

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**  
**UNIVERZITETA U BEOGRADU – FARMACEUTSKOG FAKULTETA**  
**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE – DOKTORSKE STUDIJE**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 12.9.2019. godine, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije, kandidata diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Sonje Joksimović, pod naslovom:

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

Komisija u sastavu:

1. Prof. dr Radica Stepanović-Petrović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
  2. Prof. dr Slobodan Todorović, redovni profesor, Univerzitet u Koloradu – Medicinski fakultet,
  3. Prof. dr Sonja Vučković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet,
  4. Prof. dr Maja Tomić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
  5. Doc. dr Ana Micov, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
- pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta sledeći

## IZVEŠTAJ

### A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Sonje Joksimović pod naslovom: „**Ispitivanje uloge kalcijumovih kanala T-tipa u animalnom modelu postincizionog bola**“, napisana je na 166 strana sa 1,5 preredom i obuhvata sledećih sedam celina: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Na početku doktorske disertacije navedeni su sadržaj prema poglavljima, rezime i ključne reči na srpskom i engleskom jeziku. Tekst disertacije napisan je jasnim stilom i dokumentovan je sa 67 slika i 302 literaturna navoda koja se tiču razmatrane problematike.

**Uvod** obuhvata sledeća poglavlja: *Bol – definicija i klasifikacija, Anatomska organizacija aferentnih puteva bola, Uloga kalcijumovih kanala u bolu i Uloga antagonist kalcijumovih*

*kanala u terapiji bola.* U poglavlju *Bol – definicija i klasifikacija* navedene su definicija bola i klasifikacija bolnih stanja sa posebnim osvrtom na postoperativni bol i savremeni terapijski pristup za njegovo lečenje. U poglavlju *Anatomska organizacija aferentnih puteva bola* opisani su neuralni putevi koji učestvuju u transmisiji bola. Zatim su prikazani procesi transdukcije i transmisije, kao i uticaj inflamacije na ove procese prenosa informacije o bolu. Posebna pažnja posvećena je modulaciji bola na perifernom, spinalnom i supraspinalnom nivou. Poglavlje *Uloga kalcijumovih kanala u bolu* je posvećeno ulozi kalcijumovih kanala u prenosu informacije o bolu. Detaljno su opisane biofizičke karakteristike, genetička i strukturna klasifikacija voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala i njihova uloga u ćelijskoj ekscitabilnosti. Takođe, detaljno je opisana distribucija ovih kanala duž puteva bola. U daljem tekstu ovog poglavlja kandidat se fokusirao na ulogu kalcijumovih kanala T-tipa, koji se aktiviraju pri nižim potencijalima. U sastavu ovog dela poglavlja posebna pažnja posvećena je njihovoj ulozi u modulaciji prenosa informacije o bolu na perifernom, spinalnom i supraspinalnom nivou. Takođe su navedene studije koje ukazuju na njihov značaj u animalnim modelima bola. U kontekstu uloge ovih kanala u modulaciji bola, opisani su mehanizmi regulacije membranske ekspresije T-kanala, sa posebnim osvrtom na uticaj ubikvitinacije, odnosno prevencije ubikvitinacije (deubikvitinacije) kanala enzimom ubikvitin-specifičnom proteazom USP5. U ovom delu disertacije navedene su studije koje ukazuju na značaj regulacije deubikvitinacije primenom tat III-IV peptida, odnosno peptida koji penetriraju u ćeliju i sprečavaju vezivanje USP5 enzima za kanal, usled čega je moguće uticati na funkcionalnost T-kanala i razvoj hiperalgezije u modelima bola. U poglavlju *Uloga antagonista kalcijumovih kanala u terapiji bola* istaknut je značaj antagonista kalcijumovih kanala i njihovo trenutno mesto u terapiji bola. Poseban osvrt je dat na analgetički potencijal antagonista T-kanala, kao što su TTA-P2 i neurosteroidi epipregnanolon i njegov sintetski analog 3β-OH. Napravljen je pregled relevantnih pretkliničkih i kliničkih ispitivanja u kojima je ispitivana analgetička efikasnost antagonista kalcijumovih kanala. Takođe, istaknuta je potreba za novim analgeticima koji bi ispoljili bolju podnošljivost, imajući u vidu da postojeći analgetici koji nalaze primenu u terapiji postincizionog bola nisu lišeni neželjenih efekata.

**Ciljevi rada** doktorske disertacije su jasno definisani i obuhvataju: 1) *In vivo* ispitivanje uloge T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova i miševa; 2) Elektrofiziološko ispitivanje uloge T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova; 3) *In vitro* ispitivanje promene u ekspresiji T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova; 4) Ispitivanje uloge deubikvitinacije T-kanala enzimom USP5 u razvoju hiperalgezije nakon incizije u pacova i miševa; 5) Ispitivanje antinociceptivnog dejstva selektivnih antagonista T-kalcijumovih kanala u postincizionom modelu bola u pacova i 6) Ispitivanje uticaja najvećih antinociceptivnih doza TTA-P2, epipregnanolona i 3β-OH na motornu koordinaciju pacova. Ciljevi rada su dobro postavljeni.

U okviru poglavlja **Materijal i metode** detaljno su opisane sve eksperimentalne procedure uz šematski prikaz eksperimentalnih protokola, tako da se eksperimenti mogu ponoviti. Eksperimenti su izvedeni na sledećim životinjama: na ženkama pacova Sprague-Dawley soja; na ženkama miševa soja C57BL/6J; na mužjacima i ženkama miševa soja C57BL/6J (eng. *wild type*; WT miševi), kao i na mužjacima i ženkama miševa kod kojih je genetskom delecijom izbačen CACNA1H gen za Cav3.2 T-kalcijumov kanal (eng. *knock out*; KO miševi). Različiti tretmani primenjivani su intratekalno (i.t.), intraplantarno (i.pl.) i

intraperitonealno (i.p.) različitim, nezavisnim grupama od po 5-13 životinja. Za sve korišćene supstance naveden je način njihovog rastvaranja/suspendovanja i put primene. Postavljeni ciljevi rada ispitivani su u jednom eksperimentalnom modelu bola (akutni somatski) i u testovima procene motorne spretnosti eksperimentalnih životinja.

Model bola korišćen u eksperimentima bio je model postincizionog bola izveden po metodi koju su prvobitno ustanovili Brennan i sar. (1997) za pacove i Pogatzki i Raja (2003) za miševе. Životinje su prvo anestezirane izofluranom, nakon čega je uzdužno incizirana plantarna površina zadnje šape, uključujući i plantarni mišić do potpunog razdvajanja mišićnih vlakana. Nakon zaustavljanja krvarenja, rana je zašivena pomoću dva šava najlonskim koncem. Hiperalgija, uloga T-kanala kao i uloga ubikvitinacije T-kanala u razvoju hiperalgije i uticaj antagonista T-kanala na hiperalgiju mereni su u testovima povlačenja šape pod uticajem toplote ili mehaničkog stimulusa (*von Frey* filament). Merni parametar termičke osetljivosti je reakciono vreme u sekundama koje je potrebno da se kod životinje dostigne prag osetljivosti na toplotni stimulus (reakciono vreme, eng. *paw withdrawal latency* – PWL). Merni parametar mehaničke osetljivosti je maksimalni intenzitet 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.

Za procenu uticaja tretmana na motornu spretnost pacova korišćen je set bihevioralnih testova (Wozniak i sar., 1990): 1) 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; 2) uzdignuta platforma: pacov je postavljen na platformu (7,6 cm x 12,5 cm) podignutu 61 cm od podloge, a zatim je mereno vreme provedeno na platformi – očekivano je da životinja izdrži 120 s na ploči, u dva testiranja; 3) 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.

Za *in vitro* eksperimente korišćen je preparat spinalnih gangliona lumbalnog regiona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> prikupljen *ex vivo*. Nakon terminalne anestezije pacova izofluranom (5%), životinja je dekapitovana i izvršena je lateralna laminektomija od torakalnog ka lumbalnom regionu. Nakon toga izvršena je ekscizija gangliona dorzalnih korenova L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> regiona, koji su korišćeni u daljim *in vitro* eksperimentima.

Elektrofiziološka metoda nametnute voltaže ili struje na deliću membrane (eng. *patch-clamp*), pomoću koje se ispituju struje koje potiču od različitih jona u ekscitabilnim ćelijama, upotrebljena je za elektrofiziološka ispitivanja neuronske ekscitabilnosti i biofizičkih karakteristika T-kalcijumovih kanala. U ovim eksperimentima, selektivni antagonista T-kanala TTA-P2 primenjen je direktno na preparat disociranih senzornih neurona spinalnih gangliona lumbalnog regiona kako bi se ispitao uticaj blokade T-kanala na ekscitabilnost (broj i frekvencu akcionih potencijala – AP) perifernih senzornih neurona.

Promena u ekspresiji informacione RNK za T-kanale utvrđena je metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu (qRT-PCR, eng. *quantitative real time polymerase chain reaction*). Imunoblot ili Western blot tehnika korišćena je za detekciju i određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorku. Intenzitet imuno signala na skeniranim membranama određen je denzitometrijskom metodom i analiziran uz pomoć programa ImageQuant 5.0 (GE Healthcare; Life sciences, SAD). Imunobojenje je tehnika koja

podrazumeva upotrebu antitela za detekciju specifičnog proteina od interesa i koristi se u histologiji, ćelijskoj i molekularnoj biologiji. 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.

U cilju određivanja uloge deubikvitinacije T-kanala u postincizionom modelu bola, ispitivane su promene u nivou USP5 enzima uz pomoć imunoblot tehnike iz uzoraka spinalnih gangliona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> u miševa. Takođe je mala RNK oblika ukosnice (shRNK, eng. *small hairpin RNA*) koja prevenira produkciju USP5 enzima zaduženog za deubikvitinaciju T-kanala, primenjena intratekalno 24 sata pre hirurške incizije, kako bi se ispitao uticaj prevencije deubikvitinacije na: 1) razvoj mehaničke hiperalgezije u pacova, WT i Ca<sub>v</sub>3.2 KO miševa i 2) na veličinu kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala izmerenih na disociranim telima senzornih neurona spinalnih gangliona nakon incizije.

Antihiperalgezijski efekat selektivne blokade vezivanja USP5 enzima za T-kanal usled i.t. primene tat III-IV peptida u WT i Ca<sub>v</sub>3.2 KO miševa ispitan je drugog dana nakon incizije u testu povlačenja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa.

U cilju *in vivo* ispitivanja antihiperalgezijskog efekta antagonista T-kanala, TTA-P2, epipregnanolon i 3β-OH primenjeni su kod pacova kako bi se ispitao: 1) antinociceptivni efekat antagonista T-kanala u zdravih pacova; 2) antihiperalgezijski efekat antagonista T-kanala u postincizionom modelu bola.

Pri statističkoj obradi rezultata korišćen je Graph Pad Prism (SAD). 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. Analiza normalnosti i jednakosti varijansi urađena je koristeći programe SPSS i Sigma Plot.

**Rezultati** ispitivanja napisani su jasno i pregledno, uz odgovarajuće grafičke prikaze. Shodno zadatim ciljevima, rezultati su grupisani u 6 celina: *In vivo uloga T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova i miševa; Elektrofiziološko ispitivanje uloge T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova; Promene u ekspresiji T-kanala na telima senzornih neurona spinalnih gangliona u postincizionom bolu u pacova; Uloga deubikvitinacije T-kanala enzimom USP5 u razvoju hiperalgezije nakon incizije u pacova i miševa; Efekti antagonista T-kanala u postincizionom modelu bola i Efekat primenjenih antagonista T-kanala na motornu sposobnost pacova.* U statističkoj obradi dobijenih rezultata, statistički testovi su pravilno korišćeni.

**Diskusija** daje detaljno tumačenje dobijenih rezultata, uporednom analizom sa odgovarajućim rezultatima drugih autora iz dostupnih literaturnih podataka. Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima drugih autora uočava se podudarnost, ali rezultati nose i inovativnost u polju istraživanja. Kao i rezultati, diskusija je organizovana u šest celina: *Uloga T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova i miševa; In vitro elektrofiziološko ispitivanje uloge T-kanala u razvoju postincizionog modela bola u pacova; In vitro ispitivanje promene u ekspresiji T-kanala na telima senzornih neurona spinalnih*

*ganglija nakon incizije u pacova; Uloga deubikvitinacije T-kanala pomoću USP5 enzima u razvoju hiperalgezije nakon incizije u pacova i miševa; Antinociceptivni efekat antagonista T-kanala u postincizionom modelu bola u pacova i Bezbednost primene antagonista T-kanala.*

U poglavlju **Zaključci** navedena su najznačajnija zapažanja i zaključci, koji su u skladu sa dobijenim rezultatima i ciljevima istraživanja.

## **B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

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

Uloga T-kalcijumovih kanala ispitivana je u postincizionom modelu bola u pacova i miševa. Nakon hirurške incizije plantarne površine zadnje šape pacova, razvija se statistički značajna termička hiperalgezija u testu izmicanja šape pod uticajem toplotnog stimulusa, kao i mehanička hiperalgezija detektovana u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa. Termička i mehanička hiperalgezija su evidentne tokom 7 dana nakon incizije, a najizraženije su tokom prva dva postoperativna dana, koja su i izabrana za izvođenje eksperimenata.

Slično kao u pacova, u miševa se razvija statistički značajna mehanička hiperalgezija već dva sata nakon incizije, koja perzistira tokom pet dana merenja nakon incizije. Nakon izvođenja hirurške incizije na Ca<sub>v</sub>3.2 KO miševima, pokazano je da se, u odnosu na neinciziranu šapu, razvija statistički značajna mehanička hiperalgezija incizirane šape. Međutim, za razliku od WT miševa, mehanička hiperalgezija traje kraće u Ca<sub>v</sub>3.2 KO, što je potvrđeno izostankom statističke značajnosti već trećeg dana nakon incizije u KO miševa.

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

Prilikom praćenja promena u ekscitabilnosti tela primarnih senzornih neurona, smeštenih u spinalnim ganglijama dorzalnih korenova lumbalnog regiona (L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>) identifikovana su tri različita režima okidanja akcionog potencijala primarnih senzornih neurona koji 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 visokofrekventnu seriju akcionih potencijala (najmanje tri) sa frekvencom okidanja većom od 45 Hz. U postincizionom modelu bola primećeno je statistički značajno povećanje broja neurona koji spontano okidaju seriju akcionih potencijala sa frekvencom većom od 45 Hz, u odnosu na kontrolnu grupu. Primena selektivnog blokatora T-kanala, TTA-P2 (3 μM), direktno na preparat disociranih tela senzornih neurona, dovela je do značajnog smanjenja broja spontano generisanih AP, u odnosu na bazalno merenje. Takođe, nakon primene TTA-P2 u istoj koncentraciji, pokazano je da se broj AP statistički značajno smanjio u postincizionoj grupi, u odnosu na bazalni nivo. Ista koncentracija TTA-P2 direktno primenjena na preparat i inkubirana sa disociranim telima senzornih neurona spinalnih ganglionna, dovela 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. Od izuzetnog značaja je nalaz 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.

Što se tiče promena u biofizičkim karakteristikama kalcijumovih kanala T-tipa koje nastaju nakon incizije plantarne površine šape pacova, rezultati elektrofizioloških eksperimenata na primarnim senzornim neuronima spinalnih gangliona regiona L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> pokazali su da je došlo do statistički značajnog povećanja prosečne gustine T-kalcijumovih struja u odnosu na kontrolnu grupu, što je izmereno u protokolu aktivacije ovih kanala. Iako vreme postizanja maksimalne amplitude nije bilo različito, vremenski-zavisna inaktivacija je bila statistički značajno povećana (gotovo dva puta) u odnosu na kontrolnu grupu. U protokolu inaktivacije, izmerena gustina kalcijumovih struja na telima senzornih neurona gangliona dorzalnih korenova bila je takođe statistički značajno povećana (gotovo dva puta) u odnosu na izmerenu gustinu T-struja na ćelijama dobijenih iz neinciziranih pacova.

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

qRT-PCR analiza nivoa iRNK za Ca<sub>v</sub>3.2 podtip T-kalcijumovih kanala nije pokazala značajnu razliku između kontrolne i incizirane grupe, ukazujući na činjenicu da nakon incizije ne dolazi do povećanja produkcije ovog podtipa T-kanala na nivou senzornih neurona spinalnih gangliona. Analiza nivoa ekspresije Ca<sub>v</sub>3.2 podtipa T-kalcijumovih kanala metodom imunoblotova takođe je potvrdila da nakon incizije ne dolazi do povećanja ekspresije Ca<sub>v</sub>3.2 kanala. S druge strane, imunocitohemijska analiza intenziteta signala koji potiče od membranske frakcije Ca<sub>v</sub>3.2 kalcijumovih kanala, pokazala je da je ekspresija Ca<sub>v</sub>3.2 kanala na membrani statistički značajno veća na telima senzornih neurona disociranih iz ipsilateralnih u odnosu na tela senzornih neurona iz kontralateralnih spinalnih gangliona.

### 4) Uloga deubikvitinacije T-kanala enzimom USP5 u razvoju hiperalgezije nakon incizije u pacova i 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 L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> spinalne ganglione. 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 hiperalgeziyu prvog dana nakon incizije, u poređenju sa kontrolnom grupom. Za razliku od WT miševa, tretman shRNK-USP5 nije doveo do promene u intenzitetu mehaničke hiperalgezije nakon incizije kod Ca<sub>v</sub>3.2 KO miševa. Takođe je od velikog značaja otkriće da KO miševi razvijaju statistički signifikantno manju mehaničku hiperalgeziyu prvog dana nakon incizije u odnosu na WT miševe.

Uspešna supresija produkcije USP5 potvrđena je i u testu izmicanja šape pacova pod uticajem mehaničkog stimulusa koji su 24 sata pre incizije primili shRNK-USP5 intratekalno. 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. Ovaj rezultat ukazuje na pojavu smanjene hiperalgezije incizirane šape merene u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa kod životinja kod kojih je genetičkom manipulacijom suprimirana proizvodnja enzima USP5.

Izmerene struje koje potiču od T-kalcijumovih kanala na telima senzornih neurona spinalnih gangliona pacova koji su 24 sata pre incizije primili intratekalnu injekciju shRNK-USP5 bile su niže u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, gustina T-struja izmerena na telima senzornih neurona gangliona dorzalnih korenova pacova tretiranih shRNK-USP5 nije se značajno razlikovala od gustine T-struja izmerenih u kontrolnoj neinciziranoj grupi, na osnovu čega je zaključeno da prevencija produkcije enzima USP5 dovodi do smanjenja T-struja na nivo izmeren na neuronima izolovanih iz neinciziranih pacova.

Da interakcija između enzima USP5 i T-kanala doprinosi razvoju hiperalgezije u postincizionom bolu potvrđeno je u eksperimentima sa intratekalnom injekcijom tat III-IV peptida. Naime, primena tat peptida drugog dana nakon incizije dovela je do signifikantnog smanjenja hiperalgezije incizirane šape WT miša nakon injekcije, u odnosu na bazalno merenje u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa. Nasuprot tome, u miševa u kojih je genetičkom manipulacijom uklonjen gen za Cav3.2 kanal, izostao je efekat tat peptida u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu miša. 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, potvrđuje značaj ovog podtipa T-kanala u postincizionom modelu bola.

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

Intratekalna primena TTA-P2 (0,2155, 2,155, 21,55 i 215,5 µg) u zdravih pacova dovela je do statistički značajnog i dozno-zavisnog antinociceptivnog efekta u testu izmicanja šape pod uticajem toplote, kao i pod uticajem mehaničkog stimulusa. U postincizionom modelu bola, intratekalno primenjen TTA-P2 u dozi od 215,5 µg, prvog ili drugog dana nakon incizije, statistički značajno je umanjio hiperalgeziiju u testovima izmicanja šape pod uticajem toplote i mehaničkog stimulusa, u odnosu na kontrolnu grupu koja je primila rastvarač. Važno je istaći da TTA-P2 primenjen intratekalno dva sata nakon incizije u istoj dozi, nije signifikantno umanjio hiperalgeziiju u pacova u testu izmicanja šape pod uticajem toplote. Međutim, nakon ponovljene i.t. primene iste doze prvog, kao i drugog postincizionog dana, TTA-P2 je doveo do značajnog antihiperalgezijskog efekta u istom testu. Sve tri ponovljene i.t. doze TTA-P2 od 215,5 µg ispoljile su antihiperalgezijski efekat u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa dva sata, kao i prvog i drugog dana nakon incizije. TTA-P2 primenjen intratekalno neposredno pre izvođenja incizione operacije doveo je do statistički značajnog smanjenja termičke hiperalgezije dva sata, kao i narednih pet dana nakon incizije. Preventivna primena TTA-P2 u istoj i.t. dozi od 215,5 µg nije ispoljila statistički značajan efekat u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova nakon incizije.

Intratekalna primena epipregnanolona (0,053, 1,59 i 4,78 µg) u zdravih pacova dovela je do statistički značajnog i dozno-zavisnog antinociceptivnog efekta u testu izmicanja šape pod uticajem toplote. U testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova epipregnanolon je u najvišoj i.t. dozi od 4,78 µg pokazao statistički značajan antinociceptivni efekat. Intratekalna primena iste doze epipregnanolona prvog dana nakon incizije značajno je umanjila hiperalgeziiju u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa na šapu pacova.

Intratekalna primena  $3\beta$ -OH (0,016, 0,16 i 16  $\mu$ g) u zdravih pacova dovela je do statistički značajnog i dozno-zavisnog antinociceptivnog efekta u testovima izmicanja šape pod uticajem toplote i mehaničkog stimulusa, u odnosu na kontrolnu grupu koja je primila intratekalno rastvarač. Isti vid primene enantiomera  $3\beta$ -OH (ent- $3\beta$ -OH) u najvišoj dozi od 16  $\mu$ g u neinciziranih pacova nije doveo do antinociceptivnog efekta u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa. Intratekalno primenjen  $3\beta$ -OH, u dozi od 16  $\mu$ g prvog ili drugog dana nakon incizije, statistički značajno je umanjio hiperalgeziju u testovima izmicanja šape pod uticajem toplote i mehaničkog stimulusa. Nakon intratekalne primene u dozi od 16  $\mu$ g, 2 sata nakon incizije,  $3\beta$ -OH nije signifikantno umanjio termičku hiperalgeziju u pacova. Međutim, nakon ponovljene primene iste doze prvog dana nakon incizije istoj grupi životinja,  $3\beta$ -OH je ispoljio značajan antihiperalgezijski efekat u testu izmicanja šape pod uticajem toplote. Ista doza  $3\beta$ -OH primenjena intratekalno dva sata, kao i prvog dana nakon incizije, dovela je do statistički značajnog antihiperalgezijskog efekta u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa tokom oba dana merenja.

Ponovljena intraplantarna primena iste doze  $3\beta$ -OH od 16  $\mu$ g 2 sata, kao i prvog i drugog dana istoj grupi životinja nakon incizije, postigla je statistički značajno smanjenje osetljivosti incizirane šape u testovima izmicanja šape pod uticajem termičkog i mehaničkog stimulusa.

Preventivna intraperitonealna aplikacija  $3\beta$ -OH dovela je do značajnog smanjenja termičke i mehaničke hiperalgezije u pacova prvog, drugog i trećeg dana nakon incizije izvedene pod kombinovanom anestezijom koju su činili  $3\beta$ -OH, primenjen u pojedinačnoj dozi od 60 mg/kg i.p., i 1% izofluran. Poređenje je vršeno u odnosu na kontrolnu grupu koja je anestezirana na uobičajen način, tj. primenom 2,5% izoflurana.

#### 6) Efekti antagonista T-kanala na motornu spretnost 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 primenjenih testova.

### **C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE**

Rezultati ispitivanja uloge  $Ca_v3.2$  podtipa T-kalcijumovih kanala u razvoju postincizionog bola, kao i uloge deubikvitinacije T-kanala posredovane enzimom USP5 i antinociceptivnog dejstva antagonista T-kanala TTA-P2, epipregnanolona i  $3\beta$ -OH u postincizionom modelu bola upoređeni su sa relevantnim podacima iz literature.

Incizija kože i plantarnog mišića zadnje šape pacova i miševa u postincizionom modelu bola dovodi do razvoja bolne hiperosetljivosti – hiperalgezije. Razvoj hiperalgezije u postincizionom modelu bola korelira sa prethodno publikovanim rezultatima (Pogatzki i sar., 2002, Brennan i sar., 1996). Dužina trajanja hiperalgezije bila je uporediva kod pacova i WT miševa, za razliku od  $Ca_v3.2$  KO miševa, kod kojih je bila značajno skraćena. Ovaj nalaz po prvi put ukazuje na značajan doprinos  $Ca_v3.2$  podtipa T-kanala u razvoju hiperalgezije u postincizionom modelu bola. Prethodne studije su pokazale da antagonisti NMDA receptora



primenjeni spinalno ne dovode do smanjenja postoperativne mehaničke hiperalgezije u pacova (Zahn i Brennan, 1998), za razliku od antagonista AMPA i kainatskih receptora (Zahn i sar., 1998). Primena morfina nakon incizije dovodi do analgezije (Zahn i sar., 1997), dok njegova preoperativna hronična aplikacija može dovesti do pogoršanja postoperativne hiperalgezije u postincizionom modelu bola u pacova (Li i sar., 2001).

Pokazana uloga T-kanala u razvoju postincizionog bola u ovoj disertaciji pozitivno korelira sa postojećim nalazima da i drugi kalcijumovi kanali, poput N-tipa, kao i onih koji sadrže  $\alpha 2\delta$  subjedinicu, doprinose razvoju postincizionog bola (Wang i sar., 2000; Whiteside i sar., 2004). Međutim, upotreba antagonista ovih kanala limitirana je na lokalnu usled njihovog potencijala za izazivanje sistemskih neželjenih efekata, kao što su mučnina, nesvestica, nistagmus, retencija urina, poremećaj memorije i halucinacije (Bourinet i Zamponi, 2017). Takođe je poznato i da  $Na_v1.7$  podtip natrijumovih kanala učestvuje u razvoju postincizionog bola nakon hirurške incizije butnog mišića i kože (Sun i sar., 2018). Lokalni anestetici 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).

*In vivo* rezultati ove disertacije po prvi put ukazuju da brisanjem gena za  $Ca_v3.2$  izoformu kalcijumov kanal dolazi do skraćenja trajanja hiperalgezije u akutnom somatskom bolu, kao što je postincizioni. Poznato je da T-kanali igraju značajnu ulogu u razvoju mehaničke hiperalgezije i u drugim modelima bola, poput dijabetesne neuropatije (Latham i sar., 2009) ili neuropatija izazvanih podvezivanjem nerava (Choi i sar., 2007; Yue i sar., 2013). Globalno brisanje gena za  $Ca_v3.2$  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 rezultata *in vitro* elektrofizioloških eksperimenata po prvi je put izvršena klasifikacija okidanja AP tela perifernih senzornih neurona prema frekvenci, s obzirom da je primećeno da periferni neuroni u postincizionoj grupi okidaju visokofrekventne akcione potencijale neposredno nakon primenjenog stimulusa, za razliku od kontrolne grupe. Podela na pojedinačne i višestruke AP korelira sa prethodno publikovanim istraživanjem Zhang i sar. (2004).

U disertaciji je takođe po prvi put pokazano da senzorni neuroni nakon incizije okidaju statistički značajno više visokofrekventnih akcionih potencijala u odnosu na kontrolnu grupu, ukazujući na razvoj hiperekscitabilnosti perifernih senzornih neurona u ovom modelu bola. Hiperekscitabilnost senzornih neurona spinalnih gangliona je prethodno opisana u modelima neuropatskog (Jagodic i sar., 2007; Li i sar., 2017) i inflamatornog bola (Xie i sar., 2013), kao i kod pacijenata sa povredom nerava (Ochoa i sar., 1982).

Uloga T-kanala u razvoju hiperekscitabilnosti perifernih senzornih neurona u postincizionom modelu bola po prvi put je ispitana direktnom primenom selektivnog blokatora TTA-P2 na preparat tela ovih neurona. Pokazano je da TTA-P2 smanjuje frekvencu okidanja visokofrekventnih akcionih potencijala, broj akcionih potencijala, kao i frekvencu okidanja akcionih potencijala indukovanih različitim intenzitetom stimulusa u postincizionoj grupi. Uloga T-kanala u ekscitabilnosti senzornih neurona prethodno je opisana u različitim

modelima bola, kao što su dijabetesna neuropatija i paklitakselom-indukovana neuropatija (Nelson i sar., 2005; Jagodic i sar., 2007; Li i sar., 2017).

Ova doktorska disertacija po prvi put otkriva ulogu T-kanala u razvoju hiperekscitabilnosti u akutnom postincizionom modelu bola. Štaviše, jasno je pokazano da u postincizionom modelu bola dolazi do povećanja kalcijumovih struja 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). Na bazi svega navedenog, rezultati opisani u ovoj disertaciji su od izuzetne važnosti jer ukazuju na to da aktivacija T-kalcijumovih kanala doprinosi razvoju senzitivizacije i plastičnosti bolnih puteva u postincizionom modelu bola, te da bi preventivna primena antagonista T-kalcijumovih kanala mogla sprečiti pojavu senzitivizacije bolnih puteva nakon hirurške incizije.

Povećanje kalcijumovih struja koje potiču od T-kanala može nastati kao direktna posledica povećanja broja kanala na ćelijskoj membrani, što je i potvrđeno u neuropatskim modelima bola (Li i sar., 2017; Jagodic i sar., 2007; Latham i sar., 2009). U ovoj doktorskoj disertaciji nivo mRNA za  $Ca_v3.2$  kalcijumov kanal nije bio povećan nakon incizije. Takođe, imunoblot tehnikom nije ustanovljeno povećanje ukupnog proteina  $Ca_v3.2$  kanala. Međutim, imunocitohemijsko bojenje disociranih tela senzornih neurona spinalnih ganglija je pokazalo da u postincizionom modelu bola dolazi do povećanja membranske frakcije  $Ca_v3.2$  kanala na telima senzornih neurona dobijenih iz ipsilateralnih, u odnosu na senzorne neurone dobijene iz kontralateralnih spinalnih ganglija. Izostanak povećanja proteina  $Ca_v3.2$  kanala detektovanih imunoblot tehnikom može se ipak objasniti činjenicom da je analizirana ukupna ćelijska koncentracija proteina, a ne samo membranska funkcionalna frakcija proteina od interesa.

Mehanizam povećanja ekspresije  $Ca_v3.2$  podtipa T-kanala u različitim modelima bola je nedovoljno ispitan. Poznato je da na koncentraciju jonskih kanala utiče ubikvitinacija koja se izvodi pomoću enzima ubikvitin ligaze E3 (Staub i sar., 1996, 1997; Altier i sar., 2011). Značaj regulacije ubikvitinacije odnosno deubikvitinacije proteina u razvoju hiperalgezije i alodinije u neuropatskim i inflamatornim modelima bola je prethodno opisan (Ossipov i sar., 2007; Marangoudakis i sar., 2012; García-Caballero i sar., 2014). Međutim, uloga ubikvitinacije u održavanju ili pospešivanju stabilnosti jonskih kanala još uvek se utvrđuje. Prethodne studije su ukazale na značaj enzima USP5 koji pospešuje deubikvitinaciju  $Ca_v3.2$  kanala i sprečava njihovu degradaciju u proteazomima, kako u neuropatskom tako i inflamatornom modelu bola (García-Caballero i sar., 2014).

Rezultati imunoblot analize pokazali su da u postincizionom modelu bola dolazi do povećanja ekspresije USP5 u ipsilateralnim spinalnim ganglionima, čime se pospešuje stabilizacija  $Ca_v3.2$  kanala u ćelijskoj membrani (Komander i sar., 2009; Clague i sar., 2013). Ovaj nalaz po prvi put otkriva da u osnovi mehanizma koji dovodi do povećanja ekspresije membranske frakcije  $Ca_v3.2$  kanala u postincizionom modelu bola leži olakšana deubikvitinacija ovih kanala enzimom USP5. U prilog ovom otkriću govore i potonji rezultati bihevioralnih eksperimenata u kojima je otkriveno da intratekalna primena male RNK oblika ukosnice (shRNK-USP5), koja selektivno inhibira proizvodnju USP5 enzima, 24 sata pre incizije, dovodi do statistički značajnog smanjenja mehaničke hiperalgezije u pacova i WT, ali

ne i  $Ca_v3.2$  KO miševa. Ovaj nalaz pokazuje da je interakcija između USP5 enzima i  $Ca_v3.2$  kanala visokoselektivna i specifična i da bez obzira na povećanje koncentracije USP5 enzima nakon incizije, pronociceptivni efekat ovog enzima ispoljiće se samo u prisustvu  $Ca_v3.2$  kanala. U prilog rezultatima imunoblot analize ide i nalaz 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. Konačno, opisani rezultati elektrofizioloških eksperimenata su pokazali da intratekalna primena shRNK-USP5 u pacova 24 sata pre incizije dovodi do smanjenja gustine izmerenih T-kalcijumovih struja na disociranim telima senzornih neurona nakon incizije. Značaj ovih rezultata ogleđa se u otkriću uloge mehanizma deubikvitinacije  $Ca_v3.2$  kanala u modulaciji bolne transmisije u postincizionom modelu bola.

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 primena tat peptida olakšava sistemsku primenu antagonista natrijumovih i kalcijumovih kanala, čija je tradicionalna primena limitirana na lokalnu usled velikog potencijala za izazivanje sistemskih neželjenih reakcija (Anand i sar., 2015; Samad i sar., 2012). U disertaciji je korišćen tat III-IV peptid, koji sprečava interakciju između USP5 enzima i  $Ca_v3.2$  kanala i uspešno ublažava hiperalgezijsku u visceralnom (Gadotti i sar., 2015), kao i u inflamatornom i neuropatskom bolu u miševa (García-Caballero i sar., 2014). U disertaciji je po prvi put pokazano da intratekalna primena tat III-IV peptida dovodi do statistički značajnog smanjenja mehaničke hiperalgezije kod inciziranih WT, ali ne i kod  $Ca_v3.2$  KO miševa u testu izmicanja šape pod uticajem mehaničkog stimulusa. Ovaj rezultat ukazuje na to da regulacija deubikvitinacije može imati klinički značaj u otkrivanju novih analgetičkih terapija sa visokom selektivnošću za ciljani protein kao što je jonski kanal.

U bihevioralnim eksperimentima pokazano je da TTA-P2, selektivni antagonist T-kalcijumovih kanala, ispoljava antinociceptivno dejstvo u testu termičke i mehaničke hiperalgezije u zdravih pacova. Opisani rezultati disertacije u skladu su sa prethodnim ispitivanjem u kome je opisan antinociceptivni efekat antagonista T-kanala (Todorovic i sar., 2004).

U postincizionom modelu bola, po prvi put je pokazan antihiperalgezijski efekat antagonista T-kanala. Pojedinačna primena TTA-P2 prvog ili drugog dana nakon incizije ublažila je termičku i mehaničku hiperalgezijsku. Takođe, ponovljena primena TTA-P2 dva sata, prvog i drugog dana nakon incizije ispoljila je antihiperalgezijski efekat u testu termičke i mehaničke nocicepcije, sa izuzetkom prve doze (dva sata nakon incizije) koja nije ispoljila antihiperalgezijski efekat u testu termičke nocicepcije. Pojedinačna preventivna primena TTA-P2 neposredno pre izvođenja incizije je ispoljila antihiperalgezijski efekat u testu termičke, ali ne i u testu mehaničke nocicepcije. Navedeni rezultati su u skladu sa prethodnim nalazima analgetičke efikasnosti TTA-P2 u inflamatornom modelu bola u miševa, kao i u neuropatskom bolu u pacova (Choe i sar., 2011). I drugi antagonisti T-kanala pokazali su analgetičku efikasnost u akutnom bolu i u modelu iritabilnog kolona (Lee, 2013), kao i u neuropatskom i visceralnom modelu bola (Sekiguchi i sar., 2016; Kim i sar., 2003; Dogrul i sar., 2003). Konačno, poznato je da antagonisti T-kalcijumovih kanala ispoljavaju svoj antihiperalgezijski efekat u dijabetesnoj neuropatiji pre svega posredstvom  $Ca_v3.2$  kanala

(Obradovic i sar., 2014), ali i da selektivna blokada T-kanala u unilateralnoj perifernoj neuropatiji dovodi do analgezijskog efekta (Delfini i sar., 2013)

Analgetička efikasnost neurosteroida u postincizionom modelu bola nije do sada ispitana. Rezultati disertacije su pokazali da epipregnanolon,  $5\beta$ -redukovani neurosteroid ispoljava antinociceptivno dejstvo u testu termičke i mehaničke nocicepcije u zdravih pacova, kao i da pojedinačna doza ovog neurosteroida nakon incizije dovodi do ublažavanja mehaničke hiperalgezije. Ovaj nalaz korelira sa otkrićem da lokalna primena epipregnanolona ublažava termičku nocicepciju na dozno-zavisani način u zdravih pacova (Ayoola i sar., 2014).

Rezultati disertacije su pokazali da sintetski analog epipregnanolona,  $3\beta$ -OH, ujedno i selektivni antagonist T-kalcijumovih kanala (Todorovic i sar., 2004), ispoljava antinociceptivni efekat u zdravih pacova. U disertaciji je jasno pokazano da je ovaj efekat enantioselektivan i posredovan blokadom T-kanala, s obzirom da enantiomer ovog molekula, koji ne ispoljava afinitet prema T-kanalima, ne pokazuje antinociceptivni efekat u zdravih pacova. Pojedinačna primena  $3\beta$ -OH, prvog ili drugog dana nakon incizije u pacova, ispoljila je antihiperalgezijsko dejstvo u testovima osetljivosti na termički i mehanički stimulus. Nakon ponovljene primene  $3\beta$ -OH dva sata i prvog dana nakon incizije, zabeležen je antihiperalgezijski efekat oba dana u testu mehaničke hiperlagezije, dok je u testu termičke hiperalgezije antihiperalgezijski efekat bio evidentan prvog dana, ali ne i dva sata nakon incizije u pacova. Ponovljena intraplantarna primena  $3\beta$ -OH dva sata, prvog i drugog dana nakon incizije dovela je do antihiperalgezijskog efekta u testu termičke i mehaničke nocicepcije prvog drugog i petog postincizionog dana. Od izuzetnog je značaja napomenuti da je ponovljena primena ovog neurosteroida dovela do skraćenja vremena oporavka hiperosetljivosti na bolni stimulus na 5 dana, u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj je bilo potrebno 7 dana za oporavak. Konačno, preventivna pojedinačna intraperitonealna primena  $3\beta$ -OH, u kombinaciji sa subanestetičkom dozom izoflurana, indukovala je opštu anesteziju u pacova i dovela je do značajnog smanjenja termičke i mehaničke hiperalgezije nakon incizije.

U disertaciji je prvi put pokazano da sintetski neurosteroid  $3\beta$ -OH ispoljava analgetički efekat u postincizionom modelu bola. Poznato je da  $5\alpha$ -redukovana jedinjenja progesterona, kao što su dihidroprogesteron i alopregnanolon, ispoljavaju antialodinijski i antihiperalgezijski efekat u različitim modelima neuropatskog bola (Leonelli i sar., 2007; Meyer i sar., 2010, 2011; Pathirathna i sar., 2005a i 2005b). Takođe, alopregnanolon je ispoljio antinociceptivni efekat u formalinskom testu (Ocvirk i sar., 2008) i doveo do smanjenja alodinije i termičke hiperalgezije u karageninskom modelu inflamatornog bola (Svensson i sar., 2013). Novije studije su pokazale da neurosteroidi ispoljavaju analgetički efekat, između ostalog, posredstvom blokade T-kalcijumovih kanala (Ayoola i sar., 2014; Pathirathna i sar., 2005a, 2005b). 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).

Izostanak akutnog efekta TTA-P2 i  $3\beta$ -OH dva sata nakon incizije ukazuje na različit značaj T-kalcijumovih kanala u razvoju i održavanju termičke i mehaničke hiperalgezije. Ovoj pretpostavci u prilog govori i studija Reichl i sar. (2012) u kojoj je pokazano da muscimol,  $GABA_A$  agonista, ispoljava antinociceptivno dejstvo na termički, ali ne i na mehanički stimulus prvog dana nakon incizije.

Ispitana antinociceptivna doza TTA-P2 nije narušila motornu spretnost pacova, što je u skladu sa prethodno publikovanim podacima (Choe i sar., 2011). Ispitane doze epipregnanolona i  $3\beta$ -OH takođe nisu uticale na motornu sposobnost pacova. Trenutno nisu dostupni literaturni podaci za *in vivo* ispitivanja toksičnosti epipregnanolona i  $3\beta$ -OH.

#### **Citirana literatura:**

1. 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.
2. 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.
3. Ayoola C, Hwang SM, Hong SJ, Rose KE, Boyd C, Bozic N, Park JY, Osuru HP, DiGrucio 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.
4. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 1996; 64: 493–501.
5. 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.
6. Bourinet E, Zamponi GW. Voltage gated calcium channels as targets for analgesics. *Curr Top Med Chem* 2005a; 5: 539–46.
7. Chahine M, Desaphy JF. Recent Advances in Voltage-Gated Sodium Channels, their Pharmacology and Related Diseases. *Frontiers in pharmacology*. 2016; 8;7-20.
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.
9. 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.
10. Clague MJ, Barsukov I, Coulson JM, Liu H, Rigden DJ, Urbé S. Deubiquitylases from genes to organism. *Physiol Rev* 2013; 93: 1289–315.
11. 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. TFAA4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice. *Cell Rep* 2013; 5: 378–88.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Kim D, Park D, Choi S, Lee S, Sun M, Kim C, Shin HS. Thalamic control of visceral nociception mediated by T-type Ca $^{2+}$  channels. *Science* 2003; 302: 117–119.

17. 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.
18. 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.
19. Lee S. Pharmacological Inhibition of Voltage–gated Ca(2+) Channels for Chronic Pain Relief. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11: 606–20.
20. 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.
21. Li X, Angst MS, Clark JD. Opioid–induced hyperalgesia and incisional pain. *Anesth Analg* 2001; 93: 204–9.
22. 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.
23. Mashour GA, Mashour GA, Lydic R, editors. *Neuroscientific Foundations of Anesthesiology*. Oxford University Press; 2011 Oct 5.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Nelson MT, Joksovic PM, Perez–Reyes E, Todorovic SM. The endogenous redox agent L–cysteine induces T–type Ca<sup>2+</sup> channel–dependent sensitization of a novel subpopulation of rat peripheral nociceptors. *J Neurosci*. 2005; 25: 8766–8775.
30. 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.
31. Ochoa J, Torebjörk HE, Culp WJ, Schady W. Abnormal spontaneous activity in single sensory nerve fibers in humans. *Muscle Nerve* 1982; 5 :S74–7.
32. 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.
33. Orestes P, Osuru HP, McIntire WE, Jacus MO, Salajegheh R, Jagodic MM, Choe W, Lee J, Lee SS, Rose KE, Piro 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.
34. 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.
  35. 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.
  36. 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.
  37. Pogatzki EM, Gebhart GF, Brennan TJ. Characterization of Adelta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. *J Neurophysiol* 2002; 87: 721–31.
  38. Pogatzki EM, Raja SN. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology* 2003; 99: 1023–7.
  39. Rang HP, Dale MM, Ritter M, Flower R, Henderson G. Local anaesthetics and other drugs affecting sodium channels. *Pharmacology* 2007:638-42.
  40. Reichl S, Augustin M, Zahn PK, Pogatzki–Zahn EM. Peripheral and spinal GABAergic regulation of incisional pain in rats. *Pain* 2012; 153: 129–41.
  41. 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.
  42. 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(8): 1655-65.
  43. 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.
  44. 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.
  45. 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:
  46. 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.
  47. Todorovic SM, Pathirathna S, Brimelow BC, Jagodic MM, Ko SH, Jiang X, Nilsson KR, Zorumski CF, Covey DF, Jevtovic–Todorovic V. 5 $\beta$ -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.
  48. 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.
  49. 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; 41: 85–91.
  50. 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.

51. 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.
52. 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.
53. Zahn PK, Gysbers D, Brennan TJ. Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology* 1997; 86: 106–1077.
54. 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.
55. 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.
56. 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.



## **D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

### **Radovi u međunarodnim časopisima**

1. **Joksimovic SL**, Joksimovic SM, Tesic V, García-Caballero A, Feseha S, Zamponi GW, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. Selective inhibition of Ca<sub>v</sub>3.2 channels reverses hyperexcitability of peripheral nociceptors and alleviates postsurgical pain. *Sci Signal* 2018; 11(545): eaa04425. (M21)
2. **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* 2019; 13(1): 48-61. (M23)

### **Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)**

1. **Joksimovic SL**. Selective inhibition of Ca(V)3.2 channels reverses hyperexcitability of peripheral nociceptors and alleviates postsurgical pain. Oralna prezentacija. Regional meeting of Federation of European Neuroscience Societies. 10-13 July 2019, Belgrade, Serbia.
2. **Joksimovic SL**, Raol YH, Krishnan K, Covey DF, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. Novel neuroactive steroid hypnotic with T-channel blocking properties exerts effective analgesia in a post-surgical pain model. Poster. SfN annual meeting, San Diego, USA, November 2018.
3. **Joksimovic SL**, Joksimovic SM, Tesic V, Garcia-Caballero A, Jevtovic-Todorovic J, Zamponi GW, Todorovic SM. CaV3.2 T-type calcium channels are responsible for hyperexcitability of nociceptors in a post-surgical pain model. Poster. SfN annual meeting, Washington DC, USA, November 2017.
4. **Joksimovic S**, Joksimovic SM, Osuru H, Eggan P, Jevtovic-Todorovic J, Todorovic SM. The role of T-type calcium channels in the development of incisional pain model in rats. Poster. SfN annual meeting, San Diego, USA, November 2016.
5. Todorovic SM, **Joskimovic SL**, Evans JG, Eggan P, Jevtovic-Todorovic V. Glycosylation of Cav3.2 channels contributes to hyperalgesia in peripheral neuropathy of type 1 diabetes. Poster. 220.06/J4. 2016 Neuroscience Meeting Planner. San Diego. Society for Neuroscience, 2016.
6. **Joksimovic S**, Covey DF, Krishnan K, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. 5β-reduced neurosteroid enhances recovery and reduces hyperalgesia in a rodent model of postoperative pain. Poster. 693.17/M26. 2015 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015.

## **E. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE**

U postincizionom modelu bola po prvi put je pokazana uloga T-kalcijumovih kanala u razvoju hiperalgezije. Naime, globalno brisanje  $Ca_v3.2$  podtipa kalcijumovih kanala skraćuje vreme trajanja hiperalgezije nakon incizije. Ovaj podatak ukazuje po prvi put da bi blokada T-kanala mogla dovesti do ublažavanja hiperalgezije u postincizionom bolu.

Poseban naučni doprinos ove disertacije predstavlja otkriće hiperekscitabilnosti perifernih senzornih neurona i uloge T-kanala u njenom razvoju u postincizionom bolu. Pokazano je da registrovana hiperekscitabilnost nastaje usled povećane aktivnosti T-kanala na telima perifernih senzornih neurona i može se sprečiti primenom antagonista T-kanala. Štaviše, primena selektivnog antagoniste T-kalcijumovih kanala dovodi do normalizacije ekscitabilnosti senzornih neurona u stanje pre incizije. Ovaj nalaz predstavlja osnov za dalje ispitivanje analgetičkog efekta selektivnih antagonista T-kanala u postincizionom modelu bola.

Od izuzetnog značaja za istraživanje uloge T-kanala u prenosu nociceptivnih informacija je rasvetljenje mehanizma koji dovodi do povećanja aktivnosti T-kanala u postincizionom bolu. U postincizionom modelu bola povećana aktivnost ovih kanala korelira sa njihovom povećanom membranskom ekspresijom. Povećanje membranske frakcije ovih kanala je direktna posledica povećanja deubikvitinacije ovih kanala posredstvom povećane ekspresije USP5 enzima nakon incizije. Ovo otkriće objašnjava povećanu aktivnost ovih kanala i doprinos razvoju hiperekscitabilnosti perifernih senzornih neurona nakon incizije. Takođe, pomenuti nalaz može potencijalno biti i od značaja za dalji razvoj analgetičkih terapija, kao što su tat peptidi, koje bi prevenirale interakciju između T-kanala i USP5 enzima sa visokom selektivnošću za njihovo mesto interakcije na enzimu.

Zabeležen je značajan antihiperalgezijski efekat *in vivo* primene antagonista T-kalcijumovih kanala u postincizionom modelu bola. Posebno je važno otkriće da i neurosteroidi koji selektivno blokiraju T-kanale dovode do antihiperalgezijskog efekta u postincizionom modelu bola jer se može koristiti kao osnov za dalja klinička ispitivanja ovih supstanci u postoperativnom bolu.

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 analogima neuroaktivnih steroida, koji bi se primenjivali kao anestetici sa analgetičkim karakteristikama u ljudi. 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.

Podatak da antinociceptivne doze antagonista T-kanala ne narušavaju motornu spretnost eksperimentalnih životinja, ukazuju da su ove supstance bezbedne za primenu u dozama u kojima ispoljavaju antinociceptivno dejstvo.

Uzevši sve u obzir, otkriće novog mehanizma razvoja postoperativnog bola koji je posredovan T-kanalima otvara vrata novim potencijalnim terapijskim mogućnostima. Samim tim i 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.

## ZAKLJUČNO MIŠLJENJE

Pregledom završene disertacije pod nazivom „**Ispitivanje uloge kalcijumovih kanala T-tipa u animalnom modelu postincizionog bola**“ može se konstatovati da je kandidat diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar Sonja Joksimović uspešno ostvarila postavljene ciljeve istraživanja, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u dva međunarodna časopisa.

Stoga, predlažemo Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan Izveštaj i omogući Sonji Joksimović javnu odbranu doktorske disertacije.

Beograd, 17.10.2019. godine

### ČLANOVI KOMISIJE:

---

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

---

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

---

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