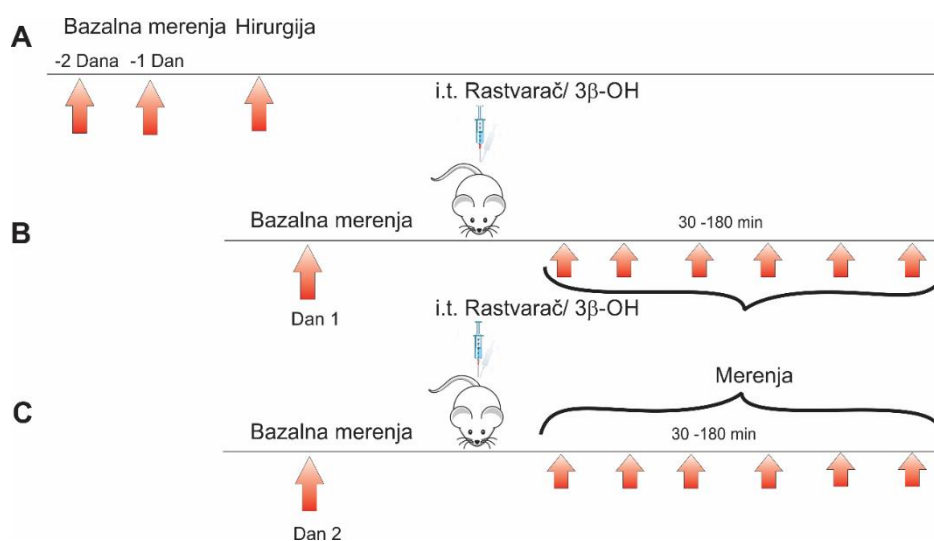


**Slika 25.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antinociceptivnog efekta intratekalno primenjenog rastvarača ili  $3\beta$ -OH ili *ent*- $3\beta$ -OH u zdravih pacova. **(A)** Protokol merenja antinociceptivnog efekta rastvarača u testu termičke i mehaničke nocicepcije. **(B)** Protokol merenja antinociceptivnog efekta  $3\beta$ -OH u testu termičke i mehaničke nocicepcije. **(C)** Protokol merenja antinociceptivnog efekta *ent*- $3\beta$ -OH u testu mehaničke nocicepcije.

## 8.7. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta neuroaktivnog steroida $3\beta$ -OH nakon pojedinačne i ponovljene intratekalne, kao i nakon ponovljene intraplantarne primene u inciziranih pacova

### 8.7.1. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta neuroaktivnog steroida $3\beta$ -OH nakon pojedinačne intratekalne primene u inciziranih pacova

U cilju ispitivanja antihiperalgezijskog efekta u postincizionom modelu bola, najpre su izvršena bazalna merenja u testovima izmicanja šape pod uticajem toplote i mehaničkog stimulusa, nakon čega je izvedena hirurgija (Slika 26A). Rastvarač ili najveća doza  $3\beta$ -OH testirana u zdravih pacova su primenjeni intratekalno (i.t.) u inciziranih pacova, nakon čega je meren antihiperalgezijski efekat u testu izmicanja šape pod uticajem toplote i u testu izmicanja šape pod mehaničkim stimulusom, u 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta nakon injekcije u testu termičke, odnosno 30, 60, 90 i 120 minuta u testu mehaničke hiperalgezije (Slika 26B i 26C).  $3\beta$ -OH je primenjen i.t. u različitim grupama životinja prvog i drugog postoperativnog dana.

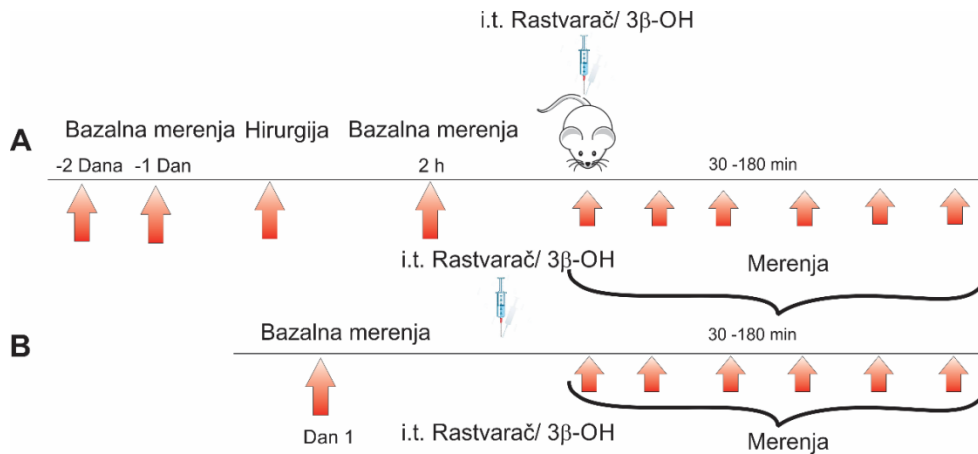


**Slika 26.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta pojedinačne intratekalne primene rastvarača ili  $3\beta$ -OH. **(A)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i hirurške incizije. **(B)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača ili  $3\beta$ -OH prvog dana nakon incizije u testovima termičke i mehaničke nocicepcije. **(C)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača ili  $3\beta$ -OH drugog dana nakon incizije u testovima termičke i mehaničke nocicepcije.

Kontrolne grupe životinja su primile rastvarač i.t. (15% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH podešen na 7,4) u istom režimu kao i test grupe pacova; test merenja antihiperalgezijskog efekta su vršena u istim vremenskim tačkama. Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre hirurške incizije, kao i neposredno pre aplikacije tretmana ili rastvarača. Za svaki eksperiment, formirane su grupe od 6–8 pacova.

### ***8.7.2. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta neuroaktivnog steroida 3 $\beta$ -OH nakon ponovljene intratekalne primene u inciziranih pacova***

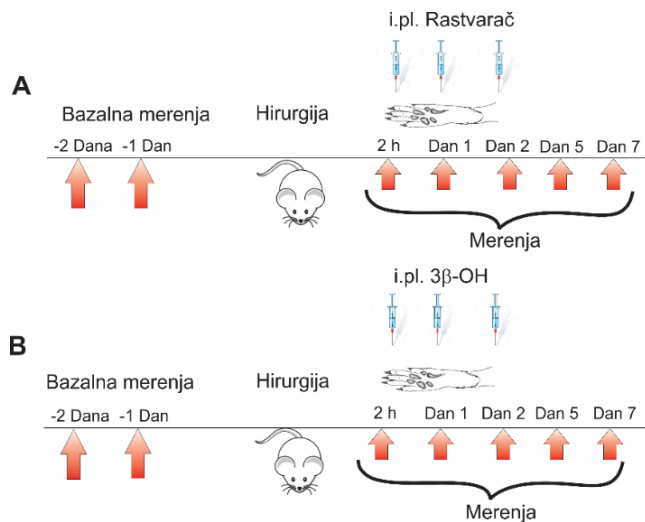
Za ispitivanje intratekalnog efekta selektivnog blokatora T-kanala, rastvarač ili 3 $\beta$ -OH su primenjeni intratekalno (i.t.) u inciziranih pacova, nakon čega je meren antihiperalgezijski efekat u testu izmicanja šape pod uticajem toplote i testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa, u 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta nakon injekcije u testu termičke, odnosno 30, 60, 90 i 120 minuta u testu mehaničke hiperalgezije. Kontrolna grupa životinja je primila rastvarač i.t. (15% 2-hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH balansiran na 7,4) u istom režimu kao i test grupa pacova. Test merenja antihiperalgezijskog efekta su vršena u istim vremenskim tačkama Rastvarač ili 3 $\beta$ -OH su primenjeni i.t. 2 sata nakon incizije (Slika 27A), kao i prvog postoperativnog dana (Slika 27B). Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre hirurške incizije, kao i pre aplikacije 3 $\beta$ -OH i rastvarača i.t. Za svaki eksperiment, formirane su grupe od 6–8 pacova.



**Slika 27.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta ponovljene intratekalne primene rastvarača ili 3β-OH. **(A)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i hirurške incizije, kao i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača ili 3β-OH dva sata nakon incizije u testovima termičke i mehaničke nocicepcije. **(B)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja i hirurške incizije, kao i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača ili 3β-OH prvog dana nakon incizije u testovima termičke i mehaničke nocicepcije.

### 8.7.3. Ispitivanje antihiperalgezijskog efekta neuroaktivnog steroida 3β-OH nakon ponovljene intraplantarne primene u inciziranih pacova

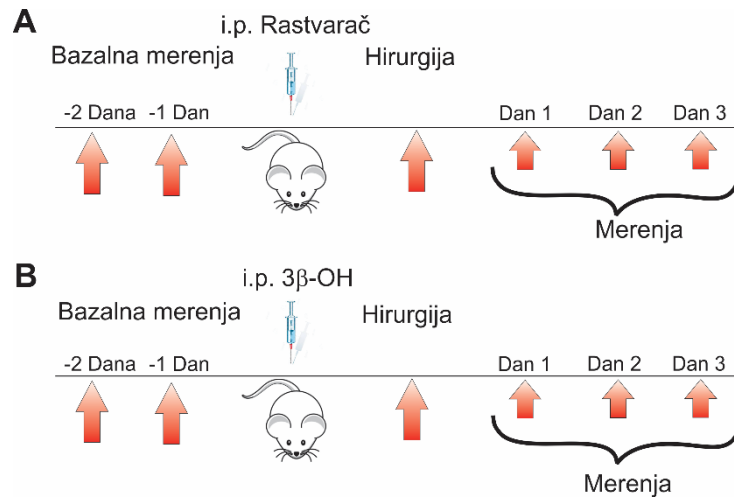
Za ispitivanje lokalnog efekta 3β-OH na nivou šape, neurosteroid je primenjen intraplantarно (i.pl.) u inciziranih pacova, dva sata, kao i prvog i drugog dana nakon incizije. Kontrolna grupa životinja je primila rastvarač i.pl. (15% 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH podešen na 7,4) u istom režimu kao i test grupa pacova. Bazalna merenja su vršena pre aplikacije rastvarača ili 3β-OH tokom dva dana pre hirurģije, kao i pre svake intraplantarne aplikacije. Antihiperalgezijski efekti rastvarača (Slika 28A) i 3β-OH (Slika 28B) su praćeni u testu izmicanja šape pod uticajem toplote, kao i u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa dva sata, prvog i drugog dana nakon incizije, kao i petog i sedmog dana postinciziono. Za svaki eksperiment, formirane su grupe od 6–8 pacova.



**Slika 28.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta ponovljene intraplantarne primene rastvarača ili 3β-OH. **(A)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja, hirurške incizije, intraplantarnih injekcija, kao i merenja antihiperlgezijskog efekta rastvarača nakon incizije u testovima termičke i mehaničke nocicepcije. **(B)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja, hirurške incizije, intraplantarnih injekcija, kao i merenja antihiperlgezijskog efekta 3β-OH nakon incizije u testovima termičke i mehaničke nocicepcije.

### 8.8. Ispitivanje antihiperlgezijskog efekta neuroaktivnog steroida 3β-OH nakon pojedinačne intraperitonealne primene u sastavu anestezije za incizionu operaciju

Za ispitivanje analgetičkog efekta preventivne primene 3β-OH, neurosteroid je primenjen intraperitonealno (i.p.) u sklopu anestezije zajedno sa 1% izofluranom. Ova kombinacija hipnotika i subanestetičke doze izoflurana korišćena je za postizanje anestezije u pacova koji su podvrgnuti hirurškoj inciziji. Kontrolna grupa životinja je primila rastvarač i.p. (25% 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin u fiziološkom rastvoru čiji je pH podešen na 7,4) u istom režimu kao i test grupa pacova. Antihiperlgezijski efekat je ispitivan u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa i u testu izmicanja šape pod toplotnim stimulusom. Nakon primene rastvarača (Slika 29A) i 3β-OH (Slika 29B) vršena su test merenja prvog, drugog i trećeg dana nakon incizije. Bazalna merenja su vršena tokom dva dana pre hirurške incizije, kao i pre aplikacije 3β-OH i.t.



**Slika 29.** Prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje antihiperalgezijskog efekta preventivne pojedinačne intraperitonealne primene rastvarača ili 3β-OH. **(A)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja, hirurške incizije, intraperitonealne injekcije, kao i merenja antihiperalgezijskog efekta rastvarača nakon incizije. **(B)** Protokol sprovođenja bazalnih merenja, hirurške incizije, intraperitonealne injekcije, kao i merenja antihiperalgezijskog efekta 3β-OH nakon incizije.

## 9. Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (standardna greška). Za statističku obradu rezultata korišćen je GraphPad Prism.

Sledeći statistički testovi su korišćeni za analizu dobijenih podataka [u zavisnosti od broja grupa, broja/vrste faktora i karakteristika podataka (normalnost, ujednačenost varijanse)]: t-test za nezavisne uzorke, jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima uz Dunett ili Tukey *post hoc* test, dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima uz Tukey, Bonferroni ili Sidak *post hoc* test, Mann Whitney U-test i Fišerov test.

Pre nego što su podaci analizirani primenom dvofaktorske ANOVA-e sa ponovljenim merenjima, prvo je utvrđeno da li podaci zadovoljavaju kriterijum normalne distribucije i varijanse. Analiza normalnosti i jednakosti varijansi urađena je u programima SPSS i Sigma Plot. Takođe, ukoliko je analiza dvofaktorske ANOVA-e sa ponovljenim merenjima pokazala značajnu interakciju dva faktora, automatski su se podaci dalje analizirali odgovarajućim *post hoc* testom. Odabir *post hoc* testa zavisio je od veličine analiziranih grupa podataka. Program OriginLab korišćen je za računanje  $V_{50}$  (potencijal ćelijske membrane pri kojoj je 50% T-kanala u

aktivisanom stanju) vrednosti sa 95% intervalima poverenja (Boltzmann-ova jednačina).



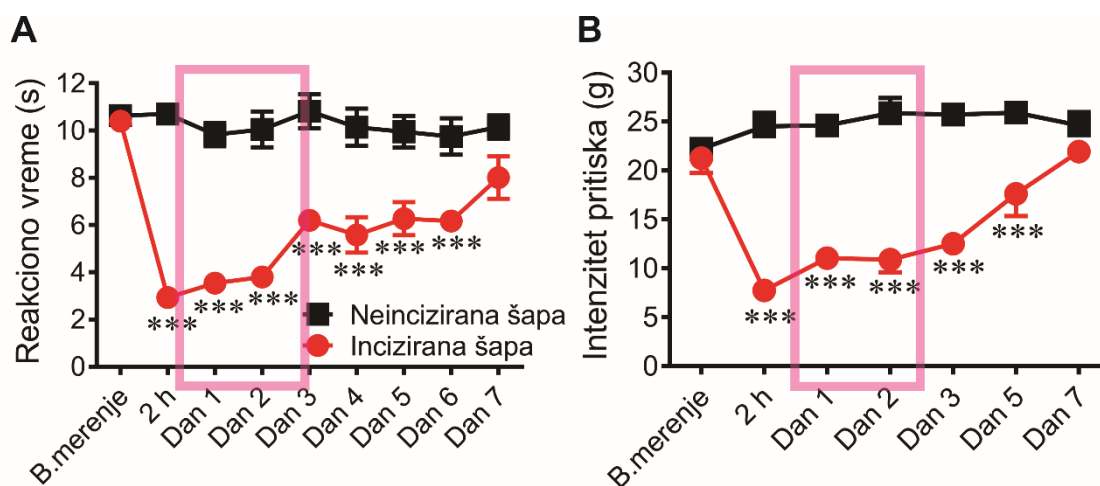
## IV. REZULTATI

### 1. *In vivo* uloga T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova i miševa

Uloga T-kalcijumovih kanala, kao i antihiperlgezijski efekat antagonista ovih kanala, u akutnom somatskom bolu ispitivan je u postincizionom modelu bola u pacova i miševa.

#### 1.1. Razvoj hiperlgezije u postincizionom modelu bola u pacova

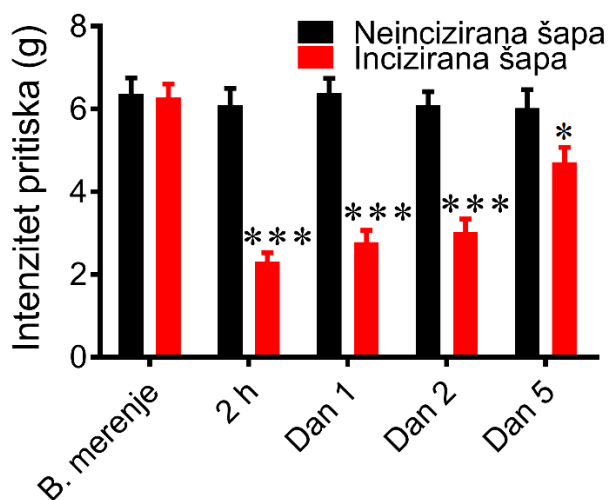
Nakon hirurške incizije plantarne površine zadnje šape pacova, razvija se statistički značajna termička hiperlgezija u testu izmicanja šape pod uticajem toplote (interakcija:  $F(8,80)=10,22$ ,  $p<0,001$ ; faktor incizije:  $F(1,10)=96,72$ ,  $p<0,001$ ; egzaktne p vrednosti:  $p<0,001$  za vremenske tačke 2 h, dani 1, 2, 3 i 4;  $p=0,0001$  za dan 5;  $p<0,001$  za dan 6; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak test) kao i mehanička hiperlgezija u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa (interakcija:  $F(6,120)=14,63$ ,  $p<0,001$ ; faktor incizije:  $F(1,20)=93,69$ ,  $p<0,001$ ; egzaktne p vrednosti:  $p<0,0001$  za vremenske tačke 2 h, dani 1, 2, 3, 5 i 7;  $p<0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak test) (Slika 30A i 30B). Termička i mehanička hiperlgezija su evidentne tokom 7 dana nakon incizije, a najizraženije su tokom prva dva postoperativna dana, koja su i izabrana za izvođenje eksperimenata.



**Slika 30.** Vremenski tok razvoja postincizionih hiperalgezija. **(A)** Vremenski tok razvoja hiperalgezije u testu izmicanja šape pod uticajem toplote nakon incizije plantarne površine zadnje šape pacova. **(B)** Vremenski tok razvoja mehaničke hiperalgezije nakon incizije plantarne površine zadnje šape pacova u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM merenja praga osetljivosti na termički ili mehanički stimulus, u grupi od 6–11 pacova. Statistička značajnost (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak post hoc test) određena je u odnosu na vrednosti neincizirane šape.

## 1.2. Razvoj hiperalgezije u postincizionom modelu bola u WT miševa

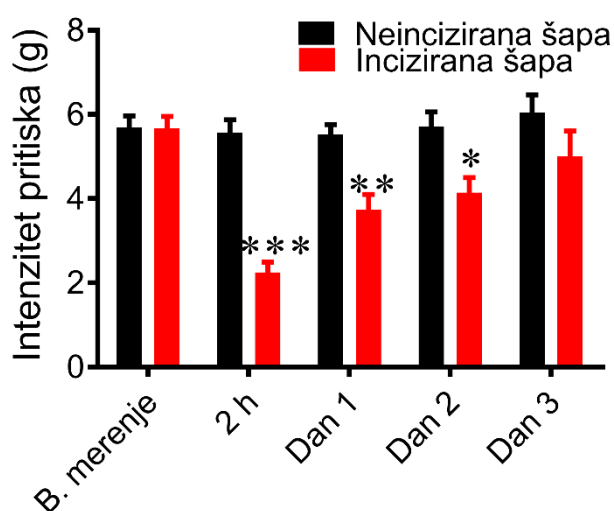
Slično kao u pacova, i u miševa se razvija statistički značajna mehanička hiperalgezija (Slika 31) već dva sata nakon incizije, koja perzistira tokom pet dana merenja nakon incizije (interakcija:  $F(4,96)=12,47$ ,  $p < 0,001$ ; faktor incizije:  $F(1,24)=75,74$ ,  $p < 0,001$ ; egzaktne  $p$  vrednosti:  $p < 0,001$  za vremenske tačke 2 h, dani 1, 2 i 5;  $p = 0,044$  za dan 5; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak test).



**Slika 31.** Vremenski tok razvoja mehaničke hiperalgezije nakon incizije plantarne površine zadnje šape WT miša. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM merenja u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa izraženog u gramima pritiska izvršenog na neinciziranu (crni stubići) i inciziranu (crveni stubići) šapu, u grupi od 13 miševa. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak post hoc test) određena je u odnosu na vrednosti PWR neincizirane šape.

### 1.3. Razvoj hiperalgezije u postincizionom modelu bola u miševa kod kojih je izbačen gen za Cav3.2 T-kalcijumov kanal (Cav3.2 KO) – ispitivanje uloge T-kanala

Nakon izvođenja hirurške incizije na Cav3.2 KO miševima, pokazano je da se, u odnosu na neinciziranu šapu, razvija statistički značajna mehanička hiperalgezija incizirane šape (interakcija:  $F(4,96)=8,108$ ,  $p<0,001$ ; faktor incizije:  $F(1,24)=20,25$ ,  $p=0,001$ ; egzaktne p vrednosti:  $p<0,001$  za 2 h;  $p=0,003$  za dan 1;  $p=0,013$  za dan 2; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak test) (Slika 32). Međutim, za razliku od WT miševa, mehanička hiperalgezija traje kraće u Cav3.2 KO, što je potvrđeno izostankom statističke značajnosti već trećeg dana nakon incizije u Cav3.2 KO miševa ( $p=0,194$ ).



**Slika 32.** Vremenski tok razvoja mehaničke hiperalgezije nakon incizije plantarne površine zadnje šape Cav3.2 KO miša. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM merenja praga osetljivosti na mehanički stimulus (PWR) izraženog u gramima pritiska izvršenog na neinciziranu (crni stubići) i inciziranu (crveni stubići) šapu, u grupi od 13 miševa. Statistička značajnost (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak post hoc test) određena je u odnosu na vrednosti PWR neincizirane šape.

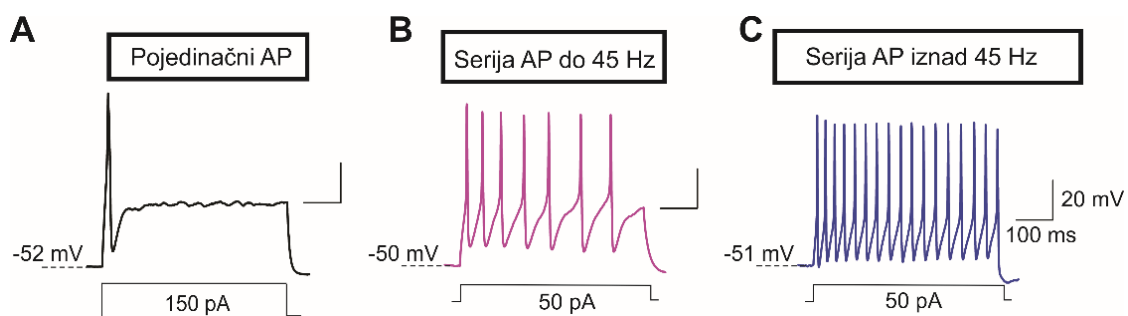
## 2. Elektrofiziološko ispitivanje uloge T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova

Da bi uloga kalcijumovih kanala T-tipa bila ispitana *in vitro* u postincizionom modelu bola, praćene su promene u ekscitabilnosti tela primarnih senzornih neurona, smeštenih u spinalnim ganglijama dorzalnih korenova lumbalnog regiona (L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub>). Takođe su praćene i promene u biofizičkim karakteristikama kalcijumovih kanala T-tipa, koje nastaju nakon incizije plantarne površine šape pacova, i dobijeni rezultati su poređeni sa vrednostima dobijenim iz kontrolne grupe.

## 2.1. Promene u ekscitabilnosti tela primarnih senzornih neurona spinalnih gangliona lumbalnog regiona L4-L6

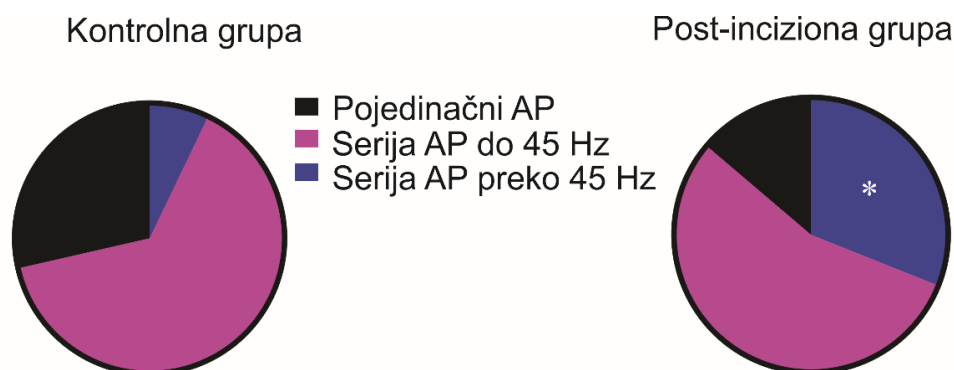
U cilju ispitivanja promene u ekscitabilnosti tela primarnih senzornih neurona smeštenih u spinalnim ganglionima dorzalnih korenova lumbalnog regiona, prvo su ispitivane razlike u režimima okidanja akcionih potencijala ovih neurona, pomoću elektrofiziološke *patch-clamp* tehnike. Identifikovana su tri različita režima okidanja akcionog potencijala (Slika 33A, 33B i 33C) primarnih senzornih neurona koja se javljaju i u kontrolnih i u inciziranih životinja:

- 1) neuroni koji okidaju pojedinačne akcione potencijale,
- 2) neuroni koji okidaju seriju akcionih potencijala (najmanje tri) sa frekvencom okidanja do 45 Hz,
- 3) neuroni koji okidaju visoko-frekventnu seriju akcionih potencijala (najmanje tri) sa frekvencom okidanja većom od 45 Hz.



**Slika 33.** Reprezentativni zapisi tri osnovna tipa akcionih potencijala (AP) koji nastaju usled spontane aktivnosti primarnih senzornih neurona bolnog puta. Spontana aktivnost se manifestovala u formi **(A)** pojedinačnog AP, **(B)** serije AP frekvence okidanja do 45 Hz i **(C)** serije AP frekvence okidanja iznad 45 Hz.

Međutim, nakon incizije, primećeno je statistički značajno ( $p=0,041$ ; Fišerov test) povećanje broja neurona koji spontano okidaju seriju akcionih potencijala (najmanje tri) sa frekvencom većom od 45 Hz, u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 34).



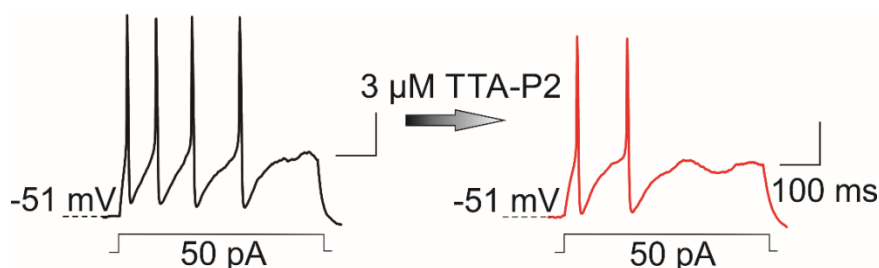
**Slika 34.** Dijagrami distribucije tri režima okidanja akcionih potencijala u kontrolnoj (dijagram levo) i postincizionoj (dijagram desno) grupi. Merenja su dobijena iz 28 ćelija, disociranih iz eksciziranog tkiva 8 pacova za kontrolnu grupu, dok je za postincizionu grupu iskorišćeno 29 ćelija iz 8 pacova. U postincizionoj grupi je povećanje visokofrekventnog okidanja akcionih potencijala bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu (\* $p < 0,05$ , Fišerov test).

### 2.1.1. Uticaj T-kanala na ekscitabilnost primarnih senzornih neurona spinalnih gangliona

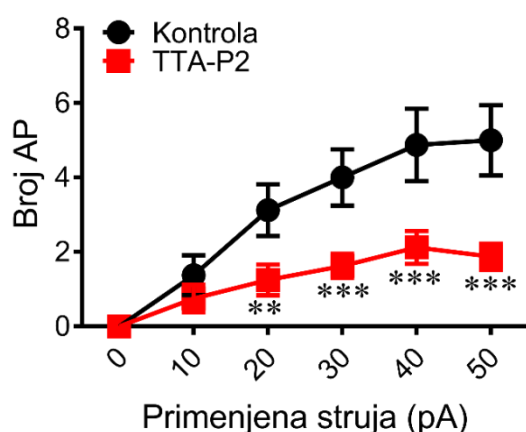
Kako bi uloga T-kanala u ekscitabilnosti primarnih senzornih neurona bila ispitana, primenjen je selektivni blokator T-kanala, TTA-P2, direktno na preparat disociranih tela senzornih neurona, a zatim su praćeni efekti blokade T-kanala na broj i frekvencu okidanja akcionih potencijala. TTA-P2 je primenjen u koncentraciji od  $3 \mu\text{M}$ , s obzirom da su prethodne studije pokazale da se pri ovoj koncentraciji ostvaruje potpuna blokada struja koje potiču od T-kanala, a da se pritom zadržava selektivnost samo za ove kanale.

### 2.1.2. Uticaj TTA-P2 na broj akcionih potencijala

Primena TTA-P2 ( $3 \mu\text{M}$ ) direktno na preparat disociranih tela senzornih neurona dovela je do značajnog smanjenja broja spontano generisanih AP (akcionih potencijala) pri primenjenoj struji od 50 pA (Slika 35), u odnosu na bazalno merenje. Takođe, u ispitivanju efekta primene rastućih struja (od 10 do 50 pA) na izazivanje AP nakon primene TTA-P2, pokazano je da se broj AP statistički značajno smanjio (interakcija:  $F(5,35)=6,69$ ;  $p < 0,001$ ; tretman:  $F(1,7)=14,72$ ,  $p=0,006$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak *post hoc* test) u postincizionoj grupi, u odnosu na bazalni nivo merenja broja AP (Slika 36).



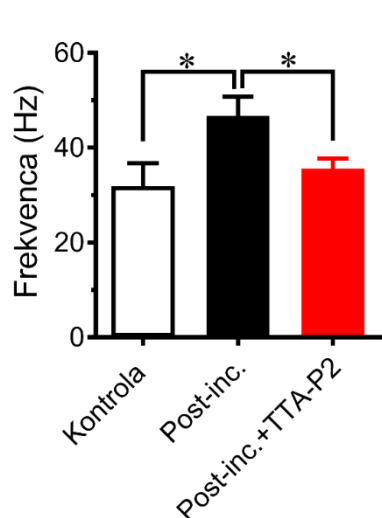
**Slika 35.** Reprezentativni zapisi spontanih AP DRG neurona tretiranih selektivnim blokatorom T-kanala (TTA-P2) u postincizionoj grupi (pri injektovanoj struji od 50 pA) pre (slika levo) i posle (slika desno) aplikacije 3  $\mu$ M TTA-P2.



**Slika 36.** Broj AP koje okidaju senzorni neuroni spinalnih gangliona dorzalnih korenova nakon incizije, pre i posle primene TTA-P2. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u grupi od 8 ćelija koje su dobijene iz 6 životinja. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak post hoc test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

### 2.1.3. Uticaj inkubacije neurona sa TTA-P2 na frekvencu akcionih potencijala

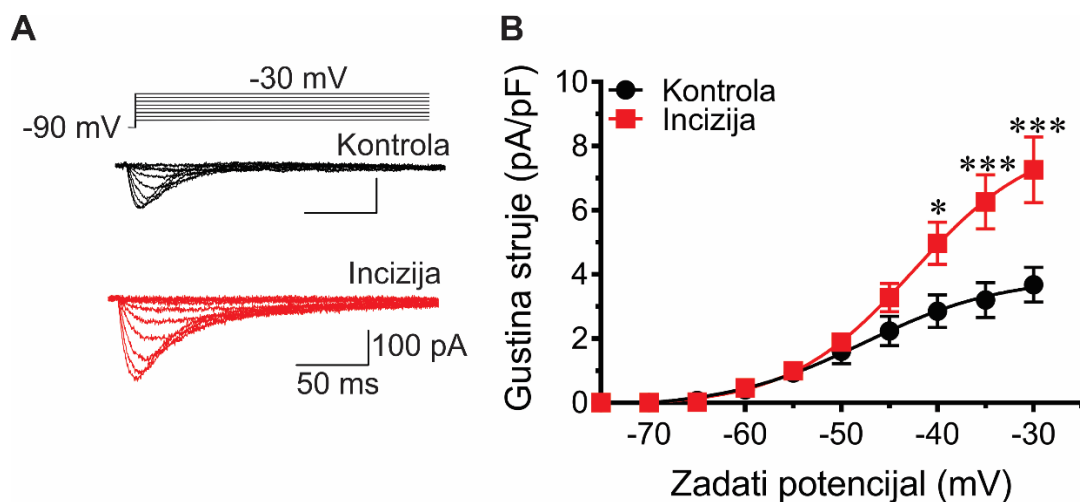
TTA-P2 (3  $\mu$ M) direktno primenjen na preparat i inkubiran 5–10 minuta sa disociranim telima senzornih neurona spinalnih gangliona, doveo je do statistički značajnog smanjenja frekvence okidanja prva tri akciona potencijala ćelija koje okidaju sa frekvencom većom od 45 Hz nakon incizije, u poređenju sa postincizionom grupom koja nije bila tretirana sa TTA-P2 (t-test za nezavisne uzorke;  $p = 0,02$ ) (Slika 37). Od izuzetnog značaja je da je primenjeni TTA-P2 smanjio frekvencu okidanja AP u postincizionoj grupi, na nivo kontrolne grupe, te da razlika između frekvence generisanja akcionih potencijala između incizione grupe koja je tretirana sa TTA-P2 i kontrolne neincizirane grupe, nije bila statistički značajna ( $p = 0,46$ ). Kako bi razlike u ekscitabilnosti bile uporedive, veštački smo kontrolisali potencijal mirovanja ćelijske membrane svih ispitivanih ćelija, tako da su potencijali mirovanja test i kontrolnih grupa bili jednaki.



**Slika 37.** Stubičasti dijagram predstavlja frekvencu okidanja AP u kontrolnoj (beli stubić), postincizionoj netretiranoj (crni stubić), i postincizionoj grupi koja je inkubirana sa tretmanom TTA-P2 5–10 minuta (crveni stubić). Svaki stubić predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u kontrolnoj grupi od 13 ćelija dobijenih iz 5 životinja, postincizionoj netretiranoj grupi od 10 ćelija dobijenih iz tkiva 7 pacova i postincizionoj grupi tretiranoj sa TTA-P2 od 8 ćelija dobijenih iz dva pacova. Statistička značajnost ( $*p < 0,05$ ; t-test za nezavisne uzorke) određena je u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

## 2.2. Promene u biofizičkim parametrima (veliĉini i gustini struja) koje karakterišu T-kanale u postincizionom bolu

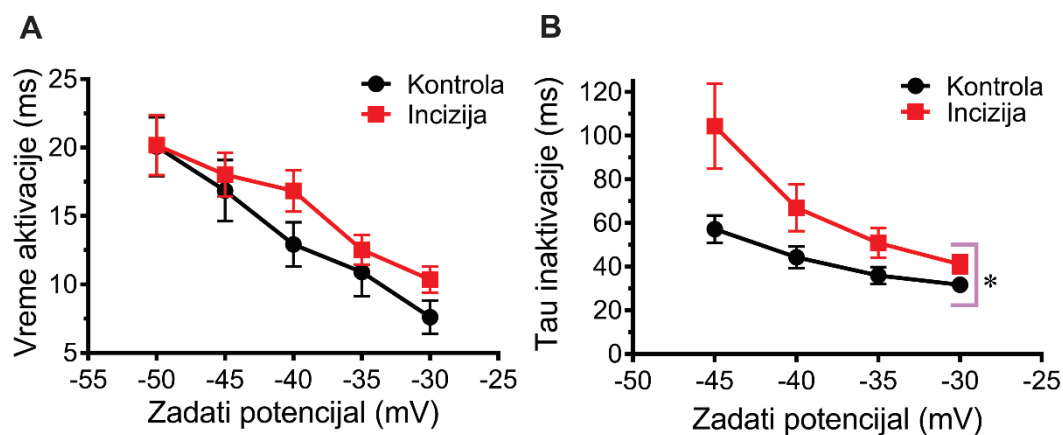
S obzirom da voltažno-zavisna aktivacija i inaktivacija mogu uticati na ekscitabilnost neurona koji eksprimiraju T-kanale, ispitali smo efekat incizije na pomenute biofiziĉke parametre koji karakterišu ove kanale na primarnim senzornim neuronima spinalnih gangliona dorzalnih korenova regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub>.



**Slika 38.** Uticaj postincizionog modela bola na gustinu aktivacionih struja T-kalcijumovih kanala u disociranim telima senzornih neurona. **(A)** Familije izazvanih T-struja u DRG neuronima kontrolne i incizione grupe korišćene su za generisanje krive odnosa jaĉine struje i potencijala ćelijske membrane (I–V kriva). **(B)** Proseĉna maksimalna gustina T-struja preraĉunata iz I–V krive. Svaka taĉka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u kontrolnoj grupi od 14 ćelija dobijenih iz tkiva 10 pacova i postincizionoj grupi od 20 ćelija dobijenih iz tkiva 10 pacova. Statistiĉka znaĉajnost ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak post hoc test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

Nakon incizije, prosečna gustina kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala je bila značajno povećana u odnosu na kontrolnu grupu, i to na različitim potencijalima ćelijske membrane (interakcija:  $F(9,288)=6,72$ ; egzaktna p vrednost:  $p=0,017$  za  $-40$  mV i  $p<0,001$  za  $-35$  i  $-30$  mV; tretman:  $F(1,32)=5,52$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak test) (Slika 38A i 38B).

Takođe je merena i vremenski-zavisna aktivacija (tzv. vreme postizanja maksimalne amplitude od 10 do 90%), kao i vremenski-zavisna inaktivaciona konstanta ( $\tau$ ) na ovim ćelijama (Slika 39A i 39B). Iako vreme postizanja maksimalne amplitude nije bilo različito ( $p=0,324$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima), vremenski-zavisna inaktivacija je statistički značajno bila povećana (skoro dva puta), u odnosu na kontrolnu grupu (interakcija:  $F(3,96)=2,36$ ,  $p=0,08$ ; tretman:  $F(1,32)=4,33$ ,  $p=0,045$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima).

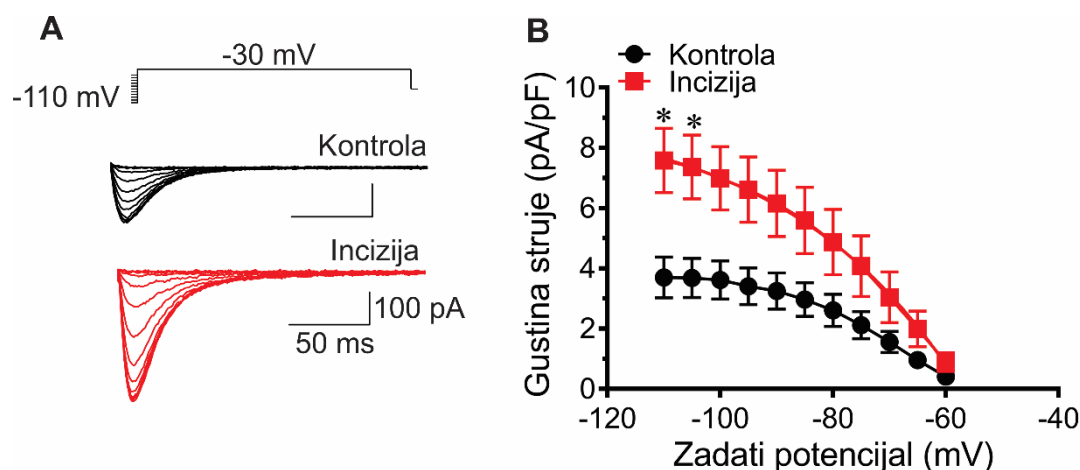


**Slika 39.** Uticaj postincizionog modela bola na kinetiku T-kalcijumovih kanala na disociranim telima senzornih neurona. **(A)** Vremenski-zavisna aktivacija (vreme postizanja aktivacije 10 do 90%) izmerena na osnovu I-V krive u DRG neuronima. **(B)** Inaktivaciona konstanta izmerena na osnovu I-V krive. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u kontrolnoj grupi od 14 ćelija dobijenih iz tkiva 10 pacova i postincizionoj grupi od 20 ćelija dobijenih iz tkiva 10 pacova. Statistička značajnost (\* $p<0,05$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) određena je u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

U cilju ispitivanja promena u inaktivaciji T-kanala nakon incizije, primenjivani su prepulsevi u trajanju od 3,5 s na različitim potencijalima kondicioniranja, kako bi se izazvale T-struje. Reprezentativni zapisi koji predstavljaju izazvane T-struje, i njihovu dalju inaktivaciju prikazani su na Slici 40A. Izmerena gustina struja na telima senzornih neurona gangliona dorzalnih korenova bila je statistički značajno povećana (gotovo dva puta) u odnosu na izmerenu gustinu T-struja na ćelijama dobijenih iz neinciziranih pacova (interakcija:  $F(10,330)=6,78$ ,  $p<0,001$ ; tretman:



$F(1,33)=4,15$ ,  $P=0,049$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak *post hoc* test) (Slika 40B). Nasuprot tome, srednje vrednosti ( $V_{50}$ ) voltažno-zavisne ravnotežne aktivacije i krive ravnotežne inaktivacije, kao i vremenska konstanta deaktivacije nisu se razlikovale između postincizionone grupe i neincizirane kontrolne grupe (podaci nisu prikazani).

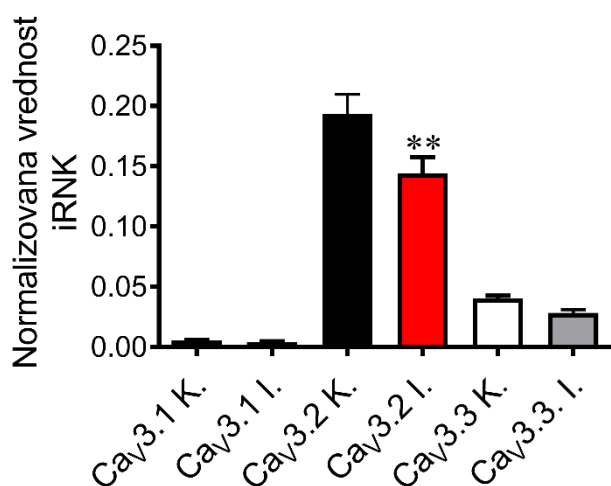


**Slika 40.** Uticaj postincizionog bola na gustinu inaktivacionih struja T-kalcijumovih kanala u disociranim telima senzornih neurona. **(A)** Reprezentativni zapisi familija T-struja izazvanih kod DRG neurona protokolom ravnotežne inaktivacije kod kontrolne (crni zapis) i incizirane (crveni zapis) grupe. **(B)** Gustina kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala izvedena iz ravnotežnih krivih inaktivacije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u kontrolnoj grupi od 14 ćelija dobijenih iz tkiva 10 pacova i postincizionoj grupi od 21 ćelije dobijene iz tkiva 10 pacova. Statistička značajnost (\* $p<0,05$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak *post hoc*) određena je u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

### 3. Promene u ekspresiji T-kanala na telima senzornih neurona spinalnih gangliona u postincizionom bolu u pacova

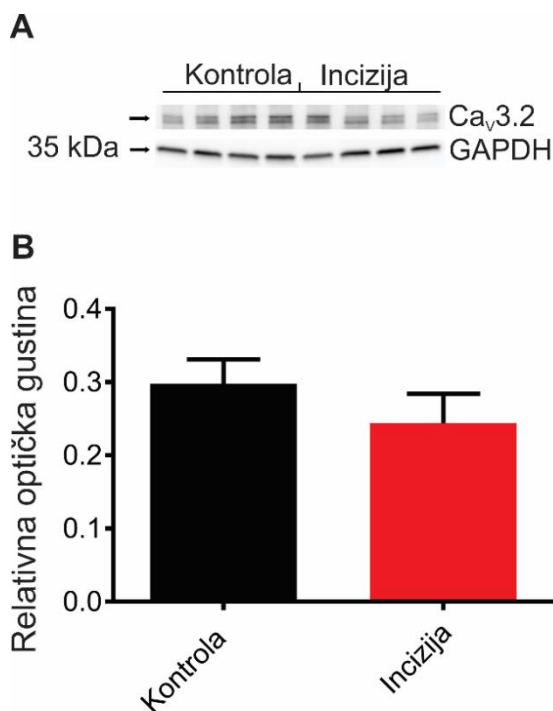
#### 3.1. Ispitivanje ekspresije Cav3.2 T-kanala qRT-PCR i metodom imunoblotova u pacova

qRT-PCR analiza nivoa iRNK za Cav3.2 podtip T-kalcijumovih kanala nije pokazala značajnu razliku između kontrolne i incizirane grupe, ukazujući da nakon incizije ne dolazi do povećanja produkcije ovog podtipa T-kanala na nivou senzornih neurona spinalnih gangliona (Slika 41). Naime, nivo iRNK za sva tri podtipa T-kalcijumovih kanala se nije promenio nakon incizije. Štaviše, iRNK za Cav3.2 kanal je bila statistički značajno smanjena nakon incizije, u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0,002$ , jednofaktorska ANOVA, Tukey test).



**Slika 41.** Ekspresija gena za tri podtipa T-kalcijumovih kanala u tkivu spinalnih gangliona dorzalnih korenova pacova kontrolnih i inciziranih uzoraka. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM od 4 uzorka dobijenih iz ukupno 28 pacova. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ , jednofaktorska ANOVA, Tukey post hoc test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

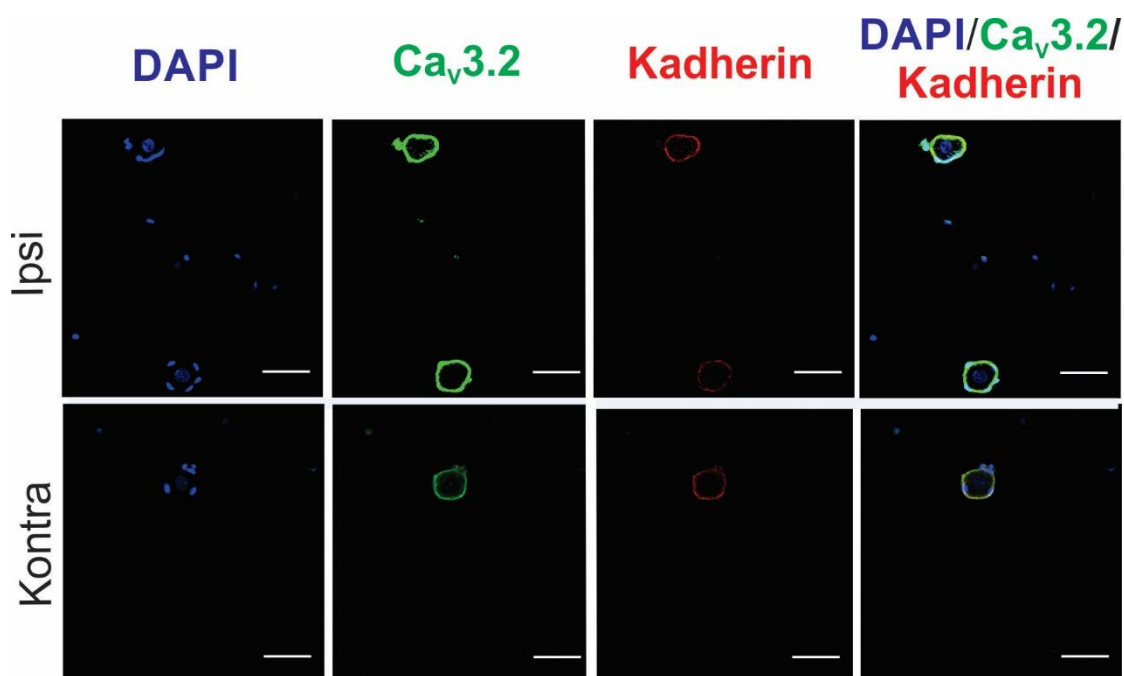
Analiza nivoa ekspresije Cav3.2 podtipa T-kalcijumovih kanala metodom imunoblotova je takođe potvrdila da nakon incizije ne dolazi do povećanja ekspresije Cav3.2 kanala ( $p=0,13$ , Mann Whitney test) (Slika 42A i 42B). Analizirano tkivo dobijeno je prikupljanjem spinalnih gangliona prvog i drugog dana nakon incizije. Iako oba ova rezultata zajedno potvrđuju da nakon incizije ne dolazi do povećane proizvodnje Cav3.2 podtipa T-kalcijumovih kanala, dobijeni rezultati daju informaciju o promeni u ekspresiji ukupnog proteina, ali ne i o promenama u ekspresiji membranske funkcionalne frakcije T-kalcijumovog kanala.



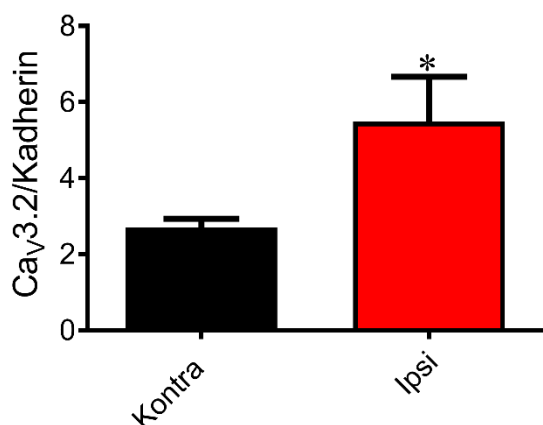
**Slika 42.** Analiza ekspresije  $Ca_v3.2$  kalcijumovih kanala nakon incizije metodom imunoblotova. **(A)** Reprezentivni imunoblotovi izolovanog  $Ca_v3.2$  podtipa T-kalcijumovih kanala iz disociranog tkiva spinalnih gangliona zadnjih korenova regiona  $L_4-L_6$  kontrolnih i inciziranih pacova. **(B)** Koncentracija proteina  $Ca_v3.2$  kanala izražena kao relativna optička gustina, u kontrolnim i inciziranim uzorcima. Oba stubića predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SEM od 4 uzorka dobijenih iz ukupno 12 pacova.

### 3.2. Imunocitohemijsko ispitivanje ekspresije Cav3.2 T-kanala na telima senzornih neurona spinalnih gangliona nakon incizije u pacova

U cilju utvrđivanja promene nivoa ekspresije Cav3.2 kanala na membrani tela primarnih senzornih neurona dva dana nakon incizije, poređeni su intenziteti signala Cav3.2 kalcijumovog kanala, normalizovanog na standard kadherin, u kontralateralnih i ipsilateralnih spinalnih gangliona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> regiona (Slika 43). Analiza dobijenih rezultata je pokazala da je ekspresija Cav3.2 kanala u membranskoj frakciji statistički značajno veća na telima senzornih neurona disociranih iz ipsilateralnih u odnosu na tela senzornih neurona iz kontralateralnih spinalnih gangliona ( $p=0,022$ , t-test za nezavisne uzorke) (Slika 44).



**Slika 43.** Reprezentativne fotomikrografije ekspresije membranske frakcije Cav3.2 kalcijumovih kanala na disociranim telima senzornih neurona kontralateralnih (donji red) i ipsilateralnih (slike gornji red) spinalnih gangliona dva dana nakon incizije. Ekspresija Cav3.2 kanala prikazana je zelenom, a kadherina crvenom bojom. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) obeležen plavom bojom, je korišćen u cilju validacije analize na približno istom broju neurona u obe ispitivane grupe. Skala – 50  $\mu\text{m}$ .

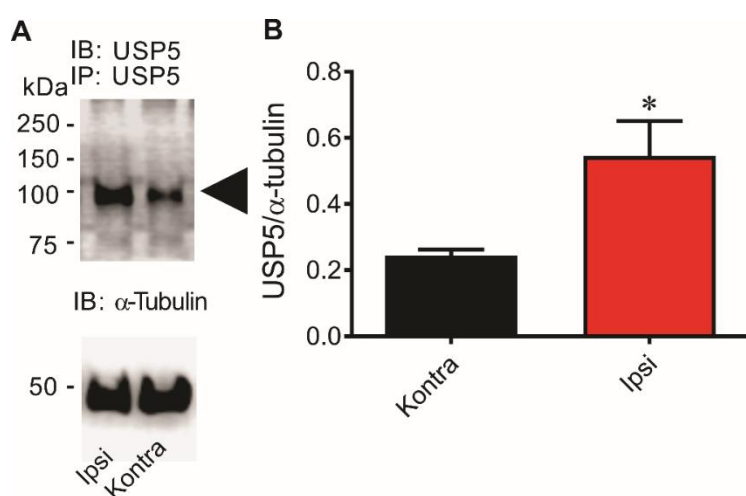


**Slika 44.** Relativna ekspresija  $Ca_v3.2$  kanala normalizovana u odnosu na ekspresiju membranskog proteina kadherina, merena na disociranim telima senzornih neurona spinalnih gangliona dva dana nakon incizije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=32-33$  ćelije). Statistička značajnost ( $*p<0,05$ , t-test za nezavisne uzorke) dobijena je poređenjem nivoa normalizovane fluorescence  $Ca_v3.2$  kanala između ipsi i kontralateralne grupe.

#### 4. Uloga deubikvitinacije T-kanala enzimom USP5 u razvoju hiperalgezije nakon incizije u pacova i miševa

##### 4.1. Ispitivanje nivoa ekspresije USP5 enzima u postincizionom modelu bola u miševa

Rezultati imunoblot analize na izolovanim spinalnim ganglijama WT miševa, pokazali su da je dva dana nakon incizije ekspresija USP5 enzima statistički značajno povećana u tkivu ipsilateralnih, u odnosu na kontralateralne spinalne ganglione L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> (Slika 45) ( $p=0,047$ , t-test za nezavisne uzorke).



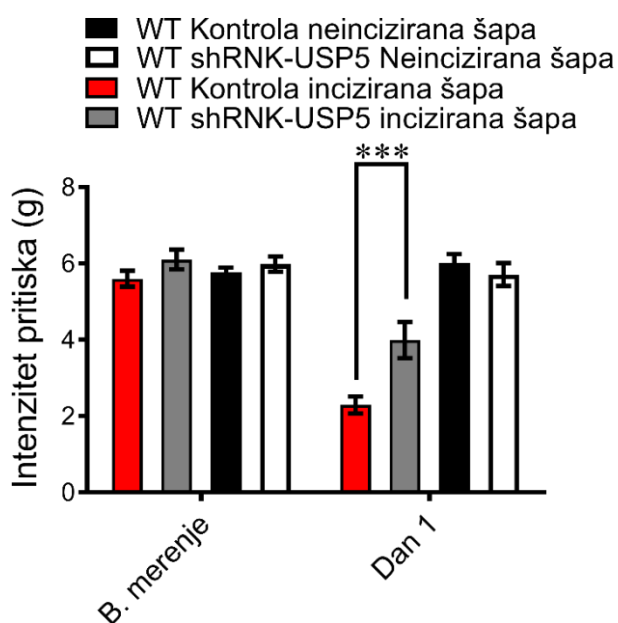
**Slika 45.** Ekspresija USP5 enzima u spinalnim ganglijama L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> regiona nakon incizije. **(A)** Na slici su prikazani reprezentativni imunoblotovi ekspresije USP5 ipsi i kontralateralnih gangliona dorzalnih korenova WT miša. **(B)** Stubičasti dijagram desno prikazuje nivo ekspresije USP5 normalizovan prema  $\alpha$ -tubulinu, dva dana nakon incizije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n=3$  miša). Statistička značajnost ( $*p < 0,05$ , t-test za nezavisne uzorke) dobijena je poređenjem nivoa ekspresije USP5 između ipsi i kontralateralne grupe.

USP5 je izolovan imunoprecipitacijom iz tkiva ipsi i kontralateralnih gangliona L4 do L6 regiona u miševa dva dana nakon incizije. Homogenati spinalnih gangliona dorzalnih korenova regiona L4 do L6 izvađeni su zasebno za svaku životinju, i to odvojeno za ipsi- i kontralateralnu stranu. Imunoblot je izveden za svaku životinju pojedinačno.

#### 4.2. Uticaj selektivne supresije produkcije USP5 enzima na razvoj mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u miševa i pacova

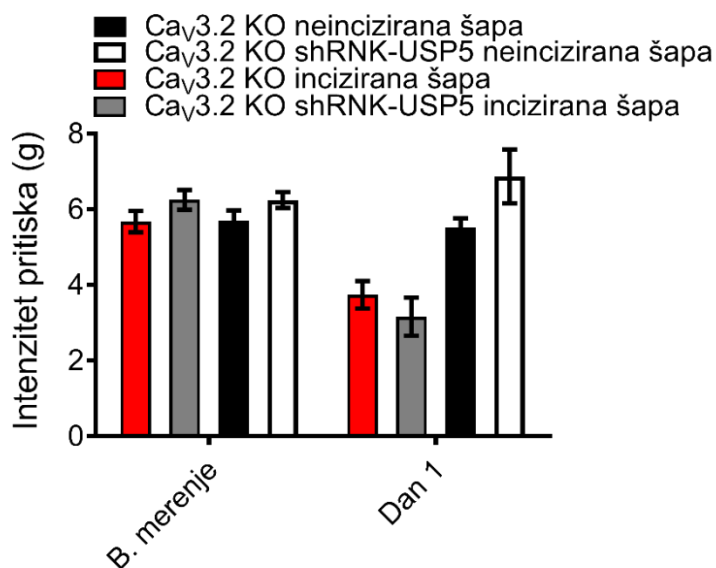
##### 4.2.1. Uticaj selektivne supresije produkcije USP5 enzima na razvoj mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u miševa

U *in vivo* eksperimentima, grupa WT miševa koja je 24 sata pre incizije intratekalno primila malu RNK oblika ukosnice (shRNK-USP5), razvila je statistički značajno manju mehaničku hiperalgeziju prvog dana nakon incizije, u poređenju sa kontrolnom grupom (interakcija:  $F(3,40)=21,41$ ;  $p<0,001$ ; tretman:  $F(3,40)=15,66$ ;  $p<0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Bonferoni *post hoc* test) (Slika 46).



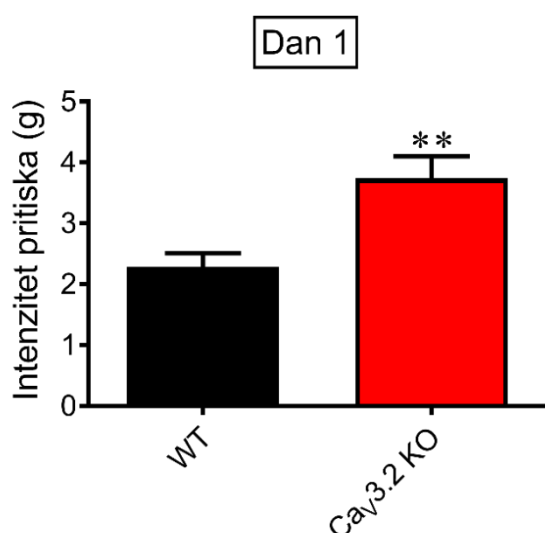
**Slika 46.** Antihiperalgezijski efekat shRNK-USP5 u inciziranih miševa. Tretman je primenjen 24 sata pre izvođenja hirurške incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 10–12 WT miševa. Statistička značajnost ( $***p<0,001$  dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Bonferoni *post hoc* test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu WT miševa.

Za razliku od WT miševa, tretman shRNK-USP5 nije doveo do promene u intenzitetu mehaničke hiperalgezije nakon incizije kod Cav3.2 KO miševa ( $p=0,14$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) (Slika 47).



**Slika 47.** Odsustvo antihiperalgezijskog efekta genetičkog tretmana pomoću kojeg se selektivno sprečava produkcija USP5 u inciziranih miševa. Tretman je primenjen 24 sata pre izvođenja hirurške incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od po 7 Cav<sub>v</sub>3.2 KO miševa. Statistička značajnost (dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa Bonferoni post hoc testom) određena je u odnosu na kontrolnu grupu Cav<sub>v</sub>3.2 KO miševa.

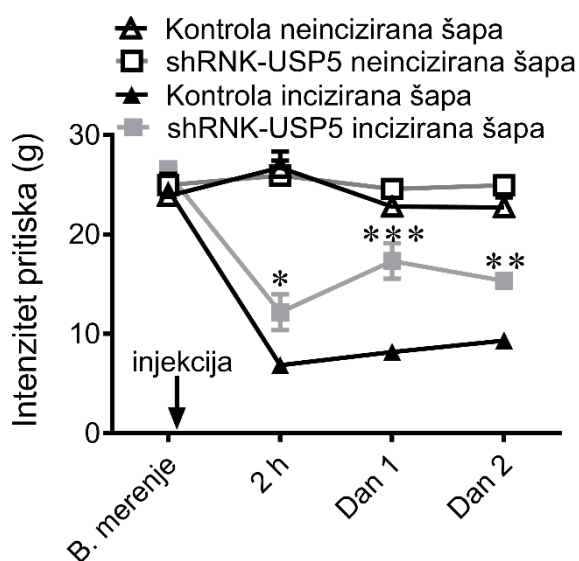
Takođe je izvršeno poređenje mehaničke hiperalgezije razvijene prvog dana nakon incizije u WT i KO miševa. Pokazano je da KO miševi razvijaju statistički signifikantno manju hiperosetljivost u odnosu na WT miševе ( $p=0,004$ ; t-test za nezavisne uzorke) (Slika 48).



**Slika 48.** Razlika u razvoju mehaničke hiperalgezije između kontrolne WT i kontrolne Cav<sub>v</sub>3.2 KO grupe predstavljena kao razlika u intenzitetima pritiska inciziranih šapa prvog dana nakon incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 10–13 miševa po grupi. Statistička značajnost (\*\* $p<0,01$  t-test za nezavisne uzorke) određena je poređenjem dve grupe 24 sata nakon incizije.

#### 4.2.2. Uticaj selektivne supresije produkcije USP5 enzima na razvoj mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova

Uspešna supresija produkcije USP5 potvrđena je *in vivo* u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa koji su 24 sata pre incizije primili shRNK-USP5 intratekalno (Slika 49). Prag osetljivosti ipsilateralne šape na mehanički stimulus nakon injekcije shRNK-USP5 bio je statistički značajno viši u poređenju sa kontrolnom grupom, i to 2, 24 kao i 48 sati nakon operacije (interakcija:  $F(6,52)=4,31$ ; tretman:  $F(3,26)=89,98$ , dva sata nakon incizije:  $p=0,014$ , 24 sata nakon incizije:  $p<0,001$ , 48 sati nakon incizije:  $p=0,004$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, sa Sidak *post hoc* testom). Ovaj rezultat ukazuje na pojavu smanjene hiperalgezije merene u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa kod životinja kod kojih je genetičkom manipulacijom suprimirana proizvodnja USP5. Nasuprot ovom rezultatu, osetljivost kontralateralne neincizirane šape na mehanički stimulus ostala je nepromenjena nakon genetičkog tretmana shRNK-USP5 (nije prikazano).



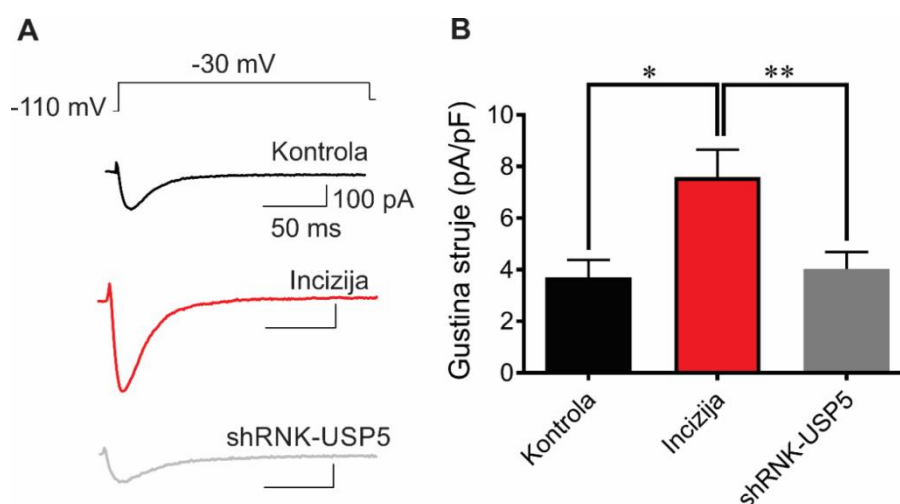
**Slika 49.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta tretmana shRNK-USP5 u inciziranih pacova, izraženog kao intenzitet pritiska u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 7–8 pacova. Statistička značajnost (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak *post hoc* test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu pacova.

---

#### 4.3. Uticaj selektivne supresije deubikvitinacije selektivnim smanjenjem ekspresije (tzv. *knock-down*) USP5 enzima, na kalcijumove struje koje potiču od T-kanala, izmerenih u akutno disociranih primarnih senzornih neurona spinalnih gangliona lumbalnog regiona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> u postincizionom modelu bola u pacova

Izmerene struje koje potiču od T-kalcijumovih kanala na telima senzornih neurona spinalnih gangliona pacova koji su 24 sata pre incizije primili intratekalnu injekciju USP5-shRNK, bile su niže upoređenju sa kontrolnom grupom, na šta ukazuju reprezentativni zapisi ovih struja iz obe grupe (Slika 50A). Kontrolna grupa životinja nije primila nikakav tretman. Gustina izmerenih struja nakon incizije bila je povećana u odnosu na kontrolnu grupu zdravih pacova ( $p=0,012$ ; jednofaktorska ANOVA sa Tukey *post hoc* testom) (Slika 50B). Intratekalna primena shRNK-USP5, 24 sata pre incizije, signifikantno je umanjila gustinu T-struja merenih na telima senzornih neurona gangliona dorzalnih korenova, u poređenju sa ćelijama dobijenih iz grupe inciziranih pacova koji nisu primili nikakav tretman (jednofaktorska ANOVA, Tukey *post hoc* test,  $p=0,007$ ). Od izuzetnog je značaja napomenuti da se gustina T-struja izmerena na telima senzornih neurona gangliona dorzalnih korenova pacova tretiranih shRNK-USP5 nije značajno razlikovala od gustine T-struja izmerenih u kontrolnoj neinciziranoj grupi ( $p=0,96$ , jednofaktorska ANOVA).





**Slika 50.** Uticaj inhibicije sinteze USP5 na gustinu T-kalcijumovih struja u inaktivacionom protokolu. **(A)** T-struje ( $V_h$ ,  $-110$  mV;  $V_t$ ,  $-30$  mV) snimljene u reprezentativnim senzornim neuronima spinalnih gangliona u kontrolnih (crni zapis) i inciziranih pacova (crveni zapis), kao i pacova koji su 24 sata pre incizije primili intratekalno shRNK-USP5 (sivi zapis). **(B)** Gustina struja koje potiču od T-kanala u kontrolnih pacova (crni stubić), u inciziranih pacova 48 sati nakon incizije (crveni stubić) i 48 sati nakon incizije pacova koji su 24 sata pre incizije primili tretman shRNK-USP5 (sivi stubić). Svaki stubić predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u kontrolnoj grupi od 14 ćelija dobijenih iz 10 pacova, incizionoj grupi od 21 ćelije dobijene iz 10 pacova, i incizionoj grupi koja je primila shRNK-USP5 od 25 ćelija dobijenih iz 5 pacova od 10–13 miševa po grupi. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  jednofaktorska ANOVA, Tukey post hoc test) određena je poređenjem sve tri grupe međusobno.

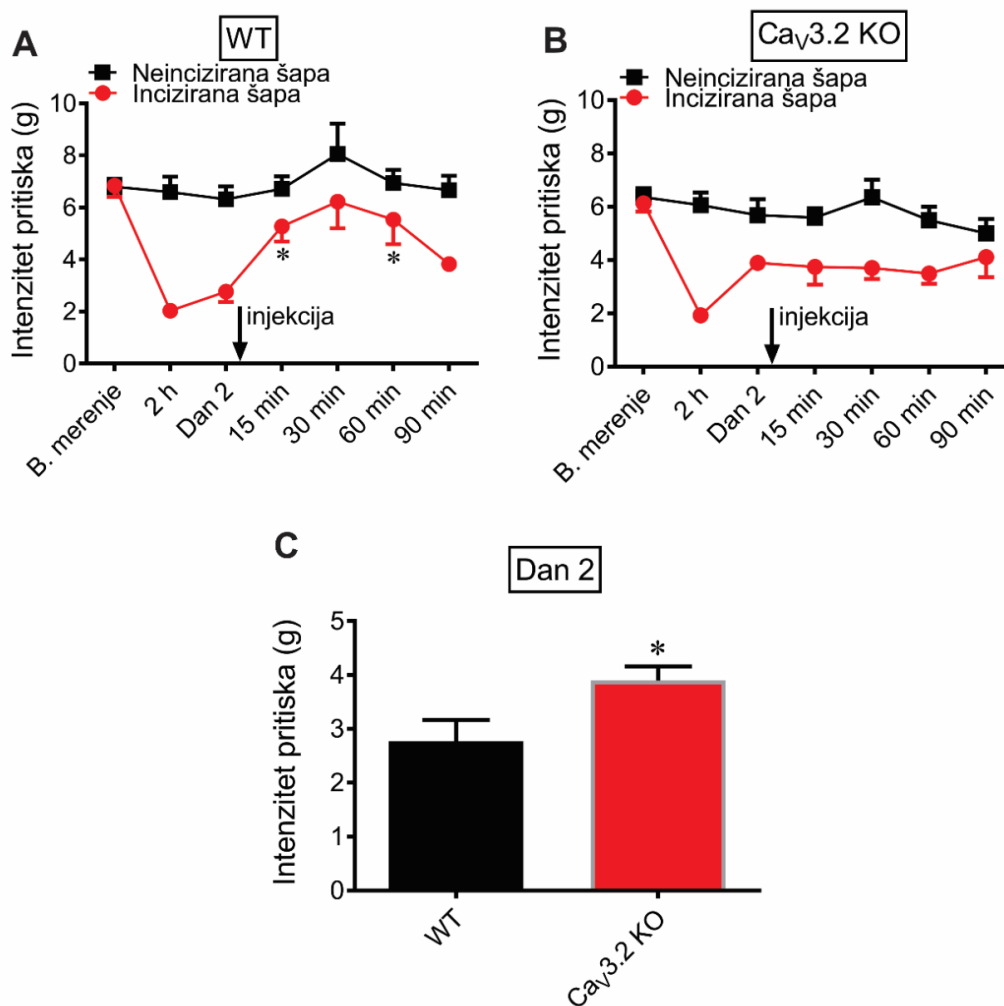
#### 4.4. Uticaj selektivne blokade veznog mesta USP5 enzima na T-kanalu primenom tat peptida

U cilju daljeg ispitivanja značaja interakcije između USP5 enzima i Cav3.2 kanala u razvoju hiperalgezije, ispitivani su *in vivo* efekti selektivnog tat peptida koji je konstruisan prema III–IV domenu Cav3.2 kanala, te sprečava vezivanje USP5 enzima za vezno mesto na pomenutom kanalu. Domen od interesa nalazi se na sekvenci III–IV T-kalcijumovog kanala, te je peptid od interesa nazvan **tat III–IV** (García-Caballero i sar., 2014).

Specifičnost i selektivnost tretmana prethodno je potvrđena u studiji u kojoj tat peptid specifičan za C-terminalni region kanala nije ispoljio analgetički efekat u inflamatornom i neuropatskom modelu bola (García-Caballero i sar., 2014). Intratekalna injekcija tat III–IV peptida primenjena drugog dana nakon incizije, signifikantno je smanjila hiperalgeziiju incizirane šape WT miša nakon injekcije, u

odnosu na bazalno merenje u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa ( $p=0,004$ ; jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Dunett *post hoc* test) (Slika 51A).

Nasuprot tome, u miševa u kojih je genetičkom manipulacijom uklonjen gen za Cav3.2 kanal, efekat tat peptida u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu miša je izostao ( $p=0,754$ ; jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjem) (Slika 51B). Od velikog značaja je i otkriće da se drugog dana nakon operacije u Cav3.2 KO miševa razvija signifikantno manja bazalna hiperalgezija (pre injekcije tat III–IV peptida), izmerena u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa u odnosu na WT miševe ( $p=0,04$ , t-test za nezavisne uzorke) (Slika 51C). Smanjena hiperalgezija u KO miševa ukazuje da oporavak nakon incizije započinje ranije kod ovih životinja, u odnosu na WT miševe. Dobijeni rezultati nedvosmisleno pokazuju da Cav3.2 kanali značajno utiču na razvoj hiperalgezije nakon incizije. Takođe efekat tat III–IV peptida na postincizionu hiperalgeziju korelira sa efektom koji je prethodno dobijen u inflamatornom i neuropatskom modelu bola (García–Caballero i sar., 2014).

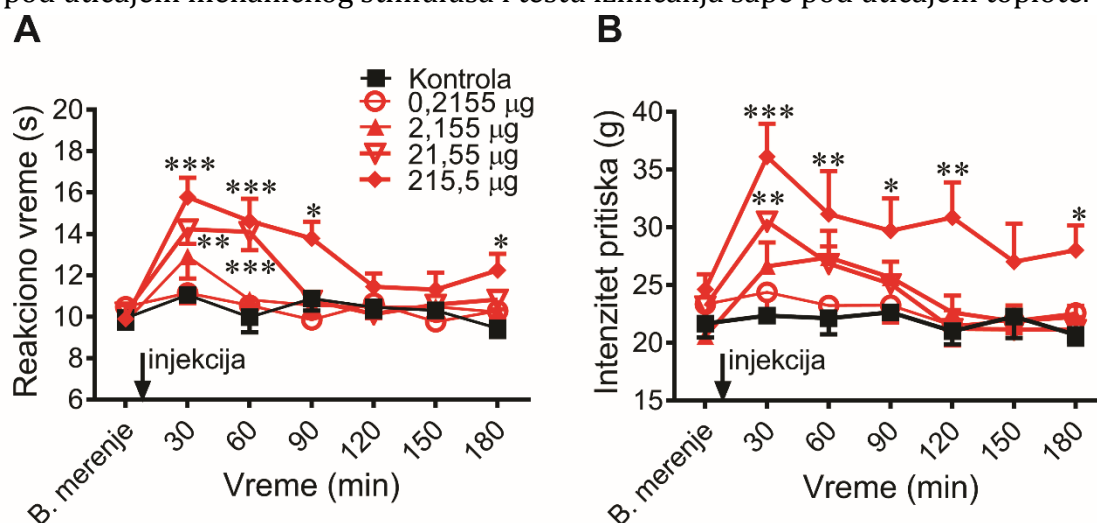


**Slika 51.** Efekat selektivne blokade vezivanja USP5 za Ca<sub>v</sub>3.2 na mehaničku hiperalgeziju nakon incizije primenom tat III–IV peptida. **(A)** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta tat III–IV peptida u testu mehaničke hiperalgezije. Mehanička hiperosetljivost na stimulus je merena 15, 30, 60, and 90 min nakon injekcije tat peptida kod inciziranih WT i Ca<sub>v</sub>3.2 KO miševa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6 miševa. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ , jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa Dunett post hoc testom) određena je u odnosu na kontrolnu grupu miševa. **(B)** Mehanička hiperosetljivost na stimulus je merena 15, 30, 60, and 90 min nakon injekcije tat peptida kod inciziranih Ca<sub>v</sub>3.2 KO miševa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6 miševa. Statistička značajnost (jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) određena je u odnosu na kontrolnu grupu miševa. **(C)** Razlika u bazalnim intenzitetima pritiska u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa WT i KO miševa drugog dana posle incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6 miševa. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ , t-test za nezavisne uzorke) određena je poređenjem ove dve grupe međusobno.

## 5. Efekti antagonista T-kanala u postincizionom modelu bola

### 5.1. Efekat TTA-P2 u zdravih pacova

Intratekalna primena TTA-P2 (0,2155, 2,155, 21,55 i 215,5  $\mu\text{g}$ ) je u zdravih pacova dovela do statistički značajnog (dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Bonferroni post hoc test; interakcija  $F(24,210)=3,39$ ;  $p<0,001$ ; tretman:  $F(4,35)=7,46$ ;  $p<0,001$ ) i dozno-zavisnog antinociceptivnog efekta u testu izmicanja šape pod uticajem toplote (Slika 52A). Sličan rezultat je zabeležen i u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa (interakcija  $F(24,198)=1,85$ ;  $p=0,012$ ; tretman:  $F(4,33)=7,18$ ;  $p<0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, sa Bonferroni *post hoc* testom) (Slika 52B). Životinje su 30 minuta nakon intratekalne injekcije rastvora TTA-P2 podvrgnute u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa i testu izmicanja šape pod uticajem toplote.



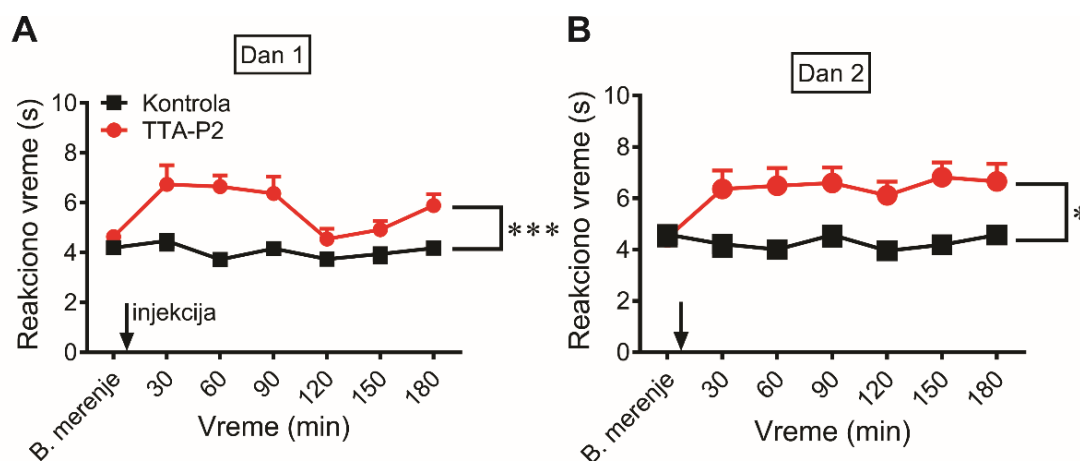
**Slika 52.** Vremenski tok antinociceptivnog efekta intratekalno primenjenog TTA-P2 u zdravih pacova. Antinociceptivni efekat je meren 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta nakon aplikacije. **(A)** Antinociceptivni efekat TTA-P2 u testu izmicanja šape pod uticajem toplote. **(B)** Antinociceptivni efekat TTA-P2 u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora obe šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6–10 pacova. Statistička značajnost (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Bonferroni post hoc test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

Maksimalni efekat postignut je sa dve najviše doze (215,5 i 21,55  $\mu\text{g}$ ), nakon 30 minuta od intratekalne injekcije u oba testa. Antinociceptivni efekat doze TTA-P2 od 21,55  $\mu\text{g}$  je perzistirao do 90 minuta nakon injekcije, dok je antinociceptivni efekat najviše doze bio statistički značajan i do 180 minuta nakon injekcije, u oba testa.

## 5.2. Efekat pojedinačne i ponovljene intratekalne primene TTA-P2 u postincizionom modelu bola u pacova

### 5.2.1. Efekat pojedinačne intratekalne primene TTA-P2 u postincizionom modelu bola u pacova

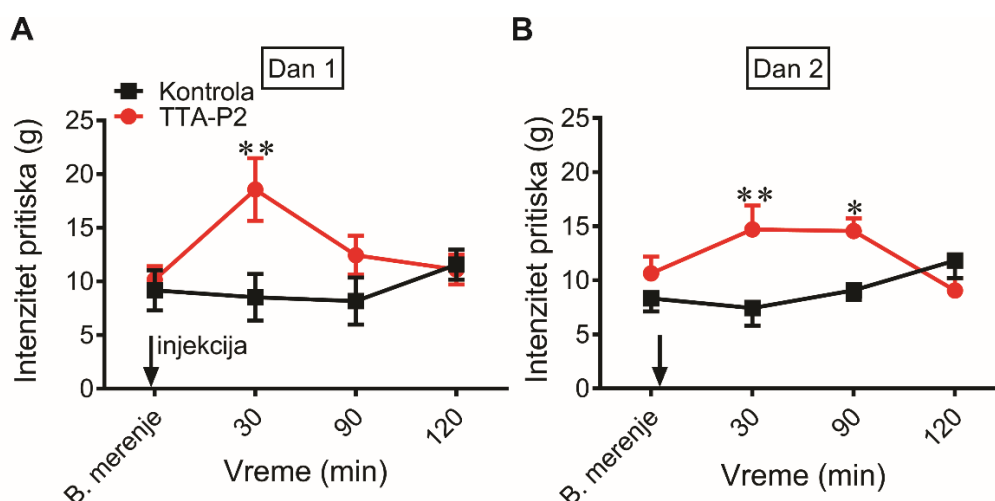
Intratekalno primenjen TTA-P2, u dozi od 215,5  $\mu\text{g}$ , prvog dana nakon incizije je statistički značajno umanjio hiperalgeziiju u testu izmicanja šape pod uticajem toplote (dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, tretman:  $F(1,16)=18,15$ ,  $p=0,001$ ) (Slika 53A). I u drugoj grupi pacova, koji su drugog dana nakon incizije primili TTA-P2 na isti način i u istoj dozi, efekat ovog antagoniste T-kalcijumovih kanala na hiperalgeziiju u istom testu je bio statistički značajan (dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, tretman:  $F(1,17)=7,73$ ,  $p=0,013$ ), u odnosu na kontrolnu grupu koja je primila rastvarač (Slika 53B).



**Slika 53.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta pojedinačne intratekalne primene TTA-P2 u inciziranih pacova u testu termičke hiperalgeziije. Tretman je primenjen različitim grupama pacova prvog i drugog dana nakon incizije, i antihiperalgezijski efekat je meren 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta nakon aplikacije. **(A)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem toplote prvog dana nakon incizije. **(B)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem toplote drugog dana nakon incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6–13 pacova. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, tretman Dan 1 nakon incizije:  $F(1,16)=18,15$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, tretman Dan 2 nakon incizije:  $F(1,17)=7,73$ ,  $p < 0,05$ ) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

Prvog i drugog dana nakon incizije, antihiperalgezijski efekat i.t. primenjenog TTA-P2 je bio vidljiv 30 minuta nakon injekcije i perzistirao je tokom 180 minuta merenja efekta. Intratekalno primenjen TTA-P2, u najvišoj dozi od 215,5  $\mu\text{g}$ , prvog

dana nakon incizije je statistički značajno (interakcija za Dan 1 nakon incizije:  $F(3,42)=4,142$ ,  $p=0,012$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Bonferroni *post hoc* test) umanjio hiperalgeziiju u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova 30 minuta nakon intratekalne injekcije tretmana (Slika 54A). U drugoj grupi pacova, ista doza primenjena drugog dana nakon incizije dovela je do statistički značajnog (interakcija za Dan 2 nakon incizije:  $F(2,24)=6,42$ ,  $p=0,0058$ ; tretman za Dan 2 nakon incizije:  $F(1,12)=7,03$ ,  $p=0,021$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Bonferroni *post hoc* test) smanjenja hiperalgeziije u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova (Slika 54B). Antihiperalgezijski efekat TTA-P2 drugog dana nakon incizije, je bio zabeležen 30 i 90 minuta nakon i.t. injekcije.

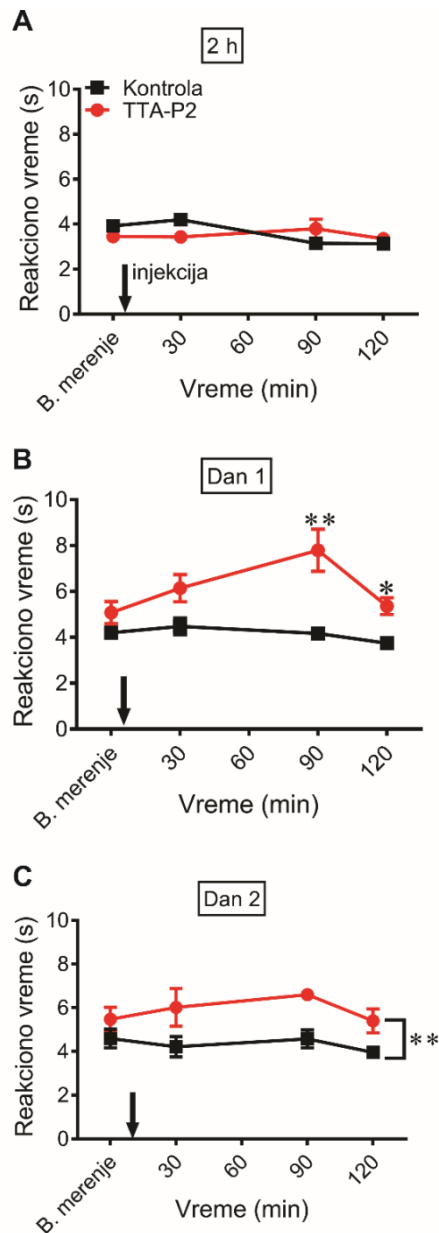


**Slika 54.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta pojedinačne intratekalne primene TTA-P2 u inciziranih pacova u testu mehaničke hiperalgeziije. Tretman je primenjen različitim grupama pacova prvog i drugog dana nakon incizije, i antihiperalgezijski efekat je meren 30, 90, i 120 minuta nakon aplikacije. **(A)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova prvog dana nakon incizije izražen je kao intenzitet pritiska. **(B)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova drugog dana nakon incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6–10 pacova. Statistička značajnost (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Bonferroni *post hoc* test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

### 5.2.2. Efekat ponovljene intratekalne primene TTA-P2 u postincizionom modelu bola u pacova

TTA-P2 primenjen intratekalno dva sata nakon incizije u dozi od 215,5  $\mu$ g, nije signifikantno umanjio hiperalgeziiju u pacova u testu izmicanja šape pod uticajem

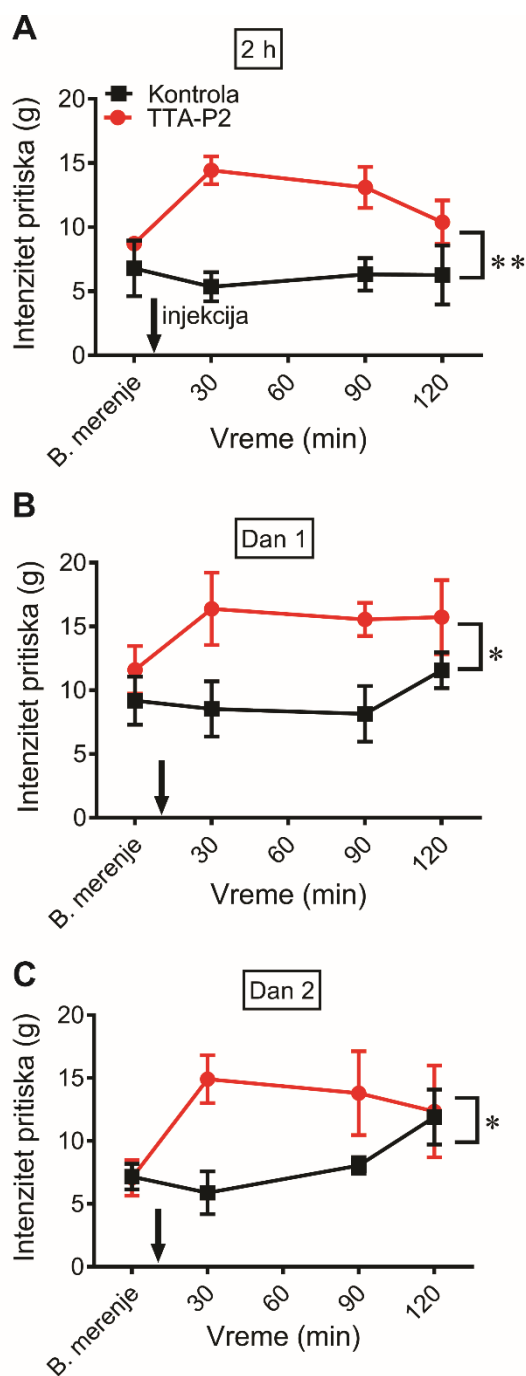
toplote ( $p=0,76$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) (Slika 55A). Međutim, nakon druge doze primenjene prvog postincizionog dana, i.t. TTA-P2 je doveo do značajnog antihiperlgezijskog efekta ( $p=0,003$  i  $p=0,026$  respektivno; Mann-Whitney test) u testu izmicanja šape pod uticajem toplote (Slika 55B). Prvog dana posle incizije, antihiperlgezijski efekat TTA-P2 je bio najveći 90 minuta nakon injekcije. Statistički značajan efekat (tretman Dan 2 nakon incizije:  $F(1,13)=9,75$   $p=0,008$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) je zabeležen u istoj grupi pacova, koji su i drugog dana nakon incizije primili istu dozu TTA-P2 intratekalno (Slika 55C). Drugog dana nakon incizije efekat TTA-P2 je perzistirao tokom 120 minuta merenja.



**Slika 55.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta ponovljene intratekalne primene TTA-P2 u inciziranih pacova u testu termičke hiperalgezije. Tretman je primenjen u jednoj dozi 2 sata, prvog i drugog dana nakon incizije, i antihiperalgezijski efekat je meren 30, 60, 90 i 120 minuta nakon aplikacije. **(A)** Odsustvo antihiperalgezijskog efekta tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem toplote dva sata nakon incizije. **(B)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem toplote prvog dana nakon incizije. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Mann-Whitney test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu. **(C)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem toplote drugog dana nakon incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6–9 pacova. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

TTA-P2 primenjen intratekalno dva sata nakon incizije u dozi od 215,5  $\mu$ g, je signifikantno umanjio mehaničku hiperalgeziju u pacova (tretman 2 h posle incizije (1,10)=19,70,  $p=0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) (Slika 56A) u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa.



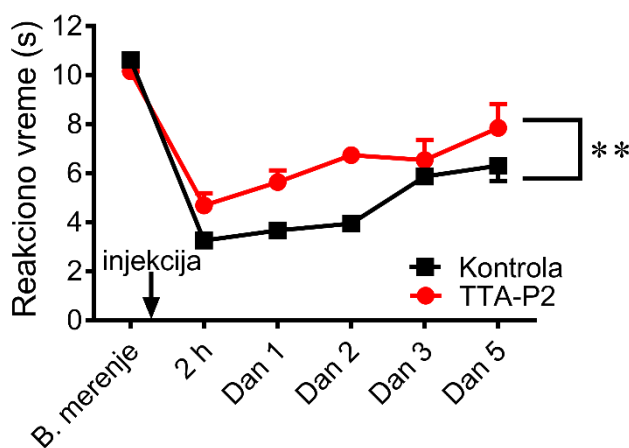


**Slika 56.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta ponovljene intratekalne primene TTA-P2 u inciziranih pacova u testu mehaničke hiperalgezije. Tretman je primenjen u jednoj dozi 2 sata, prvog i drugog dana nakon incizije, i antihiperalgezijski efekat je meren 30, 60, 90 i 120 minuta nakon aplikacije. **(A)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova dva sata nakon incizije **(B)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova prvog dana nakon incizije. **(C)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova drugog dana nakon incizije. U testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 5–6 pacova. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

Najviši antihiperalgezijski efekat zabeležen je 30 minuta nakon injekcije. Nakon druge doze primenjene prvog dana istoj grupi životinja, takođe je zabeležen značajan antihiperalgezijski efekat i.t. primenjenog TTA-P2 (dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, tretman Dan 1 nakon incizije:  $F(1,10)=8,73$ ,  $p=0,014$ ) u istom testu (Slika 56B). TTA-P2 primenjen prvog dana nakon incizije ispoljava najveći antihiperalgezijski efekat 30 minuta nakon injekcije, koji perzistira do kraja perioda merenja (do 120 minuta). Statistički značajan efekat (tretman Dan 2 nakon incizije:  $F(1,9)=7,08$ ,  $p=0,026$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) i.t. primenjenog TTA-P2 u trećoj dozi istoj grupi pacova, zabeležen je i drugog dana nakon incizije (Slika 56C).

### **5.3. Efekat pojedinačne preventivne intratekalne primene TTA-P2 u postincizionom modelu bola u pacova**

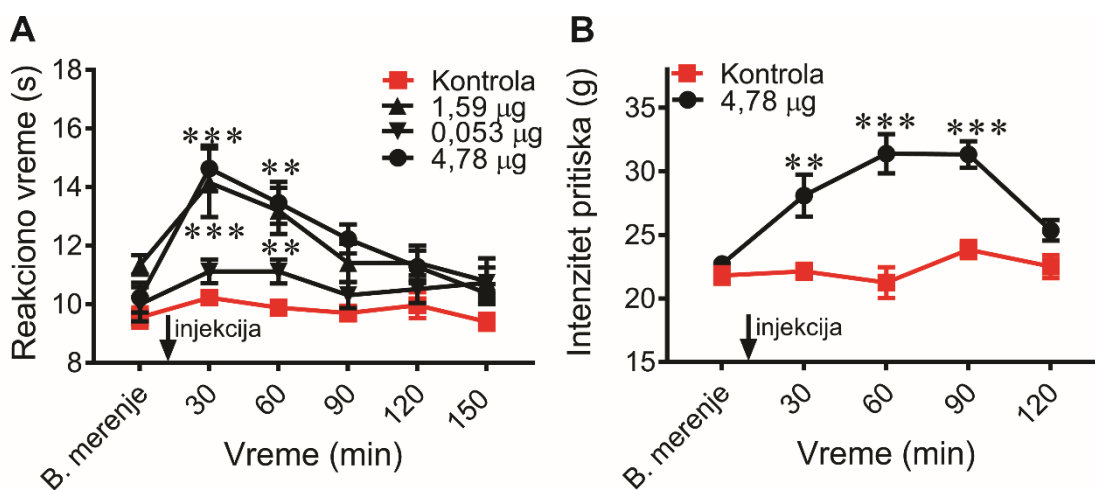
TTA-P2 primenjen intratekalno neposredno pre izvođenja incizione operacije, doveo je do statistički značajnog smanjenja termičke hiperalgezije već dva sata nakon operacije (interakcija:  $F(4,56)=1,16$ ;  $p=0,3$ ; tretman:  $F(1,14)=17,61$ ,  $p=0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima). Antihiperalgezijski efekat je bio vidljiv tokom narednih 5 dana merenja (Slika 57). Poređenja su vršena u odnosu na kontrolnu grupu. Antihiperalgezijski efekat preventivno primenjenog TTA-P2 je bio uočljiv do petog dana nakon incizije, međutim vreme potrebno da se osetljivost na termički stimulus u testu izmicanja šape pod utcajem toplote vrati na preoperativnu vrednost je ostalo nepromenjeno. U testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova, preventivna primena TTA-P2 nije ispoljila statistički značajan efekat ( $p=0,92$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, nije prikazano).



**Slika 57.** Vremenski tok antihiper-algezijskog efekta preventivno primenjenog TTA-P2 na termičku hiper-algeziju nakon incizije. Bazalna merenja su izvršena tokom dva dana pre operacije, dok je TTA-P2 (16  $\mu\text{g}$  u 50  $\mu\text{L}$  i.t.) primenjen neposredno pre izvođenja hirurške incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM, u grupi od 8 pacova. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) određena je u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

#### 5.4. Efekat epipregnanolona u zdravih pacova

Intratekalna primena epipregnanolona je u zdravih pacova dovela do statistički značajnog (interakcija;  $F(12,144)=2,49$ ;  $p=0,0053$ ; tretman:  $F(3,36)=7,12$ ;  $p < 0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak *post hoc*) i dozno-zavisnog antinociceptivnog efekta u testu izmicanja šape pod uticajem toplote (Slika 58A). Epipregnanolon je ispitivan u tri doze (0,053, 1,59 i 4,78  $\mu\text{g}$ ) injektovane u volumenu od 50  $\mu\text{L}$ .

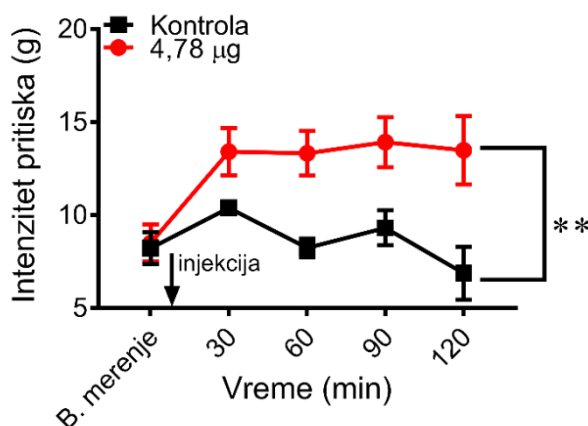


**Slika 58.** Vremenski tok antinociceptivnog efekta intatekalno primenjenog epipregnanolona u zdravih pacova. **(A)** U testu termičke nocicepcije tretman je primenjen u 3 doze, i antinociceptivni efekat je meren 30, 60, 90, 120 i 150 minuta nakon aplikacije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora obe šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 9–12 pacova. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak *post hoc* test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu. **(B)** U testu mehaničke nocicepcije epipregnanolon je primenjen u jednoj dozi, i antinociceptivni efekat je meren 30, 60, 90 i 120 minuta nakon aplikacije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora obe šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 5–7 pacova. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Bonferoni *post hoc* test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

U testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova, epipregnanolon je u najvišoj dozi od 4,78  $\mu\text{g}$  pokazao statistički značajan antinociceptivni efekat (interakcija  $F(3,30)=3,49$ ;  $p=0,028$ ; tretman:  $F(1,10)=43,43$ ;  $p<0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, sa Sidak *post hoc* testom) (Slika 58B). Trideset minuta nakon intratekalne injekcije epipregnanolona, pacovi su podvrgnuti testu izmicanja šape pod uticajem toplote i u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa. Antinociceptivno dejstvo epipregnanolona bilo je evidentno u oba testa tokom 90 minuta od intratekalne injekcije. Maksimalni efekat postignut je nakon 30 minuta od intratekalne injekcije u testu termičke nocicepcije, dok je maksimalni efekat najviše doze od 4,78  $\mu\text{g}$  u testu izmicanja šape pod uticajem toplote postignut tokom 60 i 90 minuta od intratekalne injekcije.

### 5.5. Efekat pojedinačne intratekalne primene epipregnanolona u postincizionom modelu bola u pacova

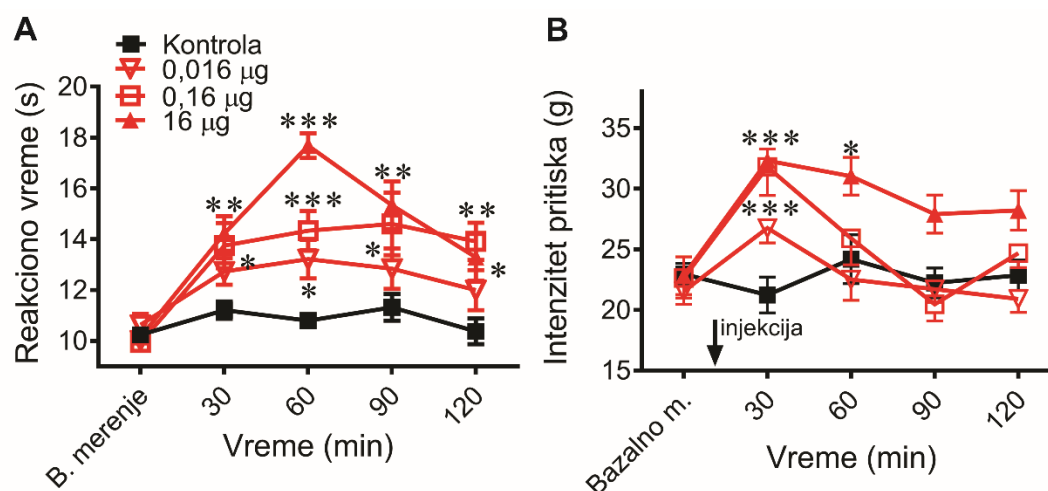
Intratekalno primenjen epipregnanolon, u dozi od 4,78  $\mu\text{g}$  prvog dana nakon incizije značajno je umanjio hiperalgeziiju u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova (dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, tretman Dan 1 nakon incizije:  $F(1,9)=15,01$ , egzaktna vrednost  $p=0,004$ ) (Slika 59).



**Slika 59.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta pojedinačne intratekalne primene epipregnanolona u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova prvog dana nakon incizije. Tretman je primenjen u jednoj dozi prvog dana nakon incizije, i antihiperalgezijski efekat je meren 30, 60, 90, i 120 minuta nakon aplikacije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 4–7 pacova. Statistička značajnost (\*\* $p<0,01$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

## 5.6. Efekat intratekalno primenjenog $3\beta$ -OH u zdravih pacova

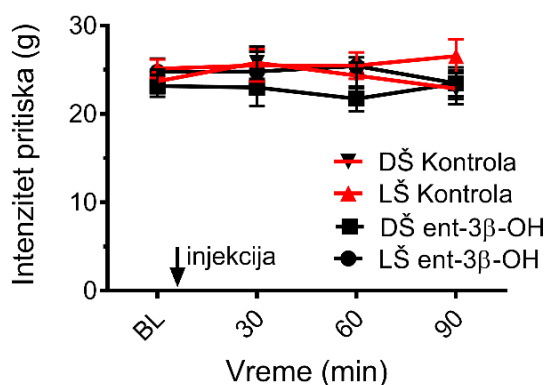
Intratekalna primena  $3\beta$ -OH (0,016, 0,16 i 16  $\mu$ g) je u zdravih pacova dovela do statistički značajnog (interakcija  $F(9,99)=2,56$ ;  $p=0,011$ ; tretman:  $F(3,24)=17,32$ ;  $p<0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Tukey *post hoc*) i dozno-zavisnog antinociceptivnog efekta u testu izmicanja šape pod uticajem toplote (Slika 60A). Sličan rezultat je zabeležen i u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu (interakcija  $F(9,72)=2,18$ ;  $p=0,003$ ; tretman:  $F(3,24)=17,32$ ;  $p<0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Tukey *post hoc* test) (Slika 60B). Statistička značajnost je određena u odnosu na kontrolnu grupu koja je primila rastvarač. Životinje su 30 minuta nakon intratekalne injekcije rastvora  $3\beta$ -OH podvrgnute merenjima osetljivosti na termički i mehanički stimulus. Antinociceptivno dejstvo  $3\beta$ -OH bilo je evidentno tokom 120 minuta u testu termičke, odnosno 60 minuta u testu mehaničke nocicepcije nakon intratekalne injekcije. Maksimalni efekat postignut je nakon 60 minuta u testu termičke, odnosno 30 minuta od intratekalne injekcije u testu mehaničke nocicepcije.



**Slika 60.** Vremenski tok antinociceptivnog efekta intratekalno primenjenog  $3\beta$ -OH u zdravih pacova. Tretman je primenjen u 3 doze, i antinociceptivni efekat je meren 30, 60, 90 i 120 minuta nakon aplikacije. **(A)** Antinociceptivni efekat  $3\beta$ -OH u testu izmicanja šape pod uticajem toplote. **(B)** Antinociceptivni efekat  $3\beta$ -OH u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora obe šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6–11 pacova. Statistička značajnost (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Tukey *post hoc* test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

### 5.6.1. Uticaj stereoselektivnosti na antinociceptivni efekat $3\beta$ -OH u zdravih pacova

Intratekalna primena enantiomera  $3\beta$ -OH (ent- $3\beta$ -OH) u neinciziranih pacova nije dovela do antinociceptivnog efekta u testu mehaničke hiperosetljivosti ( $p=0,23$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) (Slika 61). Ent- $3\beta$ -OH je primenjen u dozi od 16  $\mu$ g, a merenja reakcije životinje u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova vršena su 30, 60 i 90 minuta nakon intratekalne injekcije.

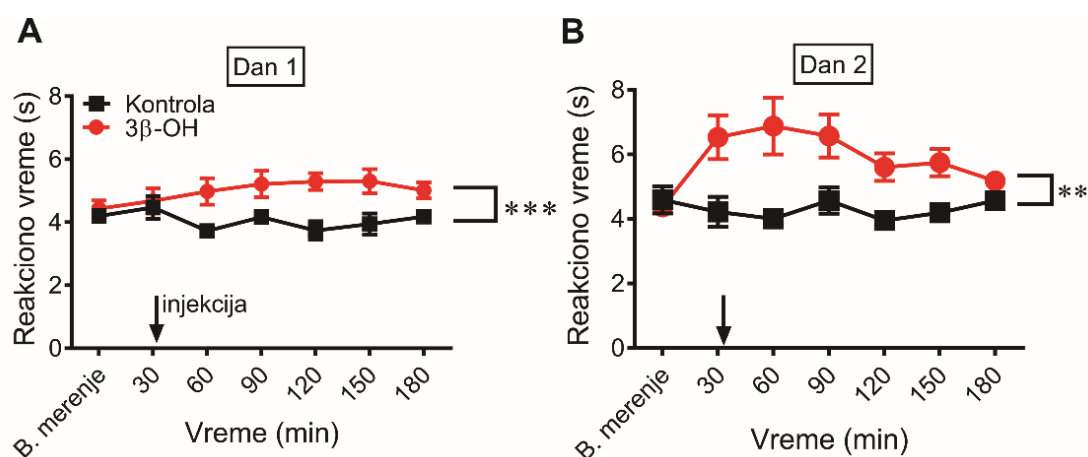


**Slika 61.** Odsustvo antinociceptivnog efekta intratekalno primenjenog ent- $3\beta$ -OH u zdravih pacova. U testu mehaničke nocicepcije svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora obe šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6–8 pacova.

### 5.7. Efekat pojedinačne i ponovljene intratekalne, kao i ponovljene intraplantarne primene $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola u pacova

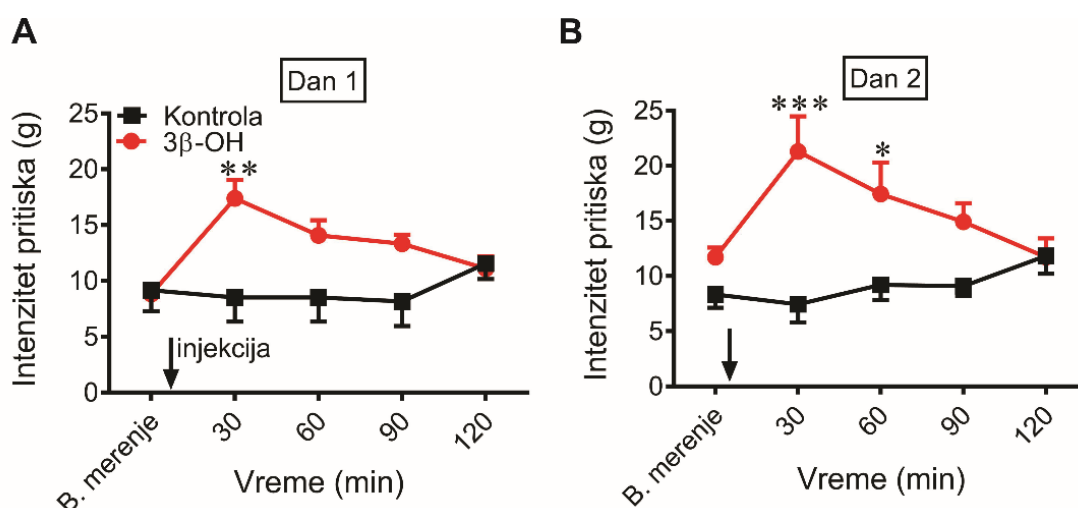
#### 5.7.1. Efekat pojedinačne intratekalne primene $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola u pacova

Intratekalno primenjen  $3\beta$ -OH, u dozi od 16  $\mu$ g prvog dana nakon incizije je statistički značajno ( $p<0,001$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, tretman:  $F(1,10)=27,57$ ) umanjio hiperalgeziju u testu izmicanja šape pod uticajem toplote (Slika 62A). Ista doza je u drugoj grupi pacova primenjena drugog dana nakon incizije, i takođe je dovela do statistički značajnog (tretman:  $F(1,12)=11,75$ ,  $p<0,01$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) smanjenja hiperalgezije u testu izmicanja šape pod uticajem toplote (Slika 62B).



**Slika 62.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta pojedinačne intratekalne primene 3β-OH u inciziranih pacova u testu termičke hiperalgezije. Tretman je primenjen u jednoj dozi prvog i drugog dana nakon incizije, i antihiperalgezijski efekat je meren 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta nakon aplikacije. **(A)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem toplote prvog dana nakon incizije. **(B)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem toplote drugog dana nakon incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape ± SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6–8 pacova. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima,) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

Intratekalno primenjen 3β-OH, u dozi od 16 μg prvog dana nakon incizije je značajno umanjio hiperalgeziju u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa (interakcija:  $F(3,36)=4,41$ ,  $p=0,009$ , tretman:  $F(1,12)=8,85$ ,  $p=0,012$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa Sidak *post hoc* testom,) (Slika 63A). Ista doza je u drugoj grupi pacova primenjena drugog dana nakon incizije, i takođe je dovela do statistički značajnog (tretman:  $F(1,17)=7,73$ ,  $p=0,013$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) smanjenja hiperalgezije u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa (Slika 63B).

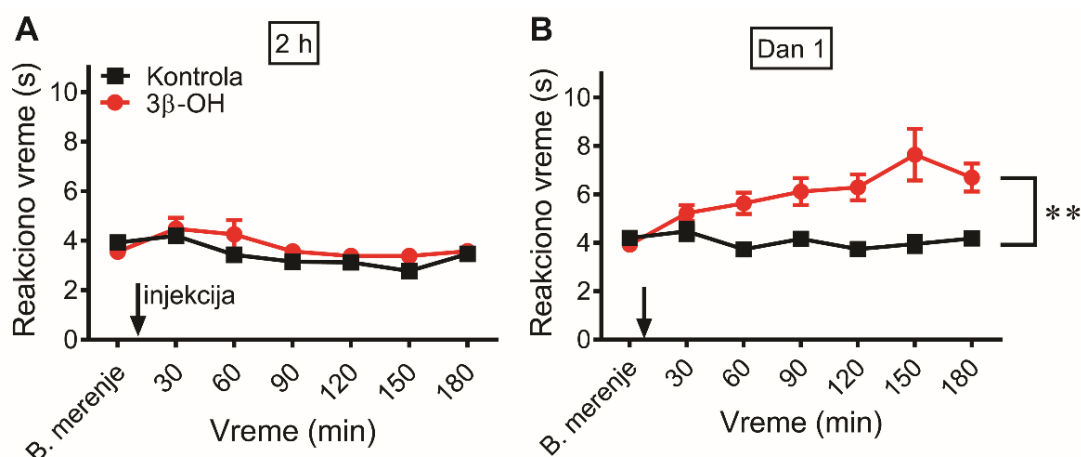


**Slika 63.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta pojedinačne intratekalne primene  $3\beta$ -OH u inciziranih pacova u testu mehaničke hiperalgezije. Tretman je primenjen u jednoj dozi prvog i drugog dana nakon incizije, i antihiperalgezijski efekat je meren 30, 60, 90 i 120 minuta nakon aplikacije. **(A)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa prvog dana nakon incizije. **(B)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa drugog dana nakon incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od po 6–8 pacova. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak post hoc test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

### 5.7.2. Efekat ponovljene intratekalne primene $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola u pacova

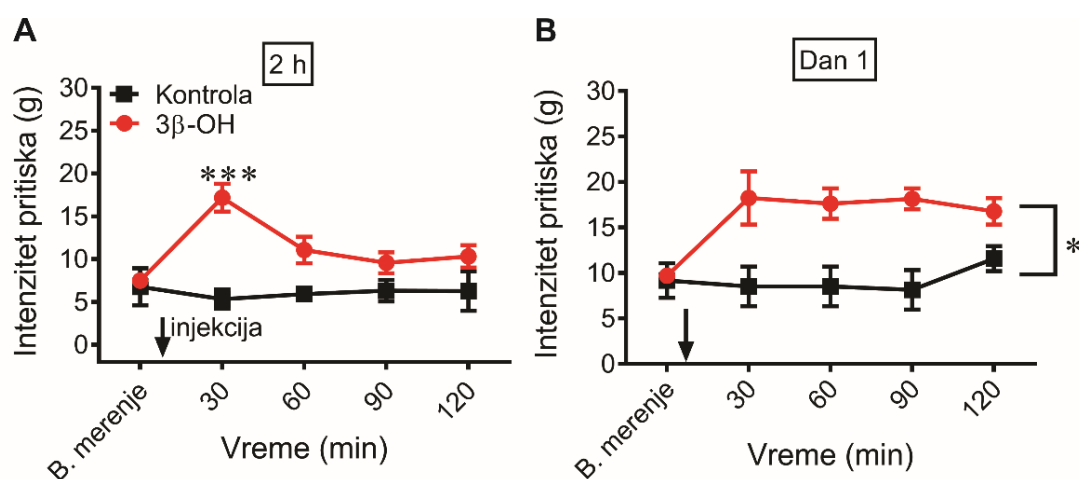
Nakon intratekalne primene u dozi od 16  $\mu$ g, 2 sata nakon incizije,  $3\beta$ -OH nije signifikantno umanjio termičku hiperalgeziiju u pacova ( $p = 0,28$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) (Slika 64A). Međutim, nakon ponovljene primene iste doze, sledećeg (prvog) dana nakon incizije,  $3\beta$ -OH je ispoljio značajan antihiperalgezijski efekat ( $p = 0,002$ ; Mann–Whitney test) u testu izmicanja šape pod uticajem toplote (Slika 64B). Antihiperalgezijski efekat druge doze  $3\beta$ -OH bio je vidljiv tokom 180 minuta merenja. Štaviše, tokom 180 minuta merenja, nije primećeno smanjenje antihiperalgezijskog efekta.





**Slika 64.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta ponovljene intratekalne primene  $3\beta$ -OH u inciziranih pacova u testu termičke hiperalgezije. Tretman je primenjen u jednoj dozi 2 sata i prvog dana nakon incizije, i antihiperalgezijski efekat je meren 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta nakon aplikacije. **(A)** Odsustvo antihiperalgezijskog efekta tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem toplote dva sata nakon incizije. **(B)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem toplote prvog dana nakon incizije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6–13 pacova. Statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ; Mann–Whitney test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

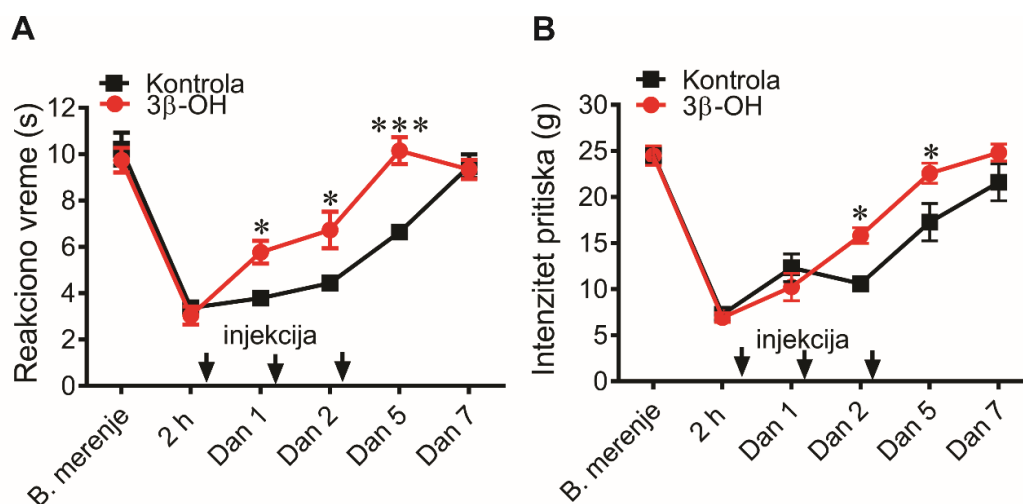
U testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa  $3\beta$ -OH primenjen dva sata nakon incizije intratekalno u dozi od  $16 \mu\text{g}$ , je ispoljio statistički značajan antihiperalgezijski efekat (interakcija:  $F(3,36)=5,36$ ,  $p=0,004$ ; tretman:  $F(1,12)=15,64$ ,  $p=0,002$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa Sidak *post hoc* testom) (Slika 65A). Takođe nakon ponovljene primene ovog neurosteroida, u istoj dozi, prvog dana nakon incizije, u istoj grupi pacova je zabeležen statistički signifikantan antihiperalgezijski efekat ( $p=0,029$ , Mann–Whitney test) (Slika 65B).



**Slika 65.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta ponovljene intratekalne primene  $3\beta$ -OH u inciziranih pacova u testu mehaničke hiperalgezije. Tretman je primenjen u jednoj dozi 2 sata i prvog dana nakon incizije, i antihiperalgezijski efekat je meren 30, 60, 90 i 120 minuta nakon aplikacije. **(A)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa dva sata nakon incizije. **(B)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa prvog dana nakon incizije. U testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6–8 pacova. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak post hoc test; Mann–Whitney test) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

### 5.7.3. Efekat ponovljene intraplantarne primene $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola u pacova

Doza  $3\beta$ -OH od 16  $\mu$ g, primenjena intraplantarano 2 sata, kao i prvog i drugog dana istoj grupi životinja nakon incizije, postigla je statistički značajno smanjenje osetljivosti incizirane šape na termički stimulus (interakcija:  $F(3,36)=4,93$ ,  $p=0,006$ ; tretman:  $F(1,12)=17,28$ ,  $p=0,001$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak post hoc test) u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 66A).



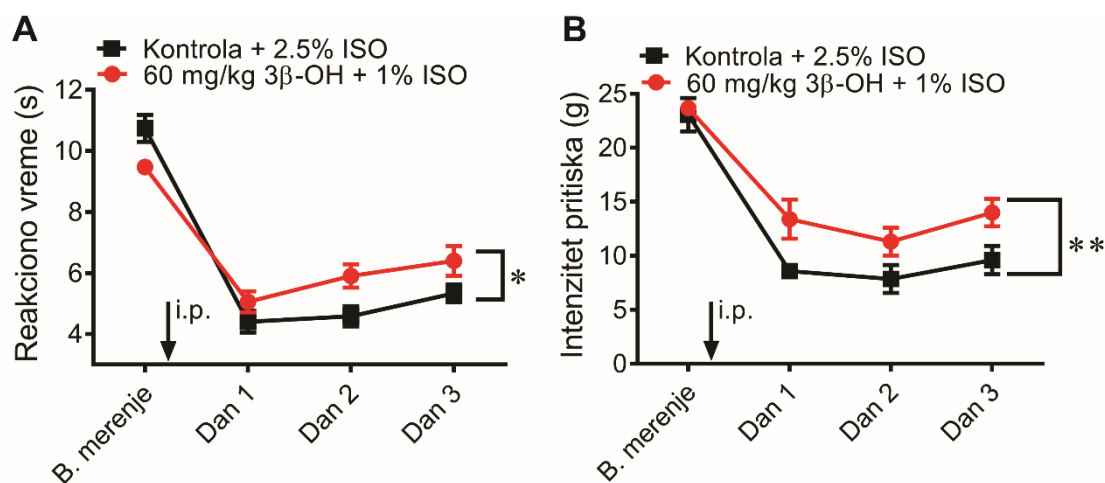
**Slika 66.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta ponovljene intraplantarne primene 3β-OH u inciziranim pacova. Tretman je primenjen 2 sata, kao i prvog i drugog dana nakon incizije, i antihiperalgezijski efekat je meren 2 h, kao i prvog, drugog, petog i sedmog dana nakon aplikacije. **(A)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu osetljivosti šape na termički stimulus. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape ± SEM, u kontrolnoj i test grupi od 6–8 pacova. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa Sidak post hoc testom) određena je u odnosu na kontrolnu grupu. **(B)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape ± SEM, u kontrolnoj i test grupi od po 6 pacova. Statistička značajnost (\* $p < 0,05$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa Sidak post hoc testom) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

Sličan antihiperalgezijski efekat je primećen i u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa (interakcija:  $F(3,30)=3,45$ ,  $p=0,029$ ; tretman:  $F(1,10)=6,43$ ,  $p=0,029$ ; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa Sidak post hoc testom) (Slika 66B). Od izuzetnog značaja je nalaz da osetljivost na termički i mehanički stimulus životinja koje su primile tretman 3β-OH odgovara vrednostima osetljivosti pre incizije u oba testa. Za razliku od pacova koji su primili 3β-OH, u pacova koji su primili vehikulum hiperalgezija je bila evidentna do sedmog dana.

### 5.8. Efekat pojedinačne preventivne intraperitonealne primene 3β-OH u postincizionom modelu bola u pacova

Preventivna intraperitonealna aplikacija 3β-OH dovela je do značajnog smanjenja termičke (dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa Sidak post hoc testom; tretman:  $F(1,20)=5,10$ ,  $p=0,035$ ) i mehaničke (dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Sidak post hoc test; tretman:  $F(1,8)=11,69$ ,  $p=0,009$ ) hiperalgezije u pacova koji su bili anestetizirani intraperitonealnim 3β-OH,

primenjenim u dozi od 60 mg/kg, i 1% izofluranom (Slika 67A i 67B). Poređenje je vršeno u odnosu na kontrolnu grupu koja je anestezirana na uobičajen način, tj. primenom 2,5% izoflurana. Tokom tri dana merenja antihiperalgezijskog efekta, efekat intraperiotentalno primenjenog 3 $\beta$ -OH je perzistirao. Bitno je napomenuti da je intraperiotentalno primenjeni 3 $\beta$ -OH ispoljio izraženiji efekat u u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa, u odnosu na efekat u testu termičke osetljivosti.



**Slika 67.** Vremenski tok antihiperalgezijskog efekta preventivno primenjenog 3 $\beta$ -OH za izvođenje hirurške incizije u pacova. Treatment je primenjen i.p. i antihiperalgezijski efekat je meren prvog, drugog i trećeg dana nakon aplikacije. **(A)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem toplote. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od 9–13 pacova. Statistička značajnost ( $*p < 0,05$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa Sidak post hoc testom) određena je u odnosu na kontrolnu grupu. **(B)** Antihiperalgezijski efekat tretmana meren u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa. U testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa svaka tačka predstavlja srednju vrednost odgovora šape  $\pm$  SEM, u kontrolnoj i test grupi od po 5 pacova. Statistička značajnost ( $**p < 0,01$ , dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa Sidak post hoc testom) određena je u odnosu na kontrolnu grupu.

## 6. Efekat primenjenih antagonista T-kanala na motornu sposobnost pacova

TTA-P2 u najvišoj dozi (215,5  $\mu$ g i.t.) nije uticao na motornu sposobnost pacova u testovima izdržaja životinje na ravnoj površini pod uglom, uzdignutoj platformi i hodanju po gredi. Isti rezultat je dobijen sa epipregnanolonom primenjenim u dozi od 4,78  $\mu$ g i.t., kao i sa 3 $\beta$ -OH, koji u dozi od 16  $\mu$ g i.t., takođe nije uticao na motornu spretnost životinja ni u jednom od korišćenih testova.

## V. DISKUSIJA

U prvom delu istraživanja ispitana je *in vivo* uloga T-kanala u akutnom postincizionom modelu bola.

### 1. Uloga T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova i miševa

Incizija kože i plantarnog mišića zadnje šape pacova i miševa u postincizionom modelu bola dovodi do razvoja bolne hiperosetljivosti – hiperalgezije (Slike 30A, 30B i 31). Razvoj hiperalgezije u postincizionom modelu bola korelira sa prethodno publikovanim rezultatima (Pogatzki i sar., 2002, Brennan i sar., 1996).

Bolna hiperosetljivost na termički i mehanički stimulus detektovana je već 2 sata nakon incizije (Slika 30A i 30B) i trajala je tokom 6 dana postoperativnog oporavka u testu termičke, odnosno 5 dana u testu mehaničke nocicepcije u pacova. U WT miševa, mehanička hiperalgezija nakon incizije takođe se razvila 2 sata nakon operacije i trajala je tokom narednih 5 dana (Slika 31).

U slučaju Cav3.2 KO miševa, kod kojih je obrisan gen za Cav3.2 kalcijumov kanal, nakon incizije je takođe primećena bolna hiperosetljivost na mehanički stimulus. Međutim, mehanička hiperalgezija je trajala samo dva dana nakon operacije, za razliku od WT miševa (Slika 32), što jasno ukazuje na značajan doprinos ovog podtipa T-kanala u razvoju hiperalgezije u postincizionom modelu bola.

Mehanizam razvoja postincizionog bola je nedovoljno razjašnjen. Pokazano je da antagonisti NMDA receptora primenjeni spinalno ne dovode do smanjenja postoperativne mehaničke hiperalgezije u pacova (Zahn i Brennan, 1998), na osnovu čega je moguće zaključiti da ovi receptori na nivou zadnjih rogova sive mase kičmene moždine ne doprinose razvoju postincizione hiperalgezije.

Poznato je da i jonotropni AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionska kiselina) receptori koji se nalaze u superficijalnom sloju zadnjih rogova sive mase kičmene moždine (Popratiloff i sar., 1996), kao i kainatni receptori, doprinose prenosu bolne informacije na spinalnom nivou. Studije su pokazale da su

ovi ne-NMDA ekscitatorni receptori neophodni za prenos informacije pod uticajem noksičnog i nenoksičnog mehaničkog stimulusa na nivou zadnjih rogova sive mase kičmene moždine (Dougherty i sar., 1992; Neugebauer i sar., 1993). U kontekstu ovih nalaza, intratekalno primenjeni antagonisti AMPA i kainatskih receptora, kao što su DNQX i NBQX, smanjili su mehaničku hiperalgeziju nakon incizije u pacova (Zahn i sar., 1998). Na osnovu navedenog, moguće je da intratekalna primena antagonista non-NMDA receptora smanjuje bolni odgovor pacova u postincizionom modelu bola u bihevioralnim testovima usled sprečavanja prenosa informacije o bolu sa primarnih na sekundarne neurone bolnog puta. Takođe Cumberbatch i sar. (1994) su pokazali da aktivacija AMPA i kainatskih receptora na nivou neurona zadnjih rogova povećava aktivnost ovih neurona pod uticajem mehaničkog stimulusa. Konačno, moguće je da sam postincizioni model bola dovodi do povećanog oslobađanja ekscitatornih aminokiselina koje aktiviraju ne-NMDA receptore i posledično povećavaju aktivnost neurona zadnjih rogova sive mase kičmene moždine, što dodatno potvrđuje primećenu efikasnost antagonista ovih receptora.

Zahn i sar. (1997) su ispitivali efekte supkutano i intratekalno primenjenog morfina na razvoj mehaničke hiperalgezije na dan, kao i dan posle hirurške incizije u pacova. Njihovi rezultati su pokazali da bez obzira na put primene, morfin primenjen neposredno posle, kao i jedan dan nakon operacije dovodi do antihiperalgezijskog efekta u inciziranih pacova. Ovaj nalaz nije iznenađujuć, s obzirom da je poznato da neuroaksijalna primena opioida dovodi do ublažavanja postoperativnog bola kod pacijenata (Brennum i sar., 1993).

U kontekstu mehanizma, poznato je da primena opioida dovodi do analgetičkog efekta na spinalnom, kao i na supraspinalnom nivou. Na spinalnom nivou, opioidni receptori su prevashodno zastupljeni u superficijalnim laminama I i II zadnjih rogova sive mase kičmene moždine, i to presinaptički (70%) na centralnim terminalima primarnih nociceptivnih aferenata C i A $\delta$  podtipa (Besse i sar., 1990). Aktivacija presinaptičkih opioidnih receptora inhibira oslobađanje neurotransmitera kao što su supstanca P i CGRP (Go i Yaksh, 1987) čime se sprečava dalji prenos nociceptivne informacije. Stoga je moguće da u postincizionom modelu bola intratekalna primena morfina dovodi do smanjenja oslobađanja

neurotransmitera iz nociceptivnih aferenata, te posledično do smanjenja nociceptivne transmisije.

Već je pomenuto u Uvodu da su na supraspinalnom nivou najvažniji centri uticaja opioida periakveduktalna siva masa (PAG) i rostroventralna medula (RVM). Injekcije morfina u bilo koji od ova dva centra dovodi do antinocicepcije usled povećanja aktivnosti descendentnih inhibitornih puteva koji potiču iz ovih centara, a koji ispoljavaju svoj efekat na nivou zadnjih rogova sive mase kičmene moždine (Yaksh, 1997). Na osnovu navedenog, moguće je da primećeni antihiperalgzijski sistemski efekat morfina u postincizionom modelu bola nastaje usled morfinom aktivirane descendentne inhibicije iz PAG i RVM.

S druge strane, Li i sar. (2001) su pokazali da preoperativna hronična primena opioida može dovesti do pogoršanja postoperativne hiperalgzije u postincizionom modelu bola u pacova. Autori ove studije smatraju da primećeno pogoršanje postoperativne hiperalgzije najverovatnije nastaje usled modulacije bazalne nocicepcije životinja koje su hronično tretirane morfinom. Dodatna ispitivanja su neophodna kako bi se detaljno razjasnili mehanizmi nastanka hiperalgzije indukovane opioidima.

Uloga voltažno-zavisnih jonskih kanala u razvoju hiperalgzije u postincizionim modelima bola ispitana je u malom broju studija. Pokazano je da antagonisti kalcijumovih kanala N-tipa, kao i kanala koji sadrže  $\alpha_2\delta$  podjedinicu, ublažavaju hiperalgziju u ovim modelima bola (Wang i sar., 2000; Whiteside i sar., 2004), ukazujući na značaj i ovih kanala u razvoju postincizione hiperalgzije. Međutim, poznato je da antagonisti N-tipa kalcijumovih kanala ispoljavaju sistemske neželjene efekte kao što su mučnina, nesvestica, nistagmus, retencija urina, poremećaj memorije i halucinacije (Bourinet i Zamponi, 2017), te je stoga njihova upotreba limitirana na lokalnu. Takođe je važno spomenuti i da Nav1.7 podtip natrijumovih kanala učestvuje u razvoju perzistentnog bola nakon hirurške incizije butnog mišića i kože (Sun i sar., 2018). Poznato je da lokalni anestetici kao što je lidokain, ostvaruju svoj analgetički efekat neselektivno blokirajući natrijumove kanale (Mashour i sar., 2011; Chahine i sar., 2013), međutim njihova upotreba je takođe limitirana na lokalnu usled toga što sistemska primena može dovesti do

neželjenih reakcija na nivou kardiovaskularnog i centralnog nervnog sistema (Rang i sar., 2007). Uzevši u obzir ova saznanja, dodatna istraživanja su potrebna kako bi se ispitala analgetička efikasnost kao i bezbednost novih antagonista, kako N-tipa kalcijumovih, tako i natrijumovih kanala 1.7 podtipa, u postincizionom bolu.

U našoj studiji je po prvi put ispitan značaj T-kanala u razvoju postincizione hiperalgezije. Tačnije, rezultati našeg istraživanja ukazuju da brisanjem gena za proizvodnju Cav3.2 kalcijumovog kanala u miševa, dolazi do skraćanja trajanja hiperalgezije nakon incizije.

Prethodne studije su pokazale da T-tip kalcijumovih kanala igra značajnu ulogu u razvoju mehaničke hiperalgezije i u drugim modelima bola, kao što je dijabetesna neuropatija (Latham i sar., 2009), kao i u neuropatijama izazvanim podvezivanjem nerava (Choi i sar., 2007; Yue i sar., 2013). Globalno brisanje gena za Cav3.2 T-kalcijumov kanal dovelo je do smanjenog nociceptivnog ponašanja u obe faze formalinskog testa, kao i do smanjenja broja grčeva u visceralnom modelu bola izazvanom intraperitonealnom injekcijom sirćetne kiseline (Choi i sar., 2007).

Na osnovu svega navedenog, jasno je da T-kalcijumovi kanali značajno doprinose razvoju hiperalgezije u različitim modelima bola. Stoga su nam naši eksperimentalni podaci o ublažavanju mehaničke hiperalgezije nakon hirurške incizije u miševa kod kojih je obrisan gen za Cav3.2 kanal bili osnov za dalje ispitivanje uloge T-kalcijumovih kanala u postincizionom modelu bola.

## **2. *In vitro* elektrofiziološko ispitivanje uloge T-kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova**

U drugom delu istraživanja, ispitano je da li se menja ekscitabilnost primarnih senzornih neurona u postincizionom modelu bola, da li T-kanali doprinose promenama u ekscitabilnosti primarnih senzornih neurona spinalnih gangliona lumbalnog regiona, kao i da li nakon incizije dolazi da promena u biofizičkim karakteristikama kalcijumovih struja koje potiču od ovih kanala.



## 2.1. Ekscitabilnost senzornih neurona u postincizionom bolu u pacova

Na osnovu rezultata *in vitro* elektrofizioloških eksperimenata u kojima je detektovano spontano okidanje akcionih potencijala tela senzornih neurona spinalnih gangliona regiona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>, ustanovili smo da tela primarnih senzornih neurona gangliona zadnjih korenova male i srednje veličine (dijametra do 35 μm) u rasponu primenjenih struja od 10 do 50 pA okidaju na tri različita načina: pojedinačne akcione potencijale, akcione potencijale frekvence do 45 Hz (višestruki AP) ili preko 45 Hz (visokofrekventni AP) (Slika 33A, 33B i 33C). I drugi autori su ispitali karakteristike okidanja akcionih potencijala perifernih senzornih neurona. Zhang i sar. (2004) su otkrili da senzorni neuroni gangliona zadnjih korenova okidaju ili pojedinačne ili repetitivne akcione potencijale. Međutim naša grupa je po prvi put izvršila klasifikaciju okidanja akcionih potencijala disociranih tela primarnih senzornih neurona i prema frekvenci.

U našoj studiji je otkriveno da senzorni neuroni nakon incizije okidaju statistički značajno više visokofrekventnih akcionih potencijala (veći od 45 Hz) u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 34). Hiperekscitabilnost senzornih neurona spinalnih gangliona je opisana u različitim modelima neuropatskog bola. Jagodic i sar. (2007) su pokazali da u dijabetesnoj neuropatiji dolazi do smanjenja praga za okidanje akcionih potencijala senzornih neurona čija su tela malog i srednjeg dijametra (odgovaraju C i Aδ vlaknima). Oštećenje nerava uzrokuje akumulaciju natrijumovih kanala, usled čega dolazi do hiperekscitabilnosti senzornih neurona i ektopičnog generisanja akcionih potencijala (Devor, 1994, 2009). Međutim, Jagodic i sar. (2007) su pokazali da struje koje potiču od T-kanala doprinose pojavi repetitivnog visokofrekventnog okidanja akcionih potencijala (eng. *burst firing*) u senzornim neuronima spinalnih gangliona u dijabetesnoj neuropatiji. Štaviše, ovi autori su otkrili da je doprinos Cav3.2 podtipa T-kalcijumovih kanala od krucijalnog značaja za razvoj potencijala nakon depolarizacije (eng. *after depolarizing potential* – ADP) na senzornim neuronima spinalnih gangliona srednje veličine koji su pozitivni na IB4 (nepeptidergički nociceptivni senzorni neuroni). Kako je ADP esencijalan za razvoj hiperekscitabilnosti neurona, moguće je pretpostaviti da Cav3.2 podtip T-kanala značajno doprinosi razvoju hiperekscitabilnosti.

Hiperekscitabilnost senzornih neurona spinalnih gangliona uočena je i u modelu neuropatije izazvanom paklitakselom (Li i sar., 2017). Interesantno je da je u pomenutoj studiji, registrovano i povećanje u ekspresiji Cav3.2 podtipa T-kanala na senzornim neuronima spinalnih gangliona koje je pratilo razvoj hiperekscitabilnosti. U inflamaciji senzornih ganglija takođe dolazi do razvoja hiperekscitabilnosti senzornih neurona (Xie i sar., 2013). Konačno, Ochoa i sar. (1982) su otkrili da i kod ljudi sa povredom nerava dolazi do spontanog okidanja akcionih potencijala duž C i A $\beta$  vlakana.

Na osnovu naših rezultata moguće je zaključiti da se u postincizionom modelu bola javlja povećana ekscitabilnost senzornih neurona spinalnih ganglija, što doprinosi razvoju hiperalgezije nakon operacije. Kako T-kalcijumovi kanali značajno doprinose razvoju hiperekscitabilnosti u različitim neuropatijama, u našoj studiji smo dalje ispitivali ulogu ovih kanala u povećanju ekscitabilnosti u postincizionom modelu bola.

## **2.2. Uticaj T-kanala na ekscitabilnost primarnih senzornih neurona spinalnih gangliona u postincizionom bolu u pacova**

Selektivni blokator T-kanala TTA-P2 primenjen direktno na senzorne neurone tokom elektrofizioloških merenja doveo je do smanjenja frekvence okidanja visoko-frekventnih akcionih potencijala (45 Hz) u postincizionoj grupi (Slika 35). Štaviše, broj akcionih potencijala tela senzornih neurona spinalnih gangliona u rasponu primenjenih struja od 10 do 50 pA, statistički je značajno smanjen nakon aplikacije TTA-P2 (Slika 36). Primena TTA-P2 dovela je i do značajnog smanjenja frekvence okidanja akcionih potencijala indukovanih različitim intenzitetom stimulusa u senzornim neuronima nakon incizije (Slika 37).

Ispitivanje efekta selektivnog antagoniste T-kanala na ekscitabilnost senzornih neurona u postincizionom modelu bola je za sada ispitana samo od strane naše istraživačke grupe. Naši nalazi su u saglasnosti sa nalazima drugih autora koji su ispitivali ulogu T-kanala u drugim modelima bola. Naime, pokazano je da T-kanali olakšavaju ekscitabilnost neurona spinalnih gangliona direktno snižavajući prag za okidanje akcionih potencijala (Nelson i sar., 2005). Jagodic i sar. (2007) su pokazali

da primena nikla ( $\text{Ni}^{2+}$ ), poznatog blokatora T-kalcijumovih kanala, dovodi do smanjenja ekscitabilnosti i stvaranja repetitivnih visoko-frekventnih akcionih potencijala u telima senzornih neurona u dijabetesnoj neuropatiji. Konačno, Li i sar. (2017) su otkrili da eksperimentalna supstanca ML218 hidrohlorid, selektivni antagonist T-kanala, uspešno smanjuje broj akcionih potencijala senzornih neurona spinalnih gangliona u paklitakselom-indukovanom neuropatskom bolu.

Na bazi svega navedenog, možemo zaključiti da aktivacija T-kalcijumovih kanala doprinosi razvoju senzitivizacije i plastičnosti bolnih puteva. S tim u vezi, jasno je da T-kalcijumovi kanali igraju značajnu ulogu u razvoju postincizionog bola, olakšavajući pojavu hiperekscitabilnosti perifernih senzornih neurona, koja je potvrđena izmerenim povećanjem broja i frekvence AP u postincizionim ćelijama u odnosu na kontrolnu grupu. Primena antagoniste T-kanala je dovela do smanjenja broja i frekvence akcionih potencijala senzornih neurona, čime se posledično može smanjiti ekscitabilnost ispitivanih neurona. Ovi rezultati ukazuju da bi preventivna primena antagonista T-kalcijumovih kanala mogla sprečiti pojavu senzitivizacije bolnih puteva u postincizionom modelu bola.

### **2.3. Promene u veličini i gustini struja koje potiču od T-kanala u postincizionom bolu u pacova**

U *in vitro* eksperimentima, kalcijumove struje koje potiču od T-kanala bile su značajno povećane nakon incizije u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 38A). Takođe je i gustina kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala bila značajno povećana u populaciji primarnih senzornih neurona nakon incizije (Slika 38B). S druge strane, iako vreme aktivacije T-kalcijumovih kanala nije bilo povećano (Slika 39A), inaktivaciona konstanta aktivacije T-kanala u senzornim neuronima nakon incizije bila je veća u odnosu na kontrolnu grupu, što bi moglo da ukaže na uticaj struja koje potiču od kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri višim potencijalima (Slika 39B), usled povećanja ekspresije ovih kanala. Povećanje ekspresije i aktivnosti kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri višim potencijalima može se dalje registrovati merenjem deaktivacije struja koje potiču od ovih kanala, s obzirom da je deaktivacija čak 10 puta brža u odnosu na deaktivaciju struja koje potiču od T-kanala (Nakashima i sar., 1998). Međutim, kako je izmerena deaktivacija ostala

nepromenjena, vrlo je izvesno da su registrovane struje poticale od T-kanala. Prema tome, moguće je zaključiti da je došlo do promena u ekspresiji i/ili aktivnosti T-kanala, odnosno da nije došlo do povećanja ekspresije i aktivnosti kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri višim potencijalima. U prilog tvrdnji govori i nalaz povećanja gustine kalcijumovih struja prilikom inaktivacije ovih kanala (Slika 40A i 40B). Na osnovu svega navedenog moguće je zaključiti da je izmereno povećanje u gustini kalcijumovih struja posledica isključivo promena koje potiču od T-kanala.

Povećanje struja T-kalcijumovih kanala uočeno je i u drugim modelima bola, kao što su dijabetesna neuropatija (Jagodic i sar., 2007; Latham i sar., 2009; Messinger i sar., 2009; Orestes i sar., 2013), sindrom iritabilnog kolona u pacova (Marger i sar., 2011) i hronična konstriktivna povreda išijadikusa (Jagodic i sar., 2007). Takođe u neuropatijama izazvanim citostaticima pokazano je da su kalcijumove struje koje potiču od T kanala povećane (Okubo i sar., 2011; Kawabata, 2013).

Povećanje kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala može nastati kao direktna posledica povećanja broja kanala na ćelijskoj membrani. Upravo su Li i sar. (2017) pokazali da u modelu neuropatskog bola izazvanog paklitakselom dolazi do povećanja ekspresije T-kalcijumovih kanala. Na ekspresiju T-kanala mogu uticati i post-translacione modifikacije, pod uticajem različitih hroničnih oboljenja. Na primer, Jagodic i sar. (2007) i Latham i sar. (2009) pokazali su da i u miša i pacova dolazi do povećane ekspresije i aktivnosti T-kanala usled post-translacione modifikacije koja je posledica hiperglikemije u dijabetesu, a koja se manifestuje kao povećanje glikozilacije ovih kanala.

Povećanje gustine T-kalcijumovih struja moglo bi da ukaže na promene u membranskoj funkcionalnoj frakciji T-kanala na telima senzornih neurona spinalnih gangliona. S obzirom da je na telima senzornih neurona spinalnih gangliona najzastupljeniji Cav3.2 podtip T-kalcijumovih kanala (Talley i sar., 1999), naše dalje ispitivanje je bilo fokusirano pre svega na ovaj podtip T-kanala.

### **3. *In vitro* ispitivanje promene u ekspresiji T-kanala na telima senzornih neurona spinalnih ganglija nakon incizije u pacova**

U trećoj fazi ispitano je da li dolazi do promene ekspresije T-kanala na telima primarnih senzornih neurona spinalnih ganglija nakon incizije.

#### **3.1. Promene u ekspresiji T-kanala na spinalnim ganglionima nakon incizije u pacova**

U našoj studiji, rezultat qRT-PCR analize je ukazao da se iRNK nije povećala nakon incizije (Slika 41). Štaviše, izmereno je statistički značajno smanjenje iRNK za Cav3.2 kalcijumove kanale. Ovom nalazu ide u prilog i nalaz metode imunoblotova koja je pokazala da ne dolazi do promene ukupnog proteina Cav3.2 kanala nakon hirurške incizije (Slika 42A i 42B). Što se tiče ostalih podtipova T-kalcijumovih kanala, kako nije došlo do promene u nivou njihovih iRNK, može se zaključiti da nakon incizije ne dolazi do promene ekspresije druga dva podtipa kalcijumovih kanala, te da najverovatnije oni ne doprinose značajno u razvoju hiperekscitabilnosti u postincizionom modelu bola.

Naši rezultati su iznenađujući i naizgled nisu u saglasnosti sa rezultatima elektrofiziološkog ispitivanja, kojim je ustanovljeno da dolazi do povećanja kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala, kao i povećanja ekscitabilnosti primarnih senzornih neurona. Tome govori u prilog veliki broj objavljenih podataka. Jagodic i sar. (2007) su potvrdili da je uzrok povećanja T-struja upravo povećanje ekspresije Cav3.2 kanala u modelu dijabetesne neuropatije koja je izazvana streptozotocinom u pacova. Latham i sar. (2009) su u modelu dijabetesne neuropatije na miševima sa dijabetesom tipa II otkrili da je povećanje struja koje potiču od T-kanala povezano sa povećanjem ekspresije samih kanala na površini ćelijske membrane. Takođe su García-Caballero i sar. (2014) otkrili da je povećanje ekspresije Cav3.2 kanala praćeno sa povećanjem T-struja u inflamatornom i neuropatskom modelu bola.

U našoj studiji, izostanak povećanja proteina Cav3.2 kanala detektovanih imunoblot tehnikom, može se ipak objasniti činjenicom da smo analizirali ukupnu

ćelijsku koncentraciju proteina, a ne samo membransku funkcionalnu frakciju proteina od interesa.

### **3.2. Imunocitohemijska potvrda povećanja membranske frakcije Cav3.2 T-kanala na nivou disociranih tela senzornih neurona u postincizionom bolu u pacova**

U cilju ispitivanja membranske frakcije, izvršeno je imunocitohemijsko bojenje isključivo ove frakcije disociranih tela senzornih neurona (Slika 43), kao i analiza promene nivoa ekspresije Cav3.2 kalcijumovih kanala na membrani u postincizionom modelu bola. Izabrali smo disocirane ćelije umesto celih spinalnih gangliona za imunocitohemijsko bojenje i analizu, jer je na disociranim ćelijama moguće, sa većom preciznošću, izvršiti analizu samo neurona od interesa (malih i srednjih), za razliku od preparata intaktnog spinalnog gangliona gde je ovakva analiza otežana.

U našem ispitivanju je po prvi put otkriveno da u postincizionom modelu bola dolazi do povećanja membranske frakcije Cav3.2 kanala na telima senzornih neurona dobijenih iz ipsilateralnih spinalnih ganglija, u odnosu na senzorne neurone dobijenih iz kontralateralnih spinalnih ganglija (Slika 44). Da povećanje membranske frakcije dovodi i do povećanja aktivnosti jonskih kanala, potvrđeno je u studiji Li i sar. (2017) koji su imunohistochemijskom analizom uočili povećanje ekspresije Cav3.2 kanala u paklitakselom-indukovanoj neuropatiji. U pomenutoj studiji, povećanje ekspresije podtipa T-kalcijumovih kanala je takođe dovedeno u vezu sa povećanom ekscitabilnošću senzornih neurona spinalnih gangliona.

Na osnovu naših nalaza moguće je zaključiti da usled povećanja ekspresije membranske frakcije Cav3.2 kanala, dolazi i do povećanja struja koje potiču od T-kalcijumovih kanala, kao i do povećane ekscitabilnosti primarnih senzornih neurona nakon incizije.

## 4. Uloga deubikvitinacije T-kanala pomoću USP5 enzima u razvoju hiperalgezije nakon incizije u pacova i miševa

U ovoj fazi ispitano je da li je promenjena ekspresija USP5 enzima, koji sprečava ubikvitinaciju T-kanala, u postincizionom modelu bola. Posledično je ispitano da li deubikvitinacija T-kanala doprinosi razvoju hiperalgezije nakon incizije.

### 4.1. Ekspresija USP5 enzima u postincizionom modelu bola u miševa

Kao što je prethodno navedeno u Uvodu, uloga USP5 enzima je da ukloni ubikvitinske grupe sa T-kanala i time spreči njihovu razgradnju u proteazomima. Ubikvitin (USP) ili specifične proteaze deubikvitinaze (DUB) uklanjaju ubikvitinske grupe sa proteina, usled čega dolazi do njegove stabilizacije u ćelijskoj membrani (Komander i sar., 2009; Clague i sar., 2013). Poznato je da na koncentraciju jonskih kanala utiče ubikvitinacija koja se izvodi pomoću ubikvitin ligaze E3 (Staub i sar., 1996, 1997; Altier i sar., 2011). Međutim, njihova uloga u održavanju ili pospešivanju stabilnosti jonskih kanala nedovoljno je ispitana.

Imajući u vidu da značaj USP5 enzima nije ispitivan u postincizionom modelu bola, sprovedeni su *in vitro* i *in vivo* eksperimenti u kojima je ispitivana ekspresija USP5, kao i efekat selektivne supresije proizvodnje USP5 enzima na razvoj hiperalgezije nakon hirurške incizije. U našoj studiji, rezultati imunoblot analize su pokazali da je nivo USP5 enzima bio povećan u ipsilateralnim spinalnim ganglijama regiona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> u odnosu na kontralateralne ganglione miša nakon incizije (Slika 45).

Rezultati naših eksperimenata su po prvi put ukazali na povećanje ekspresije USP5 enzima u akutnom postincizionom modelu bola. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno publikovanim studijom u kojoj su autori pokazali da se ekspresija USP5 enzima povećava u inflamatornom i neuropatskom modelu bola (García-Caballero i sar., 2014).

#### 4.2. Uticaj selektivne supresije produkcije USP5 enzima na razvoj mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova i miševa

Naša *in vivo* studija na WT miševima je dalje pokazala da primena male RNK oblika ukosnice (shRNK-USP5) 24 sata pre incizije dovodi do statistički značajnog smanjenja mehaničke hiperalgezije u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa (Slika 46). Nasuprot tome, istovetna primena shRNK-USP5 u Cav3.2 KO miševa, nije ispoljila antihiperalgezijski efekat (Slika 47). Ovaj nalaz ukazuje da je interakcija između USP5 enzima i Cav3.2 kanala visoko selektivna i specifična i da bez obzira na povećanje koncentracije USP5 enzima nakon incizije pronociceptivni efekat ovog enzima ispoljiće se samo u prisustvu Cav3.2 kanala. Dodatno smo potvrdili da je mehanička hiperalgezija u Cav3.2 KO prvog dana nakon incizije, značajno manja u odnosu na WT miševima (Slika 48), što ukazuje na to da su Cav3.2 kalcijumovi kanali od velikog značaja za razvoj hiperalgezije u postincizionom modelu bola.

Rezultati na miševima potvrđeni su i u *in vivo* eksperimentima na pacovima, u kojima je intratekalno primenjen shRNK-USP5 24 sata pre incizije doveo do statistički značajnog smanjenja mehaničke hiperalgezije incizirane šape u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa (Slika 49), u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe je bitno napomenuti da se odgovor neincizirane šape u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa ne razlikuje pre i posle razvoja postincizionog modela bola, ukazujući na to da promene u aktivnosti USP5 enzima postoje samo na nivou ipsilateralnih spinalnih gangliona. Tome u prilog govori i nalaz da je ekspresija USP5 enzima bila povećana u ipsilateralnim, ali ne i u kontralateralnim spinalnim ganglionima miša (Slika 45).

Prethodno publikovani podaci su pokazali sličan efekat prevencije sinteze USP5, u različitim modelima bola. García-Caballero i sar. (2014) su pokazali da ekspresija Cav3.2 kanala na ćelijskoj membrani može biti regulisana pomoću enzima ubikvitin specifične proteaze 5 (USP5) u modelu periferne neuropatije, kao i u inflamatornom modelu bola. Registrovano povećanje u ekspresiji USP5 dovelo je do smanjene ubikvitinacije Cav3.2 kanala, usled čega je došlo do povećane aktivnosti ovih kanala.



Nalaz da je ekspresija enzima USP5 povećana u postincizionom modelu bola mogao bi da objasni membransko povećanje ekspresije Cav3.2 kalcijumovih kanala, do kojeg dolazi usled deubikvitinacije ovog kanala posredstvom USP5 enzima. Kao što je već navedeno, povećanje ekspresije membranske frakcije Cav3.2 kanala moglo bi objasniti povećanje ekscitabilnosti, kao i povećanu gustinu T-struja izmerenih na telima perifernih senzornih neurona u postincizionom modelu bola.

#### **4.3. Uticaj smanjene ekspresije USP5 enzima na gustinu struja koje potiču od T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova**

U *in vitro* eksperimentima, intratekalna primena shRNK-USP5 u pacova 24 sata pre incizije, statistički značajno je smanjila gustinu izmerenih T-kalcijumovih struja na disociranim telima senzornih neurona nakon incizije, u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 50A i 50B). Takođe je bitno napomenuti da su izmerene struje u pomenutoj grupi bile uporedive sa veličinom kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala iz kontrolne neincizirane grupe pacova (Slika 50B).

Ossipov i sar. (2007) su otkrili da blokada proteazoma koji učestvuju u degradaciji proteina ubikvitin-zavisnim mehanizmom, dovodi do smanjenja alodinije i hiperalgezije u neuropatskom modelu bola. U istoj studiji je pokazano da u pojedinim neuropatijama dolazi do nishodne regulacije enzima koji učestvuju u ubikvitinaciji, ukazujući na veliki značaj ovog ubikvitin-zavisnog sistema degradacije proteina u razvoju neuropatskog modela bola. Marangoudakis i sar. (2012) su ukazali na značaj promena u sistemu ubikvitinacije Cav2.2. kalcijumovih kanala (N-tipa) u razvoju nocicepcije. Konačno, García-Caballero i sar. (2014) su dalje pokazali da primena shRNK-USP5 značajno ublažava mehaničku i termičku hiperalgeziiju u inflamatornom i neuropatskom modelu bola.

Naši rezultati, kao i rezultati ostalih navedenih studija ukazuju na veliki značaj post-translacionih modifikacija, kao što je deubikvitinacija jonskih kanala, u modulaciji bolnih puteva u postincizionom modelu bola. Uzimajući sve *in vitro* i *in vivo* nalaze koji govore o značaju interakcije između USP5 enzima koji promoviše deubikvitinaciju Cav3.2 podtipa T-kalcijumovih kanala, moguće je zaključiti da inhibicija ovog procesa, odnosno olakšavanje normalnog procesa ubikvitinacije

Cav3.2 kanala, može predstavljati novi mehanizam prevencije hiperalgezije u postincizionom modelu bola.

#### **4.4. Uticaj selektivne blokade vezivanja USP5 enzima za T-kanal primenom tat peptida na postincizionu hiperalgeziju u miševa**

S obzirom da prevencija vezivanja USP5 enzima za Cav3.2 kanal može smanjiti hiperalgeziju nakon incizije, želeli smo da detaljnije istražimo ovaj mehanizam ispitivanjem uticaja tat-III-IV peptida, koji sprečava vezivanje USP5 enzima za III-IV petlju Cav3.2 kanala, na postincizionu hiperalgeziju.

U našoj studiji intratekalna primena tat-III-IV peptida u WT miševa dovela je do statistički značajnog smanjenja hiperalgezije u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa (Slika 51A). Za razliku od ovog nalaza, tat peptid primenjen u Cav3.2 KO miševa nije ispoljio antihiperalgezijski efekat (Slika 51B). Bitno je napomenuti da je poređenje bazalnih merenja drugog dana nakon incizije pokazalo da postoji statistički značajna razlika u razvoju mehaničke hiperalgezije između WT i KO grupa (Slika 51C), još jednom ukazujući da su Cav3.2 kanali od izuzetnog značaja za razvoj mehaničke hiperalgezije u postincizionom modelu bola.

García-Caballero i sar. (2014) su pokazali da tat III-IV peptid uspešno ublažava hiperalgeziju u inflamatornom i neuropatskom bolu u miševa. Gadotti i sar. (2015) pokazali su da tat III-IV peptid takođe dovodi do antihiperalgezijskog efekta u modelu dijabetesne neuropatije, kao i u visceralnom bolu.

U literaturi se može naći sve veći broj studija u kojima se tat peptidi primenjuju kao sredstvo za lokalizovanu dostavu lekova u organizmu. Poznato je da se zikonotid, lek komercijalno dostupan kao Prialt®, koji se koristi u terapiji intenzivnog neuropatskog bola kod pacijenata koji boluju od sifilisa ili HIV-a, primenjuje isključivo intratekalno. Međutim, Anand i sar. (2015) su uspešno obeležili zikonotid tat peptidom, čime su omogućili intravensku aplikaciju ovog leka i time olakšali prolazak ovog leka kroz krvno-moždanu barijeru.

Od posebnog značaja je primena lekova direktno na spinalne ganglione. Poznato je da injekcija virusne partikule koja nosi sa sobom malu RNK oblika ukosnice, koja

je specifična za natrijumov kanal podtipa Nav1.3, dovodi do smanjenja neuropatskog bola u pacova (Samad i sar., 2012). Bitno je napomenuti da spinalni ganglioni ne poseduju nikakvu kapsularnu protektivnu membranu i da se nalaze u direktnom kontaktu sa krvnim sudovima (Jimenez-Andrade i sar., 2008), tako da je intratekalna primena, pomoću koje se obezbeđuje efekat tretmana i na ganglione, pogodna za ostvarivanje ne samo lokalnog, već i sistemskog efekta (Berta i sar., 2017). Međutim, u slučaju primene virusa kao nosioca lekova, potrebno je imati na umu da dalekosežne posledice na ekspresiju gena u organizmu još uvek nisu ispitane. Zbog toga se novi peptidi koji penetriraju u ćeliju trenutno nalaze u različitim fazama kliničkog ispitivanja. Jedan od njih je i peptid specifičan za TRPV1 kanal pod nazivom SYL 100, koji je trenutno u fazi II kliničkog ispitivanja adekvatne doze, efikasnosti i bezbednosti za lečenje okularnog bola (ClinicalTrials.gov: NCT02455999).

Uzevši sve u obzir, naš nalaz je od velikog značaja jer po prvi put ukazuje da je moguće ublažiti bol nakon hirurške incizije selektivnom lokalnom aplikacijom tat III–IV peptida, koji specifično sprečava vezivanje USP5 enzima zaduženog za deubikvitinaciju Cav3.2 kanala, čime se olakšava normalna ubikvitinacija i degradacija ovog kalcijumovog kanala. Na ovaj način, sprečava se prekomerno zadržavanje ovog podtipa kalcijumovog kanala na ćelijskoj membrani, a samim tim smanjuje se hiperekscitabilnost senzornih neurona, čime se posledično smanjuje i postincizionna hiperalgezija.

## **5. Antinociceptivni efekat antagonista T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova**

U ovom delu istraživanja, ispitali smo *in vivo* analgetičku efikasnost različitih antagonista kalcijumovih kanala T-tipa u postincizionom modelu bola.

### **5.1. Antinociceptivni efekat TTA-P2 u zdravih pacova**

Intratekalna primena TTA-P2, selektivnog antagoniste T-kalcijumovih kanala, dovela je do statistički značajnog i dozno–zavisnog antinociceptivnog efekta u testu termičke nocicepcije, kao i u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog

stimulusa na šapu pacova (Slika 52A i 52B). Ovaj efekat je očekivan, s obzirom da je već poznato da blokada T-kalcijumovih kanala ovim selektivnim antagonistom dovodi do smanjenja kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala na disociranim telima senzornih neurona spinalnih gangliona (Choe i sar., 2011). Takođe je pokazano da mibefradil, još jedan antagonista T-kalcijumovih kanala, ostvaruje antihiperalgezijski efekat u dijabetesnoj neuropatiji pre svega posredstvom Cav3.2 kanala (Obradović i sar., 2014).

## **5.2. Antinociceptivni efekat pojedinačne i ponovljene intratekalne primene TTA-P2 nakon incizije u pacova**

U postincizionom modelu bola, pojedinačna intratekalna injekcija TTA-P2 je dovela do statistički značajnog umanjenja termičke hiperalgezije u testu izmicanja šape pod uticajem toplote prvog, kao i drugog dana nakon incizije, u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 53A i 53B). Statistički značajno smanjenje mehaničke hiperalgezije u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova bilo je vidljivo nakon intratekalne primene TTA-P2 prvog i drugog postincizionog dana (Slika 54A i 54B). U slučaju ponovljene primene, intratekalno primenjen TTA-P2 dva sata nakon incizije nije ispoljio efekat na termičku hiperalgeziiju (Slika 55A), ali je ponovljeno doziranje prvog i drugog dana nakon incizije dovelo do statistički značajnog smanjenja termičke hiperalgezije (Slike 55B i 55C). Za razliku od termičke, isti režim davanja TTA-P2 značajno je ublažio mehaničku hiperalgeziiju dva sata, kao i prvog i drugog dana nakon incizije u pacova (56A, 56B i 56C).

Naši rezultati su u skladu sa prethodno publikovanim podacima. Naime, pokazano je da intraperitonealna injekcija TTA-P2 dovodi do antihiperalgezijskog efekta u inflamatornom modelu bola u miševa, kao i u neuropatskom bolu u pacova (Choe i sar., 2011). Dodatno su i drugi autori pokazali da primena antagonista T-kalcijumovih kanala dovodi do antihiperalgezijskog efekta u različitim modelima bola. Na primer, mibefradil dovodi do smanjenja hiperalgezije i alodinije u dijabetesnoj neuropatiji (Obradovic i sar., 2014). Takođe TTA-A2, selektivni antagonista T-kalcijumovih kanala koji strukturno nije sličan TTA-P2 molekulu,

ublažio je akutni bol, kao i bol u modelu iritabilnog kolona (Lee, 2013). Delfini i sar. (2013) su pokazali da selektivna blokada T-kanala u unilateralnoj perifernoj neuropatiji dovodi do analgezijskog efekta. Nedavno su publikovani podaci u vezi sa novosintetisanim antagonistom T-kalcijumovih kanala pod nazivom RQ-00311651, koji uspešno ublažava bol u neuropatskom i visceralnom modelu (Sekiguchi i sar., 2016). Konačno, bilo da se radi o sistemske ili lokalnoj intraplantarnoj primeni, antagonisti T-kalcijumovih kanala su uspešno ostvarivali antihiper-algezijski efekat (Kim i sar., 2003; Dogrul i sar., 2003) u visceralnom i neuropatskom modelu bola.

U našoj studiji po prvi put je pokazana efikasnost selektivnog antagoniste T-kalcijumovih kanala u akutnom somatskom modelu bola. Bitno je napomenuti da je TTA-P2 pan-selektivni antagonista T-kanala, pa se njegov antihiper-algezijski efekat ne može pripisati isključivo blokadi Cav3.2 izoforme (Shipe i sar., 2008). Blokada i druge dve izoforme, Cav3.1 i Cav3.3, može u određenoj meri doprineti antihiper-algezijskom efektu. Tim pre jer su sve tri izoforme zastupljene u zadnjim rogovima sive mase kičmene moždine (Talley i sar., 1999), na koju intratekalna primena može ispoljiti efekat. Međutim, najzastupljeniji T-kanali u zadnjim rogovima sive mase kičmene moždine pripadaju upravo Cav3.2 izoformi, te je doprinos druge dve izoforme u efektu TTA-P2 u postincizionom modelu bola najverovatnije zanemarljiv.

Rezultati *in vivo* eksperimenata ukazuju na značajnu ulogu T-kanala u razvoju, ali i održavanju mehaničke hiper-algezije nakon hirurške incizije. S druge strane, izostanak efekta TTA-P2 dva sata nakon incizije u testu izmicanja šape pod uticajem toplote ukazuje na to da T-kalcijumovi kanali nisu značajni za razvoj termičke hiper-algezije u akutnoj fazi postincizionog modela bola. Iako je ovaj nalaz interesantan, on nije iznenađujući, s obzirom da su Reichl i sar. (2012) pokazali da muscimol, agonista GABA<sub>A</sub> receptora, ispoljava antihiper-algezijski efekat u testu izmicanja šape pod uticajem toplote prvog dana nakon hirurgije, ali ne i na dan hirurgije. Međutim, muscimol je u istom modelu bola bio efikasan oba dana u smanjenju mehaničke hiper-algezije. I u drugim modelima bola je pokazano da ista supstanca ne mora ispoljiti analgetički efekat na sve nociceptivne stimulse. Tiamin, cijanokobalamin i piridoksin inhibiraju termičku, ali ne i mehaničku hiper-algeziiju u pacova sa povredom nerva (Wang i sar., 2005). Huang i sar. (2004) su pokazali da i

nefarmakološka metoda kao što je elektroakupunktura, ublažava mehaničku, ali ne i termičku hiperalgeziju.

Uzevši sve u obzir, antihiperalgezijski efekat *in vivo* primene antagonista T-kalcijumovih kanala u postincizionom modelu bola može se koristiti kao osnov za dalja klinička ispitivanja ovih supstanci u postoperativnom bolu. Takođe, *in vivo* primena antagoniste T-kalcijumovih kanala u postincizionom modelu bola je ukazala na različit značaj ovih kanala u razvoju termičke i mehaničke hiperalgezije. Na osnovu naših rezultata moguće je da su T-kalcijumovi kanali pre svega zaduženi za održavanje, ali ne i za razvoj termičke hiperalgezije, dok su u slučaju mehaničke hiperalgezije odgovorni i za razvoj i za održavanje ovog tipa hiperalgezije.

### **5.3. Antinociceptivni efekat pojedinačne preventivne intratekalne primene TTA-P2 pre incizije na razvoj hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova**

Preventivna primena analgetika podrazumeva primenu analgetičkog tretmana neposredno pre hirurške intervencije i izvodi se vrlo često u kliničkoj praksi. S tim u vezi, intratekalno primenjen TTA-P2 neposredno pre sprovođenja hirurške incizije, statistički značajno je smanjio termičku hiperalgeziju u testu izmicanja šape pacova pod uticajem toplote, u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 57). Smanjenje termičke hiperalgezije bilo je statistički značajno tokom svih pet dana praćenja životinja nakon incizije.

Nasuprot našem nalazu, Brennan i sar. (1997) su pokazali da preventivno primenjeni morfin i buprenorfin smanjuju nocicepciju akutno, tokom 3–5 sati nakon incizije, ali ne i tokom narednih pet data nakon hirurške incizije. S druge strane, u dvostruko slepoj placebo kontrolisanoj randomizovanoj kliničkoj studiji, preventivno primenjen gabapentin, antagonist  $\alpha 2\delta$ -subjedinice kalcijumovih kanala koji se aktiviraju pri višim potencijalima, značajno je umanjio postoperativnu potrebu za analgeticima u pacijentkinja kod kojih je sprovedena histerektomija (Rorarius i sar., 2004).

Klinički podaci ukazuju da preventivna analgezija smanjuje bol, kao i primenu opioda u lečenju akutnog bola (Carroll i sar., 2013; Sittl i sar., 2013; Shah i sar.,

2017). Preventivna primena analgetika povoljno utiče i na skraćanje boravka u bolnici, bolje funkcionalnosti, poboljšane kognitivne funkcije i zadovoljstva pacijenata (Shah i sar., 2017; Deng i sar., 2017; Fiorelli i sar., 2015). Konačno, ovaj vid primene analgetika sprečava pojavu hroničnog postoperativnog bola (Carroll i sar., 2013; Sittl i sar., 2013).

Naši rezultati, kao i rezultati iz prethodno navedenih studija, ukazuju da bi profilaktička primena antagonista T-kalcijumovih kanala mogla da ublaži postincizioni bol, smanji potrebu za postoperativnim analgeticima i spreči pojavu hroničnog postincizionog bola.

#### **5.4. Antinociceptivni efekat intratekalne primene epipregnanolona u zdravih pacova**

U našem istraživanju, intratekalno primenjen endogeni  $5\beta$ -redukovani neurosteroid epipregnanolon ispoljio je statistički značajan i dozno-zavisian antinociceptivni efekat u testu izmicanja šape pod uticajem toplote u pacova (Slika 58A). Epipregnanolon, primenjen i.t. u najvećoj dozi korišćenoj u prethodnom testiranju, ispoljio je statistički značajan antinociceptivni efekat i u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa (Slika 58B).

Naš nalaz nije iznanađujuć s obzirom da je prethodno pokazano da lokalna intraplantarna injekcija epipregnanolona ispoljava antinociceptivno dejstvo u pacova i WT miševa u testu termičke nocicepcije (Ayoola i sar., 2014). U istoj studiji, autori su pokazali da antinociceptivni efekat epipregnanolona izostaje u Cav3.2 KO miševa, ukazujući na činjenicu da epipregnanolon svoje antinociceptivno dejstvo postiže posredstvom Cav3.2 kalcijumovih kanala.

#### **5.5. Antinociceptivni efekat pojedinačne intratekalne primene epipregnanolona nakon incizije u pacova**

U našoj studiji, koristeći postincizioni model bola, intratekalno primenjen epipregnanolon je doveo do smanjenja mehaničke hiperalgezije prvog dana nakon incizije (Slika 59). Naša istraživačka grupa je po prvi put pokazala efekat endogenog neuroaktivnog steroida u akutnom somatskom modelu bola.

Ayoola i sar. (2014) su u *in vitro* eksperimentima pokazali da epipregnanolon reverzibilno blokira nastanak T-kalcijumovih struja na disociranim telima senzornih neruona spinalnih gangliona. Štaviše, u istoj studiji je pokazano da epipregnanolon ne ispoljava efekte na natrijumove i kalijumove kanale, kao i na jonske struje posredovane aktivacijom GABA<sub>A</sub> receptora. S druge strane, naša nedavno publikovana studija je pokazala da epipregnanolon može blokirati i N-tip kalcijumovih kanala (Joksimovic i sar., 2019a).

Poznato je da voltažno-zavisni kalcijumovi kanali T- i N-tipa doprinose prenosu nociceptivnih signala kroz primarna aferentna vlakna (Zamponi i sar., 2009; Todorovic i Jevtovic-Todorovic, 2011). Takođe je otkriveno da je Cav3.2 izoforma T-kalcijumovih kanala zastupljena na telima senzornih neurona spinalnih gangliona (Rose i sar., 2013; Bourinet i sar., 2005b), kao i na presinaptičkim terminalima lamina I i II zadnjih rogova sive mase kičmene moždine (Jacus i sar., 2012). Što se tiče N-tipa kalcijumovih kanala, pokazano je da blokiranje ovih kanala sprečava oslobađanje neuropeptida, kao što je supstanca P, iz primarnih aferentnih neurona kičmene moždine (Smith i sar., 2002). Dodatno, inhibicija ekspresije i preuzimanja (tzv. *trafficking*) N-tipa kalcijumovih kanala u inflamatornom i postincizionom modelu bola može dovesti do analgezije (François-Moutal i sar., 2015). Konačno, miševi kod kojih je genetički uklonjen gen za Cav2.2. kalcijumov kanal pokazuju smanjenu bolnu hiperosetljivost u modelima neuropatskog i inflamatornog bola (Saegusa i sar., 2001; Hatakeyama i sar., 2001).

Na bazi svih prethodnih saznanja, kao i naših rezultata, moguće je zaključiti da epipregnanolon ispoljava svoje antihiperalgzijske efekte u postincizionom modelu bola najverovatnije preko blokade Cav3.2, ali i Cav2.2 kalcijumovih kanala.

## 5.6. Antinociceptivni efekat intratekalne primene 3β-OH u zdravih pacova

U našoj studiji, intratekalno primenjen 3β-OH, sintetski analog epipregnanolona, je doveo do smanjenja termičke i mehaničke nocicepcije u zdravih pacova (Slika 60A i 60B). Ovaj efekat je očekivan, s obzirom da je intraplantarno primenjen 3β-OH u zdravih pacova ispoljio antinociceptivni efekat u testu izmicanja šape pod uticajem toplote (Todorovic i sar., 2004). U istoj studiji je pokazana selektivnost i specifičnost



---

ovog sintetskog neurosteroida za T-kalcijumov kanal. Naime, 3 $\beta$ -OH je u najmanjoj koncentraciji postigao inhibitorni efekat 50% T-kalcijumovih kanala, u odnosu na ostale primenjene 3 $\beta$ -redukovane neuroaktivne steroide.

Poznato je da steroidni molekuli ispoljavaju svoje efekte direktno, vezujući se za receptore, ali i posredno, usled interakcija sa lipidnim slojem ćelijske membrane, menjajući fluidnost i karakteristike membrane (Covey, 2009). Upravo primena enantiomera, koji predstavljaju molekule koji su slika u ogledalu molekula čija se funkcija ispituje može olakšati istraživanje direktnih efekata neurosteroida. Naime, enantiomeri imaju iste fizičko-hemijske karakteristike kao i funkcionalni ispitivani molekul, tako da stupaju u interakciju sa ćelijskom membranom na isti način. S druge strane, enantiomeri, za razliku od funkcionalnog molekula, nemaju afinitet za ciljno receptorsko mesto, te se obično koriste za ispitivanje direktnih interakcija između neurosteroida i receptora. U našoj studiji, primenili smo enantiomer 3 $\beta$ -OH (ent-3 $\beta$ -OH) kako bismo pokazali da je analgetički efekat koji 3 $\beta$ -OH postiže upravo usled direktne interakcije sa T-kalcijumovim kanalima, koristeći činjenicu da ent-3 $\beta$ -OH nema afinitet za vezivanje za ove kanala. Prema našim očekivanjima, nakon intratekalne primene ent-3 $\beta$ -OH, izostao je antinociceptivni efekat u testu termičke hiperalgezije (Slika 61).

I za druge neurosteroide je pokazano da njihovi enantiomeri ne ispoljavaju efekte u organizmu, pa tako enantiomer alopregnanolona nije pozitivan alosterni modulator GABA<sub>A</sub> receptora, za razliku od endogeno dostupnog alopregnanolona. (Wittmer i sar., 1996). Takođe su Pathirathna i sar. (2005a) pokazali da alopregnanolon blokira T-kalcijumove struje *in vitro*, za razliku od njegovog enantiomera koji ostvaruje isti efekat u 20 puta većoj koncentraciji. Slični rezultati dobijeni su i u *in vivo* eksperimentima, u kojima je enantiomer ispoljio slabiji efekat na termičku nocicepciju za razliku od alopregnanolona. Na osnovu izostanka antinociceptivnog efekta ent-3 $\beta$ -OH na zdravim pacovima, moguće je zaključiti da 3 $\beta$ -OH najverovatnije ispoljava svoj antinociceptivni efekat usled direktnog antagonizma T-kalcijumovih kanala.

### **5.7. Antinociceptivni efekat pojedinačne i ponovljene intratekalne, kao i ponovljene intraplantarne primene $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola**

U postincizionom modelu bola, pojedinačna intratekalna injekcija  $3\beta$ -OH je dovela do statistički značajnog umanjenja hiperalgezije u testu izmicanja šape pod uticajem toplote prvog, kao i drugog dana nakon incizije, u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 62A i 62B). Statistički značajno smanjenje hiperalgezije u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa takođe je bilo vidljivo nakon intratekalne primene  $3\beta$ -OH prvog ili drugog dana nakon incizije (Slika 63A i 63B). U slučaju ponovljene intratekalne primene  $3\beta$ -OH dva sata i prvog dana nakon incizije zadnje šape pacova, hiperalgezija je statistički značajno smanjena nakon druge doze primenjene prvog dana u testu osetljivosti na termički stimulus (Slike 64A i 64B) dok je primena obe doze i dva sata, kao i prvog dana nakon incizije umanjila mehaničku hiperalgezijsku u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa (65A i 65B). Nakon ponovljene intraplantarne primene,  $3\beta$ -OH je takođe ispoljio statistički značajan antihiperalezijski efekat u testu povlačenja šape pod uticajem toplote, kao i u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa (Slika 66A i 66B).

Naši rezultati antihiperalezijskog efekta  $3\beta$ -OH su u skladu sa prethodno publikovanim podacima. Poznato je da  $5\alpha$ -redukovana jedinjenja progesterona, kao što su dihidroprogesteron i alopregnanolon, ispoljavaju antialodinijski i antihiperalezijski efekat u različitim modelima neuropatskog bola (Leonelli i sar., 2007; Meyer i sar., 2010, 2011), uključujući i ligaciju išijadikusa (Pathirathna i sar., 2005a i 2005b). Takođe, alopregnanolon je smanjio nocicepciju u formalinskom testu (Ocvirk i sar., 2008) i doveo do smanjenja alodinijske i termičke hiperalgezije u karageninskom modelu inflamatornog bola (Svensson i sar., 2013).

Što se  $5\beta$ -redukovanih neurosteroida tiče, lokalna primena epipregnanolona, endogenog  $5\beta$ -redukovanog neurosteroida, ublažila je termičku nocicepciju na dozno-zavisani način u zdravih pacova (Ayoola i sar., 2014). Takođe smo pokazali da intratekalna primena epipregnanolona ublažava mehaničku hiperalgezijsku nakon incizije (Slika 59). Konačno, lokalna intraplantarna aplikacija analoga endogenih  $5\beta$ -

redukovanih neurosteroida, kao što je  $3\beta$ -OH neurosteroid, ispoljila je antinociceptivni efekat u testu izmicanja šape pod uticajem toplote u zdravih pacova (Todorovic i sar, 2004).

U našoj studiji je prvi put pokazan analgetički potencijal sintetskog neurosteroida u akutnom postincizionom modelu bola. Koristeći ovaj klinički relevantan hirurški model bola, pokazali smo da intratekalna aplikacija  $3\beta$ -OH uspešno ublažava postincizionu hiperalgeziju. Bilo da je primenjen u obliku pojedinačne doze ili kao ponovljena primena nakon hirurške incizije,  $3\beta$ -OH je povoljno uticao na umanjenje termičke i mehaničke hiperalgezije. Bitno je napomenuti da je efekat na mehaničku hiperalgeziju bio izraženiji u odnosu na efekat na termičku hiperalgeziju. Posebno je ova razlika u efikasnosti bila evidentna u eksperimentima sa ponovljenim davanjem  $3\beta$ -OH u kojima je tek druga doza prvog dana nakon incizije bila efikasna u ublažavanju mehaničke hiperalgezije nakon incizije. Izostanak akutnog efekta  $3\beta$ -OH može se objasniti postojanjem različitih mehanizama koji utiču na razvoj i održavanje termičke i mehaničke hiperalgezije, kao i različit značaj T-kalcijumovih kanala u ovim procesima nakon incizije. Upravo ovome govori u prilog i naš nalaz da TTA-P2, selektivni antagonista T-kalcijumovih kanala, nakon intratekalne primene, različito utiče na termičku i mehaničku hiperalgeziju dva sata nakon incizije (Slike 55A i 56A). Slično ovom nalazu, Reichl i sar. (2012) su pokazali da muscimol, GABA<sub>A</sub> agonista, ispoljava antinociceptivno dejstvo na termički, ali ne i na mehanički stimulus prvog dana nakon incizije. Konačno, na osnovu naših *in vitro* rezultata ispitivanja uloge T-kalcijumovih kanala u postincizionom modelu bola, može se zaključiti da su T-kanali odgovorni za održavanje, ali ne i za akutni razvoj termičke hiperalgezije nakon incizije, čime bi se mogao objasniti izostanak efekta  $3\beta$ -OH 2 h nakon incizije i značajan antihiperalgezijski efekat 24 i 48 sati nakon incizije.

#### **5.8. Antinociceptivni efekat pojedinačne preventivne intraperitonealne primene $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola**

Nedavno je pokazano da  $3\beta$ -OH uspešno dovodi i do hipnotičkog efekta kod neonatalnih pacova (Atluri i sar., 2018). Ovaj nalaz je potvrđen u ženki pacova starosti P26–P42 (Joksimovic i sar., 2019b), gde je  $3\beta$ -OH primenjen u širokom

opsegu doza (5–60 mg/kg). U našoj studiji, intraperitonealna primena  $3\beta$ -OH u kombinaciji sa subanestetičkom dozom (1%) izoflurana indukovala je opštu anesteziju u pacova, što je omogućilo da se izvede hirurška incizija šape na ovim životinjama. Preventivna primena  $3\beta$ -OH na ovaj način dovela je do značajnog smanjenja termičke i mehaničke hiperalgezije nakon incizije (Slika 67A i 67B).

Preventivna analgezija predstavlja vid primene antinociceptivne terapije pre početka hirurške intervencije. Smatra se da preventivna analgezija može biti značajno efikasnija u odnosu na konvencionalnu terapiju analgeticima koja započinje nakon hirurške intervencije (Richmond i sar., 1993; Tverskoy i sar., 1994). Na osnovu pretkliničkih podataka, pretpostavlja se da preventivna analgezija može sprečiti pojavu centralne senzitivacije, što zauzvrat dovodi do smanjenja postoperativne hiperalgezije (Woolf i Chong, 1993). Iako pojedini rezultati kliničkih ispitivanja u kojima su ispitivani efekti preventivne analgezije nisu pokazali superiornost preventivnog tretmana u odnosu na konvencionalnu analgetičku postoperativnu terapiju (Møiniche i sar., 2002), Ong i sar. (2005) su otkrili da preventivna epiduralna analgezija utiče povoljno na postoperativni oporavak kod pacijenata. Preventivna analgezija morfinom smanjuje nociceptivno ponašanje miševa u kasnoj fazi formalinskog testa (Abram i sar., 1993). S druge strane, Brennan i sar. (1997) nisu otkrili dugoročnije efekte intratekalno primenjenog morfina, čak ni pri visokoj dozi od 30  $\mu$ g.

Pokazano je da ketamin, primenjen preventivno sam ili u kombinaciji sa morfinom, uspešno dovodi do ublažavanja bola kod pacijenata nakon gastrektomije (Aida i sar., 2000), najverovatnije prevenirajući razvoj centralne senzitivacije nakon operacije (Stubhaug i sar., 1997). Konačno, preventivno primenjen alfaksalon, sintetski steroid sa anestetičkim osobinama, postigao je analgetičko dejstvo u formalinskom testu u pacova (Gilron i sar., 1996). Rezultati naše studije prvi put pokazuju da preventivno primenjen neurosteroidni analog sa hipnotičkim delovanjem, u sklopu anestezije, dovodi do antihiperalgezijskog efekta u postincizionom modelu bola u pacova.

Otkriće da preventivna primena neurosteroida kao hipnotika dovodi do antihiperalgezijskog efekta tokom postoperativnog oporavka, može biti od

izuzetnog značaja za buduće kliničke studije sa sintetskim analozima neuroaktivnih steroida, koji bi se primenjivali kao anestetici sa analgetičkim karakteristikama. Primena manjeg broja lekova u sklopu balansirane anestezije, kao i analgetika tokom postoperativnog toka, mogla bi potencijalno da smanji broj i ozbiljnost neželjenih reakcija, koje nastaju kao posledica višestruke primene lekova.

## **6. Bezbednost primene antagonista T-kanala**

Bezbednost primene TTA-P2, epipregnanolona i  $3\beta$ -OH ispitivana je u testovima izdržaja životinje na ravnoj površini pod uglom, uzdignutoj platformi i hodanju po gredi. Ovi testovi su urađeni sa namerom da se utvrdi da li primenjene doze ovih supstanci koje ispoljavaju antinociceptivni efekat u postincizionom modelu bola ujedno dovode i do narušavanja motorne spretnosti životinja. Ispitane antinociceptivne doze TTA-P2, epipregnanolona i  $3\beta$ -OH nisu uticale na motornu sposobnost pacova u pomenutim testovima. Choe i sar. (2011) su prethodno ispitali TTA-P2 u istoj bateriji testova na miševima i to u dve doze od 5 i 7,5 mg/kg. Obe ispitane doze nisu dovele do narušavanja motoričke sposobnosti miševa. Međutim, s obzirom da je u pomenutoj studiji TTA-P2 primenjen intraperitonealno, nije moguće izvršiti direktno poređenje doza. Trenutno nisu dostupni literaturni podaci za *in vivo* ispitivanja toksičnosti epipregnanolona i  $3\beta$ -OH. Na bazi naših nalaza možemo zaključiti da su sve tri supstance bezbedne za primenu u dozama koje ispoljavaju antinociceptivni efekat.

## VI ZAKLJUČCI

### Uloga T-kalcijumovih kanala u postincizionom modelu bola

- Nakon hirurške incizije, javlja se značajno smanjenje hiperalgezije u Cav3.2 KO miševa u odnosu na WT miševe.
- U postincizionom modelu bola dolazi do povećanja ekscitabilnosti malih i srednjih senzornih neurona (<35  $\mu\text{m}$ ) spinalnih gangliona regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub>.
- Povećanje ekscitabilnosti se ogleda u tome što značajno veći broj malih i srednjih senzornih neurona nakon incizije okida seriju (najmanje tri) akcionih potencijala frekvence veće od 45 Hz, u odnosu na kontrolnu neinciziranu grupu.
- Selektivna blokada T-kalcijumovih kanala primenom TTA-P2, dovodi do smanjenja frekvence i broja akcionih potencijala merenih na telima senzornih neurona nakon incizije. Ovaj nalaz ukazuje da blokada T-kalcijumovih kanala dovodi do smanjenja ekscitabilnosti primarnih aferentnih neurona bolnog puta.
- Nakon incizije, registrovano je povećanje gustine T-kalcijumovih struja na telima senzornih neruona male i srednje veličine.
- Nakon incizije, rezultati qRT-PCR analize pokazali su da je došlo do smanjenja nivoa iRNK za Cav3.2 kanal. Nivoi iRNK za druga dva podtipa kalcijumovih kanala ostali su nepromenjeni.
- U postincizionom modelu bola, imunoblot tehnikom na preparatu spinalnih gangliona regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub> ustanovljeno je da ekspresija Cav3.2 podtipa T-kalcijumovih kanala nije bila povećana.
- Imunocitohemijska analiza preparata disociranih tela senzornih neurona spinalnih gangliona pokazala je značajno povećanje ekspresije membranske frakcije Cav3.2 kalcijumovih kanala nakon incizije u ipsilateralnim, u odnosu na kontralateralne spinalne ganglije.
- U postincizionom modelu bola, na preparatu ipsilateralnih spinalnih gangliona regiona L<sub>4</sub>–L<sub>6</sub> imunoblot tehnikom je ustanovljeno da je ekspresija USP5 enzima povećana, u odnosu na kontralateralne spinalne ganglije istog regiona.

- Primena shRNK-USP5 24 sata pre izvođenja hirurške incizije, dovela je do smanjenja hiperalgezije u WT miševa i pacova, ali ne i u Cav3.2 KO miševa.
- U elektrofiziološkim eksperimentima, primena shRNK-USP5 24 sata pre izvođenja hirurške incizije dovela je do smanjenja kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala merenih na telima disociranih senzornih neurona spinalnih gangliona. Podatak da je ekspresija USP5 enzima povećana nakon incizije, kao i da sprečavanje deubikvitinacije, odnosno olakšavanje ubikvitinacije Cav3.2 kanala dovodi do ublažavanja hiperalgezije nakon incizije, ukazuje na otkriće novog mehanizma u razvoju postincizionog bola što može biti iskorišćeno za ispitivanje novih analgetika.

### **Antinociceptivno dejstvo antagonista T-kalcijumovih kanala**

- U modelu postincizionog bola intratekalno primenjen TTA-P2 je ispoljio antinociceptivno dejstvo. Epipregnanolon, kao i njegov sintetski analog 3 $\beta$ -OH, takođe su ispoljili antihiperalgezijski efekat u postincizionom modelu bola. Ovaj podatak ukazuje da antagonisti T-kalcijumovih kanala mogu biti korišćeni u tretmanu postincizionog modela bola.
- Antihiperalgezijska efikasnost intraplantarno primenjenog 3 $\beta$ -OH ukazuje da se ovaj neuroaktivni steroid potencijalno može primenjivati i lokalno u postincizionom modelu bola. Prednost lokalne primene lekova leži u tome da se adekvatna koncentracija leka može postići direktno na mestu gde nastaje bol, a da se pritom rizik od pojave neželjenih efekata svodi na minimum.
- Preventivna primena 3 $\beta$ -OH kao hipnotika ispoljila je antinociceptivno dejstvo u postincizionom modelu bola. Ovaj podatak ukazuje na to da se 3 $\beta$ -OH može potencijalno primenjivati u anesteziji, a kako ispoljava i analgetičke karakteristike, potencijalno bi došlo do smanjenja upotrebe analgetika za ublažavanje postoperativnog bola, kao i do smanjenja ispoljavanja određenih neželjenih reakcija.

**Bezbednost primene antagonista T-kalcijumovih kanala**

- Antinociceptivne doze TTA-P2, epipregnanolona i 3 $\beta$ -OH ne narušavaju motornu spretnost eksperimentalnih životinja, te možemo zaključiti da su ovi molekuli bezbedni za primenu u dozama u kojima ispoljavaju antinociceptivno dejstvo.



**VII LITERATURA**

Abram SE, Yaksh TL. Morphine, but not inhalation anesthesia, blocks post-injury facilitation. The role of preemptive suppression of afferent transmission. *Anesthesiology* 1993; 78: 713–21.

Aida S, Yamakura T, Baba H, Taga K, Fukuda S, Shimoji K. Preemptive analgesia by intravenous low-dose ketamine and epidural morphine in gastrectomy: a randomized double-blind study. *Anesthesiology* 2000; 92: 1624–30.

Allen JW, Yaksh TL. Assessment of acute thermal nociception in laboratory animals. *Methods Mol Med* 2004; 99:11–23.

Altier C, Garcia-Caballero A, Simms B, You H, Chen L, Walcher J, Tedford HW, Hermosilla T, Zamponi GW. The Cav $\beta$  subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci* 2011; 14: 173–80.

Anand P, O'Neil A, Lin E, Douglas T, Holford M. Tailored delivery of analgesic ziconotide across a blood brain barrier model using viral nanocontainers. *Sci Rep* 2015; 5: 12497.

Apfelbaum JL, Chen C, Mehta SS, Gan TJ. Postoperative pain experience: results from a National Survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. *Anesth Analg* 2003; 97: 534–540.

Araque A, Clarac F, Buno W. P-type Ca<sup>2+</sup> channels mediate excitatory and inhibitory synaptic transmitter release in crayfish muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4224–8.

Atluri N, Joksimovic SM, Oklopčić A, Milanovic D, Klawitter J, Eggen P, Krishnan K, Covey DF, Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V. A neurosteroid analogue with T-type calcium channel blocking properties is an effective hypnotic, but is not harmful to neonatal rat brain. *Br J Anaesth* 2018; 120: 768–778.

Ayoola C, Hwang SM, Hong SJ, Rose KE, Boyd C, Bozic N, Park JY, Osuru HP, DiGrucchio MR, Covey DF, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. Inhibition of Cav3.2 T-type

calcium channels in peripheral sensory neurons contributes to analgesic properties of epipregnanolone. *Psychopharmacology (Berl)* 2014; 231: 3503–3515.

Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 1984; 7: 309–338.

Basbaum AI and Jessell TM. in *Principles of Neuroscience* (eds Kandel ER, Schwartz JH, Jessell, TM) McGraw–Hill, New York 2000; 472–491.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009; 139: 267–84.

Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989; 51: 367–384.

Bean BP. Pharmacology of calcium channels in cardiac muscle, vascular muscle, and neurons. *Am J Hypertens* 1991; 4: 406S–411S.

Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 565–75.

Bennett G, Serafini M, Burchiel K, Buchser E, Classen A, Deer T, Du Pen S, Ferrante FM, Hassenbusch SJ, Lou L, Maeyaert J, Penn R, Portenoy RK, Rauck R, Willis KD, Yaksh T. Evidence–Based Review of the Literature on Intrathecal Delivery of Pain Medication. *J Pain Symptom Manage* 2000; 20: 12–36.

Berta T, Qadri Y, Tan PH, Ji RR. Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain. *Expert Opin Ther Targets*. 2017; 21: 695–703.

Bertram E. The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48: 65–74.

Berry PH, Convington EC, Dahl JL, Katz JA, Miaskowski C. Pain: Current understanding of assessment management and treatments. Monography Glenview: American Pain Society 2006.

Besse D, Lombard MC, Zajac JM, et al. Pre- and postsynaptic location of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the dorsal horn of the rat spinal cord. *Progress in Clinical and Biological Research* 1990; 328: 183–186

Bone M, Critchley P, Buggy DJ. Gabapentin in postamputation phantom limb pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Reg Anesth Pain Med* 2002; 27: 481–6.

Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch TP. Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 1999; 2: 407–15.

Bourinet E, Zamponi GW. Voltage gated calcium channels as targets for analgesics. *Curr Top Med Chem* 2005a; 5: 539–46.

Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrère C, Couette B, Poirot O, Pages A, McRory J, Snutch TP, Eschalier A, Nargeot J. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J* 2005b; 24: 315–24.

Bourinet E, Altier C, Hildebrand ME, Trang T, Salter MW, Zamponi GW. Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol Rev* 2014; 94: 81–140.

Bourinet E, Zamponi GW. Block of voltage-gated calcium channels by peptide toxins. *Neuropharmacology* 2017; 127: 109–115.

British National Formulary (BNF), Number 66. London: British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 2013.

Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 1996; 64: 493–501.

Brennan TJ, Umali EF, Zahn PK. Comparison of pre- versus postincision administration of intrathecal bupivacaine and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology* 1997; 87: 1517–28.

Brodin E, Malin E, Olgart L. Neurobiology: General considerations—from acute to chronic pain. *No Tannlegeforen Tid* 2016; 126: 28–33.

Brennum J, Arendt-Nielsen L, Horn A, Secher NH, Jensen TS. Quantitative sensory examination during epidural anaesthesia and analgesia in man: effects of morphine. *Pain* 1993; 52: 75–83.

Brinton RD. Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9: 241–50.

Brown SP, Safo PK, Regehr WG. Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J Neurosci* 2004; 24: 5623–31.

Cain SM, Snutch TP. Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing. *Channels* 2010; 4: 475–82.

Calcutt NA, Chaplan SR. Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1478–82.

Calin-Jageman I, Lee A. CaV1 L-type Ca<sup>2+</sup> channel signaling complexes in neurons. *J Neurochem* 2008; 105: 573–83.

Carbone E, Lux HD. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J* 1984; 46: 413–8.

Carroll I, Hah J, Mackey S, i sar. Perioperative interventions to reduce chronic postsurgical pain. *J Reconstr Microsurg* 2013; 29: 213–222.

Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci Lett* 1995; 197: 25–8.

Cashin MF, Moravsek V. The Physiological Action of Cholesterol. *Am J Physiol* 1927; 294–298.

Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 521–55.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology.XLVIII. Nomenclature and structure–function relationships of voltage gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 411– 425.

Catterall WA, Few AP. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 2008; 59: 882–901.

Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269: 1117–23.

Chahine M, Desaphy JF. Recent Advances in Voltage-Gated Sodium Channels, their Pharmacology and Related Diseases. *Frontiers in pharmacology*. 2016; 8;7-20.

Cheng JK, Lin CS, Chen CC, Yang JR, Chiou LC. Effects of intrathecal injection of T-type calcium channel blockers in the rat formalin test. *Behav Pharmacol* 2007; 18: 1–8.

Choe W, Messinger RB, Leach E, Eckle VS, Obradovic A, Salajegheh R, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. TTA-P2 is a potent and selective blocker of T-type calcium channels in rat sensory neurons and a novel antinociceptive agent. *Mol Pharmacol* 2011; 80: 900–10.

Choi S, Na HS, Kim J, Lee J, Lee S, Kim D, Park J, Chen CC, Campbell KP, Shin HS. Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)3.2 T-type channels. *Genes Brain Behav* 2007; 6: 425–31.

Clague MJ, Barsukov I, Coulson JM, Liu H, Rigden DJ, Urbé S. Deubiquitylases from genes to organism. *Physiol Rev* 2013; 93: 1289–315.

Coronel MF, Labombarda F, Roig P, Villar MJ, De Nicola AF, González SL. Progesterone prevents nerve injury-induced allodynia and spinal NMDA receptor upregulation in rats. *Pain Med* 2011; 12: 1249–61.

Cousins MJ, Pickthorn K, Huang S, Critchley L, Bell G. The safety and efficacy of KAI-1678– an inhibitor of epsilon protein kinase C ( $\epsilon$ PKC)–versus lidocaine and placebo for the treatment of postherpetic neuralgia: a crossover study design. *Pain Med* 2013; 14: 533–40.

Covey DF. ent-Steroids: novel tools for studies of signaling pathways. *Steroids* 2009; 74: 577–585.

Crofford LJ, Rowbotham MC, Mease PJ, Russell IJ, Dworkin RH, Corbin AE, Young JP Jr, LaMoreaux LK, Martin SA, Sharma U; Pregabalin 1008–105 Study Group.

Pregabalin for the treatment of fibromyalgia syndrome: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1264–73.

Cumberbatch MJ, Herrero JF, Headley PM. Exposure of rat spinal neurones to NMDA, AMPA and kainate produces only short-term enhancements of responses to noxious and non-noxious stimuli. *Neurosci Lett* 1994; 181: 98–102.

Danziger N, Willer JC. Congenital insensitivity to pain. *Rev Neurol* 2009; 165: 129–136.

Davies A, Hendrich J, Van Minh AT, Wratten J, Douglas L, Dolphin AC. Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 220–8.

de Vries B, Frants RR, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM. Molecular genetics of migraine. *Hum Genet* 2009; 126: 115–132.

Delfini MC, Mantilleri A, Gaillard S, Hao J, Reynders A, Malapert P, Alonso S, François A, Barrere C, Seal R, Landry M, Eschallier A, Alloui A, Bourinet E, Delmas P, Le Feuvre Y, Moqrich A. TFAFA4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice. *Cell Rep* 2013; 5: 378–88.

Deng LQ, Hou LN, Song FX, Zhu HY, Zhao HY, Chen G, Li JJ. Effect of pre-emptive analgesia by continuous femoral nerve block on early postoperative cognitive function following total knee arthroplasty in elderly patients. *Exp Ther Med* 2017; 13: 1592–1597.

Denson D and Katz J. Nonsteroidal anti-inflammatory agents, In: Sinatra RS, Hord AH, Ginsberg B, Preble L, editors. *Acute Pain: Mechanisms and Management*. St. Louis, Mo, USA: Mosby pp 112–123 (1992).

Destexhe A, Contreras D, Sejnowski TJ, Steriade M. A model of spindle rhythmicity in the isolated thalamic reticular nucleus, *J. Neurophysiol* 1994; 72: 803–818.

Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents, *Front Mol Neurosci* 2017; 10: 284.

Devor M. The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In: Wall PD, Melzack R, eds. *Textbook of pain*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994: 79–100 .

Devor M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain* 1999; S6: S27–35.

Devor M. Ectopic discharge in Ab afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res* 2009; 196: 115–128.

Dietrich D, Kirschstein T, Kukley M, Pereverzev A, von der Brelie C, Schneider T, Beck H. Functional specialization of presynaptic CaV2.3 Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 2003; 39: 483–96.

Djoughri L, Lawson SN. A-beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res* 2004; 46: 131–145.

Dolphin AC. Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol* 2009; 19: 237–44.

Dolphin AC. The  $\alpha_2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1828: 1541–9.

Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 2001; 294: 333–9.

Dougherty PM, Palecek J, Paleckova V, Sorkin LS, Willis WD. The role of NMDA and ne-NMDA excitatory amino acid receptors in the excitation of primate spinothalamic tract neurons by mechanical, chemical, thermal, and electrical stimuli. *J Neurosci* 1992; 12: 3025–41.

Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, Tulunay FC, Lai J, Porreca F. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 2003; 105: 159–168.

Dostrovsky JO, Deakin JFW. Periaqueductal grey lesions reduce morphine analgesia in the rat. *Neurosci Lett* 1977; 4: 99–103.

Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 2010; 120: 3760–72.

Dubreuil AS, Boukhaddaoui H, Desmadryl G, Martinez-Salgado C, Moshourab R, Lewin GR, Carroll P, Valmier J, Scamps F. Role of T-type calcium current in identified D-hair mechanoreceptor neurons studied in vitro. *J Neurosci* 2004; 2: 8480-4.

Evans AR, Nicol GD, Vasko MR. Differential regulation of evoked peptide release by voltage-sensitive calcium channels in rat sensory neurons. *Brain Res* 1996; 712: 265-73.

Faas GC, Vreugdenhil M, Wadman WJ. Calcium currents in pyramidal CA1 neurons in vitro after kindling epileptogenesis in the hippocampus of the rat. *Neuroscience* 1996; 75: 57-67.

Fang X, McMullan S, Lawson SN, Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. *J Physiol* 2005; 565: 927-943.

Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS. Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 1985; 359: 431-446.

Felix R. and Weiss N. Ubiquitination and proteasome-mediated degradation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and potential pathophysiological implications. *Gen Physiol Biophys* 2016; 36: 1-5.

Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su TZ, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D. Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:1 7537-42.

Fiorelli A, Mazzella A, Passavanti B, Sansone P, Chiodini P, Iannotti M, Aurilio C, Santini M, Pace MC. Is pre-emptive administration of ketamine a significant adjunction to intravenous morphine analgesia for controlling postoperative pain? A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015; 21: 284-90.



Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004; 109: 150–61.

Flatters SJ. Effect of analgesic standards on persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR). *Neurosci Lett* 2010; 477: 43–7.

Fossat P, Dobremez E, Bouali-Benazzouz R, Favereaux A, Bertrand SS, Kilk K, et al. Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. *J Neurosci* 2010; 30: 1073–85.

François A, Laffray S, Pizzoccaro A, Eshalier A, Bourinet E. T-type calcium channels in chronic pain: Mouse models and specific blockers. *Pflugers Arch* 2014; 466: 707–717.

François-Moutal L, Wang Y, Moutal A, Cottier KE, Melemedjian OK, Yang X, Wang Y, Ju W, Largent-Milnes TM, Khanna M, Vanderah TW. A membrane-delimited N-myristoylated CRMP2 peptide aptamer inhibits CaV2.2 trafficking and reverses inflammatory and postoperative pain behaviors. *Pain* 2015; 156: 1247–1264.

Frye CA, Bock BC, Kanarek RB. Hormonal milieu affects tailflick latency in female rats and may be attenuated by access to sucrose. *Physiol Behav* 1992; 52: 699–706.

Frye CA, Cuevas CA, Kanarek RB. Diet and estrous cycle influence pain sensitivity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 45: 255–60.

Fukuizumi T, Ohkubo T, Kitamura K. Spinally delivered N-, P/Q- and L-type Ca<sup>2+</sup>-channel blockers potentiate morphine analgesia in mice. *Life Sci* 2003; 73: 2873–81.

Gackière F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoï-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P. CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 10162–73.

Gadotti VM, Caballero AG, Berger ND, et al. Small organic molecule disruptors of Cav3.2 – USP5 interactions reverse inflammatory and neuropathic pain. *Mol Pain* 2015; 11: 12.

García-Caballero A, Gadotti VM, Stemkowski P, Weiss N, Souza IA, Hodgkinson V, Bladen C, Chen L, Hamid J, Pizzoccaro A, Deage M, François A, Bourinet E, Zamponi

GW. The deubiquitinating enzyme USP5 modulates neuropathic and inflammatory pain by enhancing Cav3.2 channel activity. *Neuron* 2014; 83: 1144–58.

García-Caballero A, Gadotti VM, Chen L, Zamponi GW. A cell-permeant peptide corresponding to the cUBP domain of USP5 reverses inflammatory and neuropathic pain. *Mol Pain* 2016; 12: 1744806916642444.

Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J Biol Chem* 1996; 271: 5768–76.

Geisler S, Schöpf CL, Obermair GJ. Emerging evidence for specific neuronal functions of auxiliary calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunits. *Gen phys biophys* 2014; 34: 105–118.

Gilron I, Coderre TJ. Preemptive analgesic effects of steroid anesthesia with alphaxalone in the rat formalin test. Evidence for differential GABA(A) Receptor modulation in persistent nociception. *Anesthesiology* 1996; 84: 572–9.

Go VL, Yaksh T.: Release of substance P from the cat spinal cord. *J Physiol* 1987; 391: 141–167.

Gohil K, Bell JR, Ramachandran J, Miljanich GP. Neuroanatomical distribution of receptors for a novel voltage-sensitive calcium-channel antagonist, SNX230 (omega-conopeptide MVIIC). *Brain Res* 1994; 653: 258–66.

Gorlin AW, Rosenfeld DM, Ramakrishna H. Intravenous sub-anesthetic ketamine for perioperative analgesia. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 2016; 32: 160–7.

Gottschalk A I Raja SN. Severing the link between acute and chronic pain, *Anesthesiology* 2004 101: 1059–1061.

Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol Sci* 2017; 38: 406–424.

Hahm TS, Ahn HJ, Ryu S, Gwak MS, Choi SJ, Kim JK, Yu JM. Combined carbamazepine and pregabalin therapy in a rat model of neuropathic pain. *Br J Anaesth* 2012; 109: 968–74.

Hahn K, Arendt G, Braun JS, von Giesen HJ, Husstedt IW, Maschke M, Straube ME, Schielke E; German Neuro-AIDS Working Group. A placebo-controlled trial of gabapentin for painful HIV-associated sensory neuropathies. *J Neurol* 2004; 251: 1260-6.

Hatakeyama, S., Wakamori, M., Ino, M., Miyamoto, N., Takahashi, E., Yoshinaga, T., Sawada, K., Imoto, K., Tanaka, I., Yoshizawa, T. et al. Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca(2+) channels. *Neuroreport* 2001; 12: 2423-2427.

Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch Kisilevsky AE, Mulligan SJ, Altier C, Iftinca MC, Varela D, Tai C, Chen L, Hameed S, Hamid J, Macvicar BA, Zamponi GW. D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron* 2008; 58: 557-570.

Hendrich J, Van Minh AT, Hebllich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, Wratten J, Davies A, Dolphin AC. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 3628-33.

Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-479.

Hille B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J Gen Physiol* 1977; 69: 497-515.

Herrero JF, Laird JM, López-García JA. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol* 2000; 61: 169-203.

Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisy DR, Mantyh PW. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience* 2000; 98: 585-98.

Huang C, Hu ZP, Long H, Shi YS, Han JS, Wan Y. Attenuation of mechanical but not thermal hyperalgesia by electroacupuncture with the involvement of opioids in rat model of chronic inflammatory pain. *Brain Res Bull* 2004; 63: 99–103.

Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 83–91.

Iftinca MC, Zamponi GW. Regulation of neuronal T-type calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 32–40.

Iftinca MC. Neuronal T-type calcium channels: what's new? *Iftinca: T-type channel regulation. J Med Life* 2011; 4: 126–38.

Jacus MO, Uebele VN, Renger JJ, Todorovic SM. Presynaptic Cav3.2 channels regulate excitatory neurotransmission in nociceptive dorsal horn neurons. *J Neurosci* 2012; 32: 9374–82.

Jagodic MM, Pathirathna S, Nelson MT, Mancuso S, Joksovic PM, Rosenberg ER, Bayliss DA, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. *J Neurosci* 2007; 27: 3305–16.

Jagodic MM, Pathirathna S, Joksovic PM, Lee W, Nelson MT, Naik AK, Su P, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve. *J Neurophysiol* 2008; 99: 3151–6.

Jeon D, Kim S, Chetana M, Jo D, Ruley HE, Lin SY, et al. Observational fear learning involves affective pain system and CaV1.2 Ca<sup>2+</sup> channels in ACC. *Nat Neurosci* 2010; 13: 482–8.

Jimenez-Andrade JM, Herrera MB, Ghilardi JR, Vardanyan M, Melemedjian OK, Mantyh PW. Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse: implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies. *Mol Pain* 2008; 4: 10.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413: 203–210.

Joksimovic SL, Donald RR, Park JY, Todorovic SM. Inhibition of multiple voltage-gated calcium channels may contribute to spinally mediated analgesia by epipregnanolone in a rat model of surgical paw incision. *Channels (Austin)*. 2019a; 13: 48–61.

Joksimovic SM, Izumi Y, Joksimovic SL, Tesic V, Krishnan K, Asnake B, Jevtovic-Todorovic V, Covey DF, Zorumski CF, Todorovic SM. Novel neurosteroid hypnotic blocks T-type calcium channel-dependent rebound burst firing and suppresses long-term potentiation in the rat subiculum. *Br J Anaesth* 2019b; 122: 643–651.

Kang HW, Park JY, Jeong SW, Kim JA, Moon HJ, Perez-Reyes E, Lee JH. A molecular determinant of nickel inhibition in Cav3.2 T-type calcium channels. *J Biol Chem* 2006; 281: 4823–30.

Kang HW, Vitko I, Lee SS, Perez-Reyes E, Lee JH. Structural determinants of the high affinity extracellular zinc binding site on Cav3.2 T-type calcium channels. *J Biol Chem* 2010; 285: 3271–81.

Kawabata A. Targeting Ca(v)3.2 T-type calcium channels as a therapeutic strategy for chemotherapy-induced neuropathic pain. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 2013; 141: 81–4.

Kehlet H, Holte K. Effect of postoperative analgesia on surgical outcome. *Br J Anaesth* 2001; 87: 62–72.

Kehlet H, Wilmore DW. Multimodal strategies to improve surgical outcome. *Am J Surg*. 2002; 183: 630–41.

Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet* 2006; 367: 1618–25.

Khosravani H, Zamponi GW. Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies, *Physiol Rev* 2006; 86: 941–966.

Kim DS, Yoon CH, Lee SJ, Park SY, Yoo HJ, Cho HJ. Changes in voltage-gated calcium channel  $\alpha 1$  gene expression in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 96: 151–6.

Kim D, Park D, Choi S, Lee S, Sun M, Kim C, Shin HS. Thalamic control of visceral nociception mediated by T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 2003; 302: 117–119.

Kisilevsky AE, Mulligan SJ, Altier C, Iftinca MC, Varela D, Tai C, Chen L, Hameed S, Hamid J, Macvicar BA, Zamponi GW. D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron*. 2008; 58: 557–70.

Komander D, Reyes–Turcu F, Licchesi JDF, Odenwaelder P, Wilkinson KD, Barford D. Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63–linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep* 2009; 10: 662.

Kuba T, Quinones–Jenab V. The role of female gonadal hormones in behavioral sex differences in persistent and chronic pain: clinical versus preclinical studies. *Brain Res Bull* 2005; 66: 179–88.

Lallemend F, Ernfors P. Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci* 2012; 35: 373–381.

Lambert JJ, Belelli D, Harney SC, Peters JA, Frenguelli BG. Modulation of native and recombinant GABA(A) receptors by endogenous and synthetic neuroactive steroids. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 37: 68–80.

Latham JR, Pathirathna S, Jagodic MM, Choe WJ, Levin ME, Nelson MT, Lee WY, Krishnan K, Covey DF, Todorovic SM, Jevtovic–Todorovic V. Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes* 2009; 58: 2656–65.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 597–652.

Lee J, Kim D, Shin HS. Lack of delta waves and sleep disturbances during non–rapid eye movement sleep in mice lacking alpha1G–subunit of T-type calcium channels, *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 18195–18199.

Lee WY, Orestes P, Latham J, Naik AK, Nelson MT, Vitko I, Perez–Reyes E, Jevtovic–Todorovic V, Todorovic SM. Molecular mechanisms of lipoic acid modulation of T-type calcium channels in pain pathway. *J Neurosci* 2009; 29: 9500–9.

Lee S. Pharmacological Inhibition of Voltage-gated Ca(2+) Channels for Chronic Pain Relief. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11: 606–20.

Lee, M. Z944: A first in class T-type calcium channel modulator for the treatment of pain. *J Peripher Nerv Syst* 2014; 19: S11–S12.

Leonelli E, Bianchi R, Cavaletti G, Caruso D, Crippa D, Garcia-Segura LM, Lauria G, Magnaghi V, Roglio I, Melcangi RC. Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience*. 2007; 144: 1293–304.

Lesser H, Sharma U, LaMoreaux L, Poole RM. Pregabalin relieves symptoms of painful diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. *Neurology* 2004; 63: 2104–10.

Lewis VA, Gebhart GF. Evaluation of the periaqueductal central gray (PAG) as a morphine-specific locus of action and examination of morphine-induced and stimulation-produced analgesia at coincident PAG loci. *Brain Res* 1977; 124: 283–303.

Li X, Angst MS, Clark JD. Opioid-induced hyperalgesia and incisional pain. *Anesth Analg* 2001; 93: 204–9.

Li Y, Tatsui CE, Rhines LD, North RY, Harrison DS, Cassidy RM, Johansson CA, Kosturakis AK, Edwards DD, Zhang H, Dougherty PM. Dorsal root ganglion neurons become hyperexcitable and increase expression of voltage-gated T-type calcium channels (Cav3.2) in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Pain* 2017; 158: 417–429.

Ling B, Coudoré F, Decalonne L, Eschalier A, Authier N. Comparative antiallodynic activity of morphine, pregabalin and lidocaine in a rat model of neuropathic pain produced by one oxaliplatin injection. *Neuropharmacology* 2008; 55: 724–8.

Lipscombe D, Andrade A, Allen SE. Alternative splicing: functional diversity among voltage-gated calcium channels and behavioral consequences. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1828: 1522–9.

Luvisetto S, Marinelli S, Panasiti MS, D'Amato FR, Fletcher CF, Pavone F, Pietrobon D. Pain sensitivity in mice lacking the Ca(v)2.1alpha1 subunit of P/Q-type Ca<sup>2</sup> channels. *Neuroscience* 2006; 142: 823–832.

Maggi CA, Tramontana M, Cecconi R, Santicoli P. Neurochemical evidence for the involvement of N-type calcium channels in transmitter secretion from peripheral endings of sensory nerves in guinea pigs. *Neurosci Lett* 1990; 114: 203–6.

Marchand S. Applied Pain Neurophysiology. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, eds. *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press 2010; 3–27.

Marger F, Gelot A, Alloui A, Matricon J, Ferrer JF, Barrère C, Pizzoccaro A, Muller E, Nargeot J, Snutch TP, Eschalier A, Bourinet E, Ardid D. T-type calcium channels contribute to colonic hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 11268–73.

Marangoudakis S, Andrade A, Helton TD, Denome S, Castiglioni AJ, Lipscombe D. Differential ubiquitination and proteasome regulation of Ca(V)2.2 N-type channel splice isoforms. *J Neurosci* 2012; 32: 10365–9.

Marmigere F, Ernfors P. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nature Rev Neurosci* 2007; 8: 114–127.

Mashour GA, Mashour GA, Lydic R, editors. *Neuroscientific Foundations of Anesthesiology*. Oxford University Press; 2011 Oct 5.

Matthews EA, Dickenson AH. Effects of ethosuximide, a T-type Ca(2+) channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 415: 141–9.

Matthews EA, Bee LA, Stephens GJ, Dickenson AH. The CaV2.3 calcium channel antagonist SNX-482 reduces dorsal horn neuronal responses in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 3561–9.

McGivern JG, McDonough SI. Voltage-gated calcium channels as targets for the treatment of chronic pain. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2004; 3: 457–78.

McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk D. *Wall & Melzack's Textbook of Pain: Expert Consult–Online and Print*. Elsevier Health Sciences; 2013 Jun 21.



Mensah–Nyagan AG, Kibaly C, Schaeffer V, Venard C, Meyer L, Patte–Mensah C. Endogenous steroid production in the spinal cord and potential involvement in neuropathic pain modulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 109: 286–93.

Messinger RB, Naik AK, Jagodic MM, Nelson MT, Lee WY, Choe WJ, Orestes P, Latham JR, Todorovic SM, Jevtovic–Todorovic V. In vivo silencing of the Ca(V)3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin–induced diabetic neuropathy. *Pain* 2009; 145: 184–95.

Meyer L, Patte–Mensah C, Taleb O, Mensah–Nyagan AG. Cellular and functional evidence for a protective action of neurosteroids against vincristine chemotherapy–induced painful neuropathy. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 3017–3034.

Meyer L, Patte–Mensah C, Taleb O, Mensah–Nyagan AG. Allopregnanolone prevents and suppresses oxaliplatin–evoked painful neuropathy: multi–parametric assessment and direct evidence. *Pain* 2011; 152: 170–181.

Michaluk J, Karolewicz B, Antkiewicz–Michaluk L, Vetulani J. Effects of various Ca<sup>2+</sup> channel antagonists on morphine analgesia, tolerance and dependence, and on blood pressure in the rat. *Eur J Pharmacol* 1998; 352: 189–97.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999; 57: 1–164.

Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002; 66: 355–474.

Miljanich GP. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem* 2004; 11: 3029–40.

Mishra S, Bhatnagar S, Goyal GN, Rana SP, Upadhya SP. A comparative efficacy of amitriptyline, gabapentin, and pregabalin in neuropathic cancer pain: a prospective randomized double–blind placebo–controlled study. *Am J Hosp Palliat Care* 2012; 29: 177– 82.

Moore RA, Straube S, Wiffen PJ, Derry S, McQuay HJ. Pregabalin for acute and chronic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 3: CD007076.

Moore RA, Wiffen PJ, Derry S, McQuay HJ. Gabapentin for chronic neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 16: CD007938.

Molineux ML, McRory JE, McKay BE, Hamid J, Mehaffey WH, Rehak R, Snutch TP, Zamponi GW, Turner RW. Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5555–5560.

Møiniche S, Kehlet H, Dahl JB. A qualitative and quantitative systematic review of preemptive analgesia for postoperative pain relief: the role of timing of analgesia. *Anesthesiology*. 2002; 96: 725–41.

Munro G, Erichsen HK, Mirza NR. Pharmacological comparison of anticonvulsant drugs in animal models of persistent pain and anxiety. *Neuropharmacology* 2007; 53: 609–618.

Murakami M, Nakagawasai O, Suzuki T, Mobarakeh II, Sakurada Y, Murata A, et al. Antinociceptive effect of different types of calcium channel inhibitors and the distribution of various calcium channel  $\alpha_1$  subunits in the dorsal horn of spinal cord in mice. *Brain Res* 2004; 1024: 122–9.

Nakashima YM, Todorovic SM, Pereverzev A, Hescheler J, Schneider T, Lingle CJ. Properties of  $Ba^{2+}$  currents arising from human  $\alpha_1E$  and  $\alpha_1Eb3$  constructs expressed in HEK293 cells: Physiology, pharmacology, and comparison to native T-type  $Ba^{2+}$  currents. *Neuropharmacology* 1998; 37: 957–972.

Nebe J, Vanegas H, Neugebauer V, Schaible HG. Omega-agatoxin IVA, a P-type calcium channel antagonist, reduces nociceptive processing in spinal cord neurons with input from the inflamed but not from the normal knee joint—an electrophysiological study in the rat in vivo. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 2193–2201.

Nelson MT, Joksovic PM, Perez-Reyes E, Todorovic SM. The endogenous redox agent L-cysteine induces T-type  $Ca^{2+}$  channel-dependent sensitization of a novel subpopulation of rat peripheral nociceptors. *J Neurosci*. 2005; 25: 8766–8775.

Nelson MT, Woo J, Kang HW, Vitko I, Barrett PQ, Perez-Reyes E, Lee JH, Shin HS, Todorovic SM. Reducing agents sensitize C-type nociceptors by relieving high-affinity zinc inhibition of T-type calcium channels. *J Neurosci* 2007; 27: 8250–60.

Neugebauer V, Lücke T, Schaible HG. N-methyl-D-aspartate (NMDA) and ne-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *J Neurophysiol* 1993; 70: 1365–77.

North RA, Williams JT. Opiate activation of potassium conductance inhibits calcium action potentials in rat locus coeruleus neurones. *Br J Pharmacol* 1983; 80: 225–228.

Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985; 316: 440–443.

Obata H, Li X, Eisenach JC. Spinal adenosine receptor activation reduces hypersensitivity after surgery by a different mechanism than after nerve injury. *Anesthesiology* 2004; 100: 1258–62.

Obradovic AL, Hwang SM, Scarpa J, Hong SJ, Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V. CaV3.2 T-type calcium channels in peripheral sensory neurons are important for mibefradil-induced reversal of hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy. *PLoS One* 2014; 9: 4.

Ochoa J, Torebjörk HE, Culp WJ, Schady W. Abnormal spontaneous activity in single sensory nerve fibers in humans. *Muscle Nerve* 1982; 5 :S74–7.

Ocvirk R, Pearson Murphy BE, Franklin KB, Abbott FV. Antinociceptive profile of ring A-reduced progesterone metabolites in the formalin test. *Pain* 2008; 138: 402–9.

Ohashi-Doi K, Gale JD, Kurebayashi Y. Pregabalin inhibits accelerated defecation and decreased colonic nociceptive threshold in sensitized rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 643: 107–12.

Okayama S, Imagawa K, Naya N, Iwama H, Somekawa S, Kawata H, Horii M, Nakajima T, Uemura S, Saito Y. Blocking T-type Ca<sup>2+</sup> channels with efonidipine decreased plasma aldosterone concentration in healthy volunteers. *Hypertens Res* 2006; 29: 493–7.

Okubo K, Takahashi T, Sekiguchi F, Kanaoka D, Matsunami M, Ohkubo T, Yamazaki J, Fukushima N, Yoshida S, Kawabata A. Inhibition of T type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. *Neuroscience* 2011; 188: 148–56.

Ong CK, Lirk P, Seymour RA, Jenkins BJ. The efficacy of preemptive analgesia for acute postoperative pain management: a meta-analysis. *Anesth Analg* 2005; 100: 757–73

Orestes P, Osuru HP, McIntire WE, Jacus MO, Salajegheh R, Jagodic MM, Choe W, Lee J, Lee SS, Rose KE, Pairo N, Digruccio MR, Krishnan K, Covey DF, Lee JH, Barrett PQ, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. Reversal of neuropathic pain in diabetes by targeting glycosylation of Ca(V)<sub>3.2</sub> T-type calcium channels. *Diabetes* 2013; 62: 3828–38.

Ossipov MH, Bazov I, Gardell LR, Kowal J, Yakovleva T, Usynin I, Ekström TJ, Porreca F, Bakalkin G. Control of Chronic Pain by the Ubiquitin-Proteasome System in the Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27: 8226–37.

Ossipov MH. The perception and endogenous modulation of pain. *Scientifica (Cairo)* 2012; 561–761.

Page KM, Rothwell SW, Dolphin AC. The CaV $\beta$  subunit protects the I–II loop of the voltage-gated calcium channel CaV2.2 from proteasomal degradation but not oligoubiquitination. *J Biol Chem* 2016: 291, 20402–2041.

Pan ZZ, Williams JT, Osborne PB. Opioid actions on single nucleus raphe magnus neurons from rat and guinea-pig in vitro. *J Physiol* 1991; 427: 519–532.

Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen R, Zhang HM, Li DP. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 2008; 117: 141–61.

Park C, Kim JH, Yoon BE, Choi EJ, Lee CJ, Shin HS. T-type channels control the opioidergic descending analgesia at the low threshold-spiking GABAergic neurons in the periaqueductal gray. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 14857–62.

Patel R, Bauer CS, Nieto-Rostro M, et al.  $\alpha 2\delta$ -1 gene deletion affects somatosensory neuron function and delays mechanical hypersensitivity in response to peripheral nerve damage. *J Neurosci* 2013; 33: 16412–26.

Patel R, Montagut-Bordas C, Dickenson AH. Calcium channel modulation as a target in chronic pain control. *Br J Pharmacol* 2017; 175: 2173–2184.

Pathirathna S, Todorovic SM, Covey DF, Jevtovic-Todorovic V. 5 $\alpha$ -Reduced Neuroactive Steroids Alleviate Thermal and Mechanical Hyperalgesia in Rats With Neuropathic Pain. *Pain* 2005a; 117: 326–339.

Pathirathna S, Brimelow BC, Jagodic MM, Krishnan K, Jiang X, Zorumski CF, Mennerick S, Covey DF, Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V. New evidence that both T-type calcium channels and GABAA channels are responsible for the potent peripheral analgesic effects of 5 $\alpha$ -reduced neuroactive steroids. *Pain* 2005b; 114: 429–43.

Pavlin DJ, Chen C, Penaloza DA, Polissar NL, Buckley FP. Pain as a factor complicating recovery and discharge after ambulatory surgery. *Anesth Analg* 2002; 95: 627–34.

Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 2003; 83: 117–61.

Perl ER. Ideas about pain, a historical view. *Nature Rev Neurosci* 2007; 8: 71–80.

Perkins FM, Kehlet H. Chronic pain as an outcome of surgery. A review of predictive factors. *Anesthesiology* 2000; 93: 1123–33.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45.

Pogatzki EM, Gebhart GF, Brennan TJ. Characterization of Delta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. *J Neurophysiol* 2002; 87: 721–31.

Pogatzki EM, Raja SN. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology*. 2003; 99: 1023–7.

Poliakov I, Toth C. The impact of pain in patients with polyneuropathy. *Eur J Pain* 2011; 15: 1015–1022.

Popratiloff A, Weinberg RJ, Rustioni A. AMPA receptor subunits underlying terminals of fine-caliber primary afferent fibers. *J Neurosci* 1996; 16: 3363–72.

Prentice WE, Quilen WS, Underwood F: Therapeutic Modalities in rehabilitation, 4th Edition: [www.accessphysiotherapy.com](http://www.accessphysiotherapy.com)) 2011, 2005 by McGraw–Hill Education, Inc.

Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA. Frequency and voltage–dependent inhibition of type IIA Na<sup>+</sup> channels, expressed in a mammalian cell line, by local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant drugs. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 756–765.

Rao RD, Michalak JC, Sloan JA, Loprinzi CL, Soori GS, Nikcevich DA, Warner DO, Novotny P, Kutteh LA, Wong GY; North Central Cancer Treatment Group. Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy–induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double–blind, placebo–controlled, crossover trial (N00C3). *Cancer* 2007; 110: 2110–8.

Rang HP, Dale MM, Ritter M, Flower R, Henderson G. Local anaesthetics and other drugs affecting sodium channels. *Pharmacology* 2007:638-42.

Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale's Pharmacology E-Book. Elsevier Health Sciences; 2014.

Ray SB, Mishra P, Verma D, Gupta A, Wadhwa S. Nimodipine is more effective than nifedipine in attenuating morphine tolerance on chronic co–administration in the rat tail–flick test. *Indian J Exp Biol* 2008; 46: 219–28.

Reichl S, Augustin M, Zahn PK, Pogatzki–Zahn EM. Peripheral and spinal GABAergic regulation of incisional pain in rats. *Pain* 2012; 153: 129–41.

Reichling DB, Kwiat GC, Basbaum AI. Anatomy, physiology and pharmacology of the periaqueductal gray contribution to antinociceptive controls. *Prog Brain Res* 1988; 77: 31–46.

Rice AS, Maton S; Postherpetic Neuralgia Study Group. Gabapentin in postherpetic neuralgia: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Pain* 2001; 94: 215–24.

Richmond CE, Bromley LM, Woolf CJ. Preoperative morphine pre–empts postoperative pain. *Lancet* 1993; 342: 73–5.

Rorarius MG, Mennander S, Suominen P, Rintala S, Puura A, Pirhonen R, Salmelin R, Haanpää M, Kujansuu E, Yli-Hankala A. Gabapentin for the prevention of postoperative pain after vaginal hysterectomy. *Pain* 2004; 110: 175–81.

Rose KE, Lunardi N, Boscolo A, Dong X, Erisir A, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. Immunohistological demonstration of CaV3.2 T-type voltage-gated calcium channel expression in soma of dorsal root ganglion neurons and peripheral axons of rat and mouse. *Neuroscience* 2013; 250: 263–74.

Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Minowa O, Kazuno A, Han W, Matsuda Y, Yamanaka H, Osanai M, Noda T, Tanabe T. Altered pain responses in mice lacking alpha 1E subunit of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6132–7.

Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsuda Y, Nonaka T, Han W, Toriyama H, Tanabe T. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *EMBO J* 2001; 20: 2349–56.

Samad OA, Tan AM, Cheng X, et al. Virus-mediated shRNA knockdown of Na(v)1.3 in rat dorsal root ganglion attenuates nerve injury-induced neuropathic pain. *Mol Ther* 2012; 21: 49–56.

Sandercock D, Cramer M, Wu J, Chiang YK, Biton V, Heritier M. Gabapentin extended release for the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy: efficacy and tolerability in a double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Diabetes Care* 2009; 32: e20.

Sanford M. Intrathecal ziconotide: a review of its use in patients with chronic pain refractory to other systemic or intrathecal analgesics. *CNS Drugs* 2013; 27: 989–1002.

Santicioli P, Del Bianco E, Tramontana M, Geppetti P, Maggi CA. Release of calcitonin gene-related peptide like-immunoreactivity induced by electrical field stimulation from rat spinal afferents is mediated by conotoxin-sensitive calcium channels. *Neurosci Lett* 1992; 136: 161–4.

Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 177: 3–28.

Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 1995; 15: 333–341.

Schulz DJ, Temporal S, Barry DM, Garcia ML. Mechanisms of voltage-gated ion channel regulation: from gene expression to localization. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 2215–2231.

Schumacher M, Hussain R, Gago N, Oudinet JP, Mattern C, Ghomari AM. Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci* 2012; 6: 10.

Schumacher M, Mattern C, Ghomari A, Oudinet JP, Liere P, Labombarda F, Sitruk-Ware R, De Nicola AF, Guennoun R. Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Prog Neurobiol.* 2014; 113: 6–39.

Scroggs RS, Fox AP. Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J Physiol* 1992; 445: 639–658.

Sekiguchi F, Kawabata A. T-type calcium channels: functional regulation and implication in pain signaling. *J Pharmacol Sci* 2013; 122: 244–50.

Sekiguchi F, Kawara Y, Tsubota M, Kawakami E, Ozaki T, Kawaishi Y, Tomita S, Kanaoka D, Yoshida S, Ohkubo T, Kawabata A. Therapeutic potential of RQ-00311651, a novel T-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker, in distinct rodent models for neuropathic and visceral pain. *Pain* 2016; 157: 1655–65.

Shah AC, Nair BG, Spiekerman CF, Bollag LA. Continuous intraoperative epidural infusions affect recovery room length of stay and analgesic requirements: a single-center observational study. *J Anesth* 2017; 31: 494–501.

Shin HS, Cheong EJ, Choi S, Lee J, Na HS. T-type Ca<sup>2+</sup> channels as therapeutic targets in the nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 33–41.



Shipe WD, Barrow JC, Yang ZQ, Lindsley CW, Yang FV, Schlegel KA, Shu Y, Rittle KE, Bock MG, Hartman GD, Tang C, Ballard JE, Kuo Y, Adarayan ED, Prueksaritanont T, Zrada MM, Uebele VN, Nuss CE, Connolly TM, Doran SM, Fox SV, Kraus RL, Marino MJ, Graufelds VK, Vargas HM, Bunting PB, Hasbun-Manning M, Evans RM, Koblan KS, Renger JJ. Design, synthesis, and evaluation of a novel 4-aminomethyl-4-fluoropiperidine as a T-type Ca<sup>2+</sup> channel antagonist. *J Med Chem* 2008; 51: 3692–5.

Sittl R, Irnich D, Lang PM. Update on preemptive analgesia: options and limits of preoperative pain therapy. *Anaesthesist* 2013; 62: 789–796.

Smith MT, Cabot PJ, Ross FB, et al. The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. *Pain* 2002; 96: 119–127.

Snider WD, McMahon SB. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 1998; 20: 629–632.

Snutch TP, Catterall WA. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol* 1993; 123: 949–962.

Spofford CM, Brennan TJ. Gene expression in skin, muscle, and dorsal root ganglion after plantar incision in the rat. *Anesthesiology* 2012; 117: 161–72.

Staub O, Dho S, Henry P, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, Rotin D. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J*. 1996; 15: 2371–80.

Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, Rotin D. Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J* 1997; 16: 6325–36.

Steriade M. Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends Neurosci* 2005; 317–324.

Stenkowski PL, Smith PA. Sensory neurons, ion channels, inflammation and the onset of neuropathic pain. *Can J Neurol Sci* 2012; 39: 416–435.

Stubhaug A, Breivik H, Eide PK, Kreunen M, Foss A. Mapping of punctuate hyperalgesia around a surgical incision demonstrates that ketamine is a powerful suppressor of central sensitization to pain following surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997; 41: 1124–32.

Su H, Sochivko D, Becker A, Chen J, Jiang Y, Yaari Y, Beck H. Upregulation of a T-type Ca<sup>2+</sup> channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J Neurosci* 2002; 22: 3645–3655.

Sun J, Li N, Duan G, Liu Y, Guo S, Wang C, Zhu C, Zhang X. Increased Na(v)1.7 expression in the dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after plantar incision in rats. *Mol Pain* 2018; 14: 1744806918782323.

Svensson E, Persson J, Fitzsimmons B, Yaksh TL. Intrathecal neurosteroids and a neurosteroid antagonist: effects on inflammation-evoked thermal hyperalgesia and tactile allodynia. *Neurosci Lett* 2013; 548: 27–32.

Takeda M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K, Matsumoto S. Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol Pain* 2011; 7: 5.

Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J. Neurosci* 1999; 19: 1895–911.

Takahashi T, Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 1993; 366: 156–8.

Thienhaus O, Cole BE. Classification of pain. In: Weiner R. *Pain management: a practical guide for clinicians*. Boca Raton: CRC Press; 2002: 28.

Todorovic SM, Lingle CJ. Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: Effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J Neurophysiol* 1998; 79: 240–252.

Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, Meyenburg A, Mennerick S, Perez-Reyes E, Romano C, Olney JW, Zorumski CF. Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* 2001; 31: 75–85.

Todorovic SM, Meyenburg A, Jevtovic-Todorovic V. Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker. *Brain Res* 2002; 951: 336–340.

Todorovic SM, Pathirathna S, Brimelow BC, Jagodic MM, Ko SH, Jiang X, Nilsson KR, Zorumski CF, Covey DF, Jevtovic-Todorovic V. 5beta-reduced neuroactive steroids are novel voltage-dependent blockers of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat sensory neurons in vitro and potent peripheral analgesics in vivo. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 1223–35.

Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V. T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies *Br J Pharmacol* 2011; 163: 484–49.

Tomić MA, Vucković SM, Stepanović-Petrović RM, Micov AM, Ugresić ND, Prostran MS, Bosković B. Analysis of the antinociceptive interactions in two-drug combinations of gabapentin, oxcarbazepine and amitriptyline in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2010; 628: 75–82.

Tomić M, Stepanović-Petrović R. Terapija bola i glavobolje. U: Ugrešić N, Stepanović-Petrović R, Savić M, urednici. *Farmakoterapija za farmaceute*. Beograd: Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2017: 351–380.

Trimmer JS, Rhodes KJ. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol* 2004; 66: 477–519.

Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M, Avanzini G, Pape HC Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J Neurosci* 1995; 15: 3110–7.

Tsubota-Matsunami M, Noguchi Y, Okawa Y, Sekiguchi F, Kawabata A. Colonic hydrogen sulfide-induced visceral pain and referred hyperalgesia involve activation of both Cav3.2 and TRPA1 channels in mice. *J Pharmacol Sci* 2012; 119: 293–296.

Tverskoy M, Oz Y, Isakson A, Finger J, Bradley EL Jr, Kissin I. Preemptive effect of fentanyl and ketamine on postoperative pain and wound hyperalgesia. *Anesth Analg* 1994; 78: 205–9.

van Seventer R, Feister HA, Young JP Jr, Stoker M, Versavel M, Rigaudy L. Efficacy and tolerability of twice-daily pregabalin for treating pain and related sleep interference in postherpetic neuralgia: a 13-week, randomized trial. *Curr Med Res Opin* 2006; 22: 375–84.

Vaurio LE, Sands LP, Wang Y, Mullen EA, Leung JM. Postoperative delirium: the importance of pain and pain management. *Anesth Analg* 2006; 102: 1267–73.

Wang YX, Pettus M, Gao D, Phillips C, Scott Bowersox S. Effects of intrathecal administration of ziconotide, a selective neuronal N-type calcium channel blocker, on mechanical allodynia and heat hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. *Pain* 2000; 84: 151–8.

Wang ZB, Gan Q, Rupert RL, Zeng YM, Song XJ. Thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin and their combination inhibit thermal, but not mechanical hyperalgesia in rats with primary sensory neuron injury. *Pain* 2005; 114: 266–77.

Wang R, Lewin GR. The Cav3.2 T-type calcium channel regulates temporal coding in mouse mechanoreceptors. *J Physiol* 2011; 589: 2229–43.

Waithe D, Ferron L, Page KM, Chaggar K, Dolphin AC. Beta-subunits promote the expression of Ca<sub>v</sub>2.2 channels by reducing their proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2011; 286: 9598–9611.

Weiss N, Hameed S, Fernández-Fernández JM, Fablet K, Karmazinova M, Poillot C, Proft J, Chen L, Bidaud I, Monteil A, Huc-Brandt S, Lacinova L, Lory P, Zamponi GW, De Waard M. A Ca<sub>v</sub>3.2/syntaxin-1A signaling complex controls T-type channel activity and low-threshold exocytosis. *J Biol Chem* 2012; 287: 2810–8.

Weiss N, Zamponi GW. Trafficking of neuronal calcium channels. *Neuronal Signal* 2017; 1: 1.

Welch SP, Olson KG. Opiate tolerance-induced modulation of free intracellular calcium in synaptosomes. *Life Sci* 1991; 48: 1853–61.

Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA. Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 1992; 9: 1099–1115.

Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM, Hell JW, Starr TV, Snutch TP, Catterall WA. Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci* 1995; 15: 6403–6418.

Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA. Localization of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* 1998; 18: 6319–6330.

Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 1994; 264: 107–111.

Whiteside GT, Harrison J, Boulet J, Mark L, Pearson M, Gottshall S, Walker K. Pharmacological characterisation of a rat model of incisional pain. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 85–91.

Willis WD, Al-Chaer ED, Quast MJ, Westlund KN. A visceral pain pathway in the dorsal column of the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1999; 96: 7675–9.

Willow M, Gono T, Catterall WA. Voltage clamp analysis of the inhibitory actions of diphenylhydantoin and carbamazepine on voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 1985; 27: 549–558.

Wittmer LL, Hu Y, Kalkbrenner M, Evers AS, Zorumski CF, Covey DF. Enantioselectivity of steroid-induced  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor modulation and anesthesia. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 1581–1586.

Woolf CJ, Chong MS. Preemptive analgesia—treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. *Anesth Analg* 1993; 77: 362–79.

Wozniak DF, Olney JW, Kettinger L 3rd, Price M, Miller JP. Behavioral effects of MK-801 in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1990; 101: 47–56.

Xie W, Strong JA, Ye L, Mao JX, Zhang JM. Knockdown of sodium channel NaV1.6 blocks mechanical pain and abnormal bursting activity of afferent neurons in inflamed sensory ganglia. *Pain* 2013; 154: 1170–80.

Yaksh TL. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997;41: 94–111.

Yamamoto T, Sakashita Y. Differential effects of intrathecally administered N- and P-type voltage-sensitive calcium channel blockers upon two models of experimental mononeuropathy in the rat. *Brain Res* 1998; 794: 329–32.

Yasuda T, Miki S, Yoshinaga N, Senba E. Effects of amitriptyline and gabapentin on bilateral hyperalgesia observed in an animal model of unilateral axotomy. *Pain* 2005; 115: 161–70.

Yue J, Liu L, Liu Z, Shu B, Zhang Y. Upregulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in primary sensory neurons in spinal nerve injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2013; 38: 463–70.

Yunker AM, McEnery MW. Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review. *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35: 533–75.

Zahn PK, Gysbers D, Brennan TJ. Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology* 1997; 86: 106–1077.

Zahn PK, Brennan TJ. Lack of effect of intrathecally administered Nmethyl-D-aspartate receptor antagonists in a rat model for postoperative pain. *Anesthesiology* 1998; 88: 143–156.

Zahn PK, Umali E, Brennan TJ. Intrathecal ne-NMDA excitatory aminoacid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. *Pain* 1998; 74: 213–223.

Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potentials. *Pharmacol Rev* 2016; 67: 821–870.

Zhang XF, Zhu CZ, Thimmapaya R, Choi WS, Honore P, Scott VE, Kroeger PE, Sullivan JP, Faltynek CR, Gopalakrishnan M, Shieh CC. Differential action potentials and firing

patterns in injured and uninjured small dorsal root ganglion neurons after nerve injury. *Brain Res* 2004; 1009: 147–58.

Zhang WS, Xu H, Xu B, Sun S, Deng XM, Zhang YQ. Antihyperalgesic effect of systemic dexmedetomidine and gabapentin in a rat model of monoarthritis. *Brain Res* 2009; 1264: 57–66.

Zhang Y, Jiang X, Snutch TP, Tao J. Modulation of low-voltage-activated T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1828: 1550–9.

Ziegler D, Duan WR, An G, Thomas JW, Nothaft W. A randomized double-blind, placebo-, and active-controlled study of T-type calcium channel blocker ABT-639 in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain* 2015; 156: 2013–20.

Zotterman Y. Touch, pain and tickling: an electro-physiological investigation on cutaneous sensory nerves. *J Physiol* 1939; 95: 1–28.

## **BIOGRAFIJA KANDIDATA**

Sonja Joksimović (rođ. Paranos) je rođena 06.10.1981. u Beogradu. Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar, upisala je školske 2000/01. godine i diplomirala 2006. sa prosečnom ocenom 9,44. Tokom studiranja je bila stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i Fondacije „dr. Zoran Đinđić“.

Nakon završetka osnovnih studija, upisuje doktorske akademske studije na Katedri za Farmakologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. U periodu od februara 2007. do februara 2009. godine bila je zaposlena kao saradnik na projektu pod rukovodstvom prof. dr Radice Stepanović-Petrović na Katedri za farmakologiju na istom fakultetu. Od marta 2009. do aprila 2014. godine, bila je zaposlena u farmaceutskoj kompaniji Merck Sharp & Dohme Srbija. Karijeru je započela radeći kao specijalista za poslove registracije lekova, da bi 2011. godine bila promovisana u saradnika regionalnog direktora za bezbednost lekova.

Od aprila 2014. godine angažovana je kao istraživač saradnik na projektu Nacionalnih instituta za zdravlje (National Institutes of Health-NIH) Sjedinjenih Američkih Država: „Novi anestetici iz grupe neurosteroida i perioperativna analgezija“ (Novel neurosteroid anesthetics and perioperative analgesia, projekat br. 1 R01 GM 123746 01), pod rukovodstvom prof. dr Slobodana Todorovića. Od septembra 2019. godine zaposlena je kao post-doktoralni saradnik u grupi za Neuronauke u razvoju farmaceutske kompanije Merck & Co. Inc. West Point Pensilvanija. Trenutno se bavi razvojem in vivo elektrofiziološke metode ekstracelularnog snimanja akcionih potencijala perifernih senzornih neurona. Član je međunarodnog udruženja za neuronauke (Society for Neuroscience - SfN).



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана **Соња Јоксимовић**

Број индекса **33/2014**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

### **Испитивање улоге калцијумових канала Т-типа у анималном моделу постинцизионог 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 кршила ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

*Sonja Joksimovic*

У Београду, 21.11.2019.

**Прилог 2.**

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

Име и презиме аутора **Соња Јоксимовић**

Број индекса **33/2014**

Студијски програм **докторске академске студије из фармакологије**

Наслов рада **Испитивање улоге калцијумових канала Т-типа у анималном моделу постинцизионог бола**

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

**Проф. др Слободан Тодоровић**

Потписана **Соња Јоксимовић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала 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**

*Sonja Joksimovic*

У Београду, 21.11.2019.

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

#### **Испитивање улоге калцијумових канала Т-типа у анималном моделу постинцизионог бола**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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 одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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

Потпис докторанда



У Београду, 21.11.2019.

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

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

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

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

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

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