

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Janko M. Samardžić

***Uticaj negativne modulacije  
benzodiazepinskog mesta vezivanja  
GABA-A receptora na ispoljavanje  
različitih bihevioralnih efekata  
benzodiazepina kod pacova***

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Janko M. Samardžić

***The influence of negative modulation of  
benzodiazepine binding site of GABA-A  
receptor on the different behavioural  
effects expression of benzodiazepines  
in rats***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

Doktorska disertacija urađena je u Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj 175076.

Mentor: Dr Dragan Obradović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Članovi komisije:

Dr Milica Prostran, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr Ljiljana Gojković Bukarica, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr Dubravko Bokonjić, redovni profesor  
Univerzitet odbrane u Beogradu – Medicinski fakultet VMA

Datum odbrane:

*Mojim roditeljima*

*Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru profesoru dr Draganu Obradoviću na stručnoj, naučnoj a pre svega prijateljskoj pomoći u toku celokupnog rada.*

*Zahvaljujem se članovima komisije na dragocenim savetima, podršci i strpljenju.*

*Takođe, zahvaljujem se svim profesorima i kolegama Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu, na podršci koju su mi pružili.*

*Na kraju, zahvalio bih se porodici i dragim prijateljima, koji su uvek verovali u mene i podržali svaku moju odluku ili izbor.*

*Janko Samardžić*

## Uticaj negativne modulacije benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA-A receptora na ispoljavanje različitih bihejvioralnih efekata benzodiazepina kod pacova

### Sažetak

GABA ( $\gamma$ -aminobuterna kiselina) predstavlja glavni inhibitorni neurotransmiter centralnog nervnog sistema i većinu svojih inhibitornih efekata ostvaruje putem jonotropnih GABA-A receptora. Receptori koji sadrže  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , ili  $\alpha 5$  subjedinicu, u kombinaciji sa  $\gamma 2$  i nekom od  $\beta$  subjedinica, predstavljaju dominantnu frakciju GABA-A receptora. S obzirom na svoju kompleksnu strukturu, GABA-A receptori su označeni u ovom radu kao *GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorski kompleks*. GABA-ergička sinapsa je mesto delovanja nekoliko različitih klasa lekova koji moduliraju inhibitornu neurotransmisiju i koriste se u farmakoterapiji anksioznih poremećaja, poremećaja sna, epilepsije, obustave alkohola, kao i za uvođenje i održavanje anestezije. Nedavno je utvrđeno da lekovi sa antidepresivnim efektima i stabilizatori raspoloženja u značajnoj meri utiču i na GABA-ergičku transmisiju, a da promene u inhibitornoj neurotransmisiji mogu imati ključnu ulogu u patofiziologiji depresije. Ova hipoteza je potkrepljena i klinčkim nalazima u kojima je utvrđen redukovani nivo GABA-e u korteksu pacijenata koji boluju od depresije, a koji se normalizuje nakon terapije antidepresivima.

Benzodiazepini (BDZ), kao najčešće propisivani psihofarmaci, deluju kao pozitivni modulatori GABA-ergičke neurotransmisije i agonisti specifičnih BDZ receptora. Međutim, istraživanja lokalizacije i funkcionisanja BDZ receptora su pokazala postojanje nove, drugačije klase supstanci koje deluju na nivou ovih receptora ali kao negativni modulatori, odnosno inverzni agonisti. Naime, pokazano je postojanje supstanci, najčešće iz klase  $\beta$ -karbolina, koji stimulišu BDZ receptor, ali u suprotnom smislu od BDZ. Dok BDZ pokazuju anksiolitičke i amnezijske efekte, od inverznih agonista se očekuje da pokažu drugačije bihejvioralne efekte, anksiozene i potencijalno promnestičke efekte, odnosno uticaj na kogniciju i motivaciju. S jedne strane, genetska istraživanja, uz korišćenje modifikovanih linija životinja, ukazuju na korelaciju između poremećaja raspoloženja i promene nivoa GABA-ergičke neurotransmisije i gustine

pojedinih podtipova GABA receptora, dok su, s druge strane, komplementarna bihevioralna ispitivanja usmerena ka ispitivanju novosintetisanih liganada, kao i povezivanju pojedinih efekata BDZ i drugih liganada sa konkretnim podtipom GABA-A receptora.

Imajući u vidu, često kontradiktorne, podatke u literaturi o delovanju inverznih agonista na benzodiazepinsko mesto vezivanja  $GABA_A$ -BDZ-Cl receptorskog kompleksa, cilj istraživanja bio je da se, primenom dva komplementarna, i u oblasti bihevioralne farmakologije široko korišćena testa (aktivno izbegavanje averzivne draži i forsirano plivanje) ispita uticaj jednokratne i ponavljane primene rastućih doza metil 6,7-dimetoksi-4-etil- $\beta$ -karbolin-3-karboksilata (DMCM), inverznog agoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA-A receptora, na ispoljavanje različitih bihevioralnih efekata benzodiazepina kod pacova i da se, u okviru analize mehanizma dejstva, utvrdi da li se efekti inverznih agonista ostvaruju preko specifičnih mesta vezivanja u sklopu  $GABA_A$ -BDZ-Cl receptorskog kompleksa.

U testu aktivnog izbegavanja (AA), statistička analiza nije pokazala značajne razlike između grupa koje su tretirane rastvaračem i fiziološkim rastvorom, dok flumazenil nije značajno menjao bihevioralne parametre, odnosno broj uspešnih odgovora i parametar motorne aktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu. Statistička analiza je pokazala da jednokratna primena DMCM-a drugog dana u testu aktivnog izbegavanja utiče na broj odgovora AA i da doza od 0,1 mg/kg DMCM-a pokazuje facilitirajući uticaj na učenje, dok je flumazenil u potpunosti antagonizovao ovaj efekt. Promnestički efekt DMCM-a u dozi 0,1 mg/kg pokazan je i pri ponavljanoj primeni supstance. U testu forsiranog plivanja (FST), statistička analiza nije pokazala značajne razlike između grupa koje su tretirane rastvaračem i fiziološkim rastvorom u testu forsiranog plivanja. Takođe, flumazenil nije značajno menjao bihevioralne parametre, odnosno vreme imobilnosti životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Motorni parametri, u smislu plivanja i gnjurenja, nisu se značajno razlikovali ni kod jedne grupe. Jednokratna primena DMCM-a, drugog dana u testu forsiranog plivanja, utiče na vreme imobilnosti životinja i doza od 0,1 mg/kg DMCM-a smanjuje vreme imobilnosti, dok flumazenil u potpunosti antagonizuje ovaj efekt. Statistička analiza je pokazala i da ponavljana primena doze DMCM-a od 0,1 mg/kg, tokom 14 dana, statistički značajno smanjuje vreme imobilnosti životinja u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu

rastvaračem. U testu spontane lokomotorne aktivnosti, statistička analiza nije pokazala značajne razlike prilikom testiranja spontane lokomotorne aktivnosti između grupa koje su tretirane rastvaračem, fiziološkim rastvorom i flumazenilom, dok je najveća primenjena doza DMCM-a (1,0 mg/kg) pokazala hipolokomotorni uticaj, koji je antagonizovan flumazenilom.

Naša istraživanja su pokazala da DMCM, inverzni agonista benzodiazepinskog mesta vezivanja ima značajan uticaj na učenje reakcije aktivnog izbegavanja. DMCM u najmanjoj primenjenoj dozi povećava broj AA odgovora, odnosno poboljšava učenje. Tokom ponavljane primene, pokazano je da postoji statistički značajna korelacija između ove doze i efekta DMCM-a na učenje, što je u skladu sa nalazima drugih autora koji su pokazali da male doze negativnih modulatora GABA-ergičke neurotransmisije mogu biti korisne za podizanje vigiliteta i bolje učenje kod eksperimentalnih životinja. S druge strane, rastuće doze DMCM-a ne dovode do povećanja spontane lokomotorne aktivnosti, što ukazuje da učenje reakcije AA nije bila posledica povećane aktivnosti životinja.

Naša istraživanja upućuju i na značajne antidepresivne efekte inverznog agoniste DMCM-a u najmanjoj primenjenoj dozi, ali se takav trend gubi pri većim dozama. Koliko nam je poznato, naša studija je prvi izveštaj o uticaju inverznih agonista BDZ receptora na ponašanje pacova u testu forsiranog plivanja, kao i o uticaju ovih supstanci na motivaciju. Rezultati koje smo dobili su, na prvi pogled, iznenađujući i u suprotnosti sa postavljenim hipotezama da smanjenje GABA-ergičke neurotransmisije i aktivnosti GABA-A receptora doprinosi razvoju depresije. S druge strane, akutni antidepresivni efekti, pokazani u našem istraživanju, pokazuju značajnu sličnost sa nedavno objavljenim rezultatima efekata blokade glutamatskih NMDA receptora. S obzirom na hronični karakter depresivnih ispoljavanja, posebno je značajan rezultat da je antidepresivni efekt prisutan i nakon ponavljane primene DMCM-a tokom 2 nedelje.

Pokazan uticaj inverznih agonista benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA-A receptora na antidepresivnu aktivnost i učenje, u eksperimentalnim uslovima, u skladu je sa kliničkim nalazima, da su depresivni poremećaji često u komorbiditetu sa anksioznim poremećajima i kognitivnim oštećenjima. Stoga, sveukupni povoljni učinak negativne modulacije GABA-ergičke neurotransmisije može odražavati povoljne uticaje na kogniciju i motivaciju, istovremeno.



**Ključne reči:** GABA-A receptor, inverzni agonista, DMCM, BDZ mesto vezivanja, aktivno izbegavanje, forsirano plivanje, lokomotorna aktivnost, učenje, depresija.

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Medicinska farmakologija

**UDK:**

## **The influence of negative modulation of benzodiazepine binding site of GABA-A receptor on the different behavioural effects expression of benzodiazepines in rats**

### **ABSTRACT**

GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) is the major inhibitory neurotransmitter of central nervous system and most of its inhibitory effects achieve through ionotropic GABA-A receptors. Receptors containing  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , or  $\alpha 5$  subunit, in combination with  $\gamma 2$  and one of the  $\beta$  subunits, represent the dominant fraction of GABA-A receptors. Due to its complex structure, GABA-A receptors have been identified in this paper as a *GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl* receptor complex. GABA-ergic synapse is the site of action of several different classes of drugs that modulate inhibitory neurotransmission and are used in the pharmacotherapy of anxiety disorders, sleep disorders, epilepsy, alcohol cessation, and for the introduction and maintenance of anesthesia. It is increasingly recognized that drugs with antidepressant/mood-stabilizing effects profoundly alter GABAergic transmission, and that changes in inhibitory neurotransmission may play a key role in the pathophysiology of depression. This hypothesis is supported by clinical findings demonstrating reductions in cortical GABA levels in patients suffering with depression, which are restored to normal levels with antidepressant treatment.

Benzodiazepines (BDZ), as the most commonly prescribed psychotropic drugs, act as positive modulators of GABA-ergic neurotransmission and specific BDZ receptor agonists. However, studies of localization and functioning of BDZ receptor have shown the existence of a new, different class of substances that act at the level of the receptor but as negative modulators, or inverse agonists. Namely, it has been shown the existence of substances, mostly from the class  $\beta$ -carbolins, that stimulate BDZ receptor, but in the opposite sense of BDZ. While BDZ show anxiolytic and amnesic effects, inverse agonists are expected to show different behavioural effects, and potentially anxiogenic and promnesic effects, i.e. effects on cognition and motivation. On the one hand, genetic research, using modified animal lines, indicating a correlation between mood disorders and changes in levels of GABA-ergic transmission and density of certain subtypes of GABA receptors, whereas, on the other hand, a complementary

behavioural tests aimed to test the newly synthesized ligands, and connect the individual effects of BDZ and other ligands with a specific subtype of GABA-A receptors.

Bearing in mind, often contradictory information in the literature about the effect of inverse agonist of benzodiazepine site of the GABA-benzodiazepine receptor complex, this research has an aim that, by using two complementary, both in behavioural pharmacology widely used test (active avoidance of aversive stimuli and forced swimming test) examine the effect of single and repeated application of increasing doses of methyl 6,7-dimethoxy-4-ethyl- $\beta$ -carbolineum-3-carboxylate (DMCM), an inverse agonist of benzodiazepine binding sites of GABA-A receptors, the expression of different behavioural effects of benzodiazepines in rats and that, in the analysis of the mechanism of action, determine whether the effects of inverse agonists were achieved through specific binding sites within the GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptor complex.

In a study of active avoidance (AA), statistical analysis showed no significant difference between the groups treated with solvent and saline, while flumazenil was not significantly altered behavioural parameters, i.e. the number of successful matches and parameters of motor activity compared to the control group. Statistical analysis showed that a single application of DMCM, a second day in active avoidance test, affects the response of AA, and DMCM at the dose of 0.1 mg shows facilitating impact on learning, while flumazenil completely abolish this effect. Promnesic effect of DMCM at a dose 0.1 mg/kg was also shown with repeated application of the substance. In the forced swim test (FST), statistical analysis showed no significant difference between the groups treated with solvent and saline in the forced swimming. Also, flumazenil did not significantly alter behavioural parameters, i.e. immobility time of animals compared to the control group. Motor parameters, in terms of swimming and diving, did not differ significantly in none of the group. A single dose of DMCM, the second day of the forced swimming, affects the immobility time of animals, and DMCM at a dose of 0.1 mg/kg reduced immobility time, while flumazenil completely antagonised this effect. Statistical analysis showed that repeated application of DMCM 0.1 mg/kg for 14 days, significantly reduced the time of immobility of animals compared to the control group treated with solvent. In a test of spontaneous locomotor activity, statistical analysis showed no significant differences when testing spontaneous locomotor activity between

the groups treated with solvent, saline and flumazenil, while the highest applied dose of DMCM (1,0 mg/kg) showed hypolocomotor effect, which was antagonized by flumazenil.

Our research has shown that DMCM, a benzodiazepine binding site inverse agonist has a significant impact on active avoidance learning. DMCM, at a lowest applied dose, increased the number of AA responses and improved learning. During repeated application, it is shown the statistically significant correlation between the dose and the effect of DMCM on learning, which is consistent with findings of other authors who have shown that small doses of negative modulators of GABA-ergic neurotransmission may be useful to raise vigilance and better learning in animal experiments. On the other hand, higher doses of DMCM did not lead to an increase in spontaneous locomotor activity, suggesting that learning reactions AA was not a consequence of increased activity of animals.

Our findings also pointed to significant antidepressant effects of inverse agonists DMCM at the lowest applied dose, but this trend was lost at higher doses. To the best of our knowledge, our study one of the first reports the influence of a BDZ receptor inverse agonist DMCM on rat behaviour in forced swim test, as well as the impact of these substances on the motivation. At first glance, our results seem surprising and contradict the certain hypothesis that reduction of GABA-ergic neurotransmission and decreased GABA-A receptor activity contribute to the development of depression. On the other hand, the acute antidepressant effects observed in our study, showed striking similarity to the recently published results of NMDA glutamate receptors blocking effects. Given the chronic nature of depressive manifestations, particularly significant result that the antidepressant effect is present even after repeated use of DMCM during two weeks.

The demonstrated impact of BDZ receptor inverse agonists on antidepressant activity and learning in experimental conditions is consistent with clinical findings that depressive disorders often comorbid with anxiety disorders and cognitive impairments. The overall effect of negative modulation of GABA-ergic neurotransmission may thus reflect better performance and effects on both cognition and motivation enhancements.

**Keywords:** GABA-A receptor, inverse agonist, DMCM, BDZ binding site, active avoidance, forced swimming, locomotor activity, learning, depression.

**Scientific field:** Medicine

**Major in:** Medical Pharmacology

**UDK:**

## Lista skraćenica

AA: engl. active avoidance – aktivno izbegavanje

BDZ: benzodiazepini

CNS: centralni nervni sistem

DMCM: metil 6,7-dimetoksi-4-etil- $\beta$ -karbolin-3-karboksilat

D 0,1; D 0,2...: grupa životinja tretirana označenom dozom DMCM-a u mg/kg

D 0,1 + F 10,0 ...: kombinovana primena DMCM-a i flumazenila u označenim dozama

F 5,0; F 10,0...: grupa životinja tretirana označenom dozom flumazenila u mg/kg

FST: engl. forced swim test – test forisiranog plivanja

GABA:  $\gamma$ -aminobuterna kiselina

GABA-A: tip A receptora za  $\gamma$ -aminobuternu kiselinu

ITC: eng. intertrial crossing – prelasci životinje s jedne na drugu stranu kaveza za AA u periodima između pokušaja

i.p.: intraperitonealno

p: statistička značajnost

SEM: eng. standard error of mean – standardna greška

# SADRŽAJ

<b>I UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. GABA kao neurotransmiter	2
1.2. Tipovi receptora za GABA-u	3
1.3. GABA <sub>A</sub> -BDZ-hloridni kanal receptorski kompleks	4
1.3.1. Mehanizam delovanja GABA-e	5
1.3.2. Ligandi za GABA <sub>A</sub> -BDZ-Cl receptorski kompleks	6
1.3.3. Benzodiazepinski (BDZ) receptor	7
1.3.4. Benzodiazepinski receptor kao mesto delovanja agonista i inverznih agonisa	10
1.3.5. Endogeni ligandi za BDZ receptor	12
1.4. Bihejvioralni efekti modulatora BDZ receptora	13
1.5. Učenje zavisno od biohemijskog miljea	15
1.6. Psihofiziološke osnove reakcije aktivnog izbegavanja i forsiranog plivanja	16
<b>II CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	<b>18</b>
<b>III MATERIJAL I METODE</b>	<b>19</b>
3.1. Etičnost procedure	22
3.2. Metoda određivanja učenja reakcije aktivnog izbegavanja (AA)	22
3.2.1. Protokol 2 x 100 pokušaja	24
3.2.2. Protokol 5 x 50 pokušaja	24
3.3. Metoda određivanja učenja reakcije forsiranog plivanja (FS)	25
3.4. Merenje spontane lokomotorna aktivnost	26
3.5. Statistička obrada rezultata	26

<b>IV REZULTATI</b>	28
4.1. Test aktivnog izbegavanje averzivne draži	28
4.2. Test forsiranog plivanja	34
4.3. Test spontane lokomotorne aktivnosti	38
<b>V DISKUSIJA</b>	41
5.1. Aktivno izbegavanje averzivne draži i učenje	44
5.2. Forsirano plivanje, antidepresivni efekti i spontana lokomotorna aktivnost	48
<b>VI ZAKLJUČCI</b>	52
ZNAČAJ REZULTATA	53
<b>VII LITERATURA</b>	54
<b>VIII DODATAK</b>	69
<i>LISTA PUBLIKOVANIH RADOVA I SAOPŠTENJA IZ DOKTORATA</i>	69
<i>LISTA ILUSTRACIJA</i>	70
<b>IX BIOGRAFIJA AUTORA</b>	72
<b>X PRILOZI</b>	73



## I UVOD

$\gamma$ -aminobuterna kiselina (GABA) predstavlja glavni inhibitorni neurotransmiter centralnog nervnog sistema – CNS (Jacob i sar., 2008). O njenom značaju i rasprostranjenosti u CNS-u najbolje govori podatak da svaka treća hemijska sinapsa u mozgu koristi GABA-u kao neurotransmiter (Burt, 2003). GABA-ergička sinapsa je i mesto delovanja nekoliko različitih klasa lekova koji moduliraju inhibitornu neurotransmisiju i koriste se u farmakoterapiji anksioznih poremećaja, poremećaja sna, epilepsije, obustave alkohola, kao i za uvođenje i održavanje anestezije (Korpi i sar., 2002). Među ovim lekovima benzodiazepini (BDZ) su već duži niz godina u centru pažnje naučne i stručne javnosti kao lekovi sa širokim spektrom indikacija i predstavljaju zlatni standard u lečenju anksioznih poremećaja (Sramek i sar., 2002). Međutim, rezultati najnovijih genetskih istraživanja sve više ukazuju na značaj GABA-ergičke neurotransmisije i njene modulacije ne samo kod anksioznih, već i kod depresivnih ispoljavanja i drugih neuroloških i neuropsihijatrijskih oboljenja (Olsen i Sieghart, 2008; Cherlyn i sar., 2010). Nedavno je utvrđeno da lekovi sa antidepresivnim efektima i stabilizatori raspoloženja u značajnoj meri utiču i na GABA-ergičku transmisiju (Hines i sar., 2012; Kalueff i sar., 2007), a da promene u inhibitornoj neurotransmisiji mogu imati ključnu ulogu u patofiziologiji depresije (Luscher i sar., 2011). Ova hipoteza je potkrepljena i klinčkim nalazima u kojima je utvrđen redukovan nivo GABA-e u korteksu pacijenata koji boluju od depresije, a koji se normalizuje nakon terapije antidepresivima (Krystal i sar., 2002).

BDZ, kao najčešće propisivani psihofarmaci, deluju kao pozitivni modulatori GABA-ergičke neurotransmisije i agonisti specifičnih BDZ receptora (Barnard i sar., 1998). Međutim, istraživanja lokalizacije i funkcionisanja BDZ receptora su pokazala postojanje nove, drugačije klase supstanci koje deluju na nivou ovih receptora ali kao negativni modulatori, odnosno inverzni agonisti. Naime, pokazano je postojanje supstanci, najčešće iz klase  $\beta$ -karbolina, koji stimulišu BDZ receptor, ali u suprotnom smislu od BDZ (Obradović i sar., 2002, 2003). Dok BDZ pokazuju anksiolitičke i amnezijske efekte, od inverznih agonista se očekuje da pokažu anksioгене i

potencijalno promnesticke efekte, odnosno uticaj na kogniciju i motivaciju. Genetska istraživanja, uz korišćenje modifikovanih linija miševa, ukazala su na korelaciju između depresivnog ponašanja i promene nivoa GABA-ergičke neurotransmisije i gustine pojedinih podtipova GABA receptora u specifičnim regionima CNS-a (Earnheart i sar., 2007; Shen i sar., 2010). S druge strane, bihevioralna ispitivanja su usmerena na povezivanju pojedinih efekata BDZ i drugih liganada sa konkretnim podtipom receptora (Tauber i sar., 2003; van Rijnsoever i sar., 2004) i neophodna su u cilju razjašnjavanja i pojačavanja rezultata istraživanja na genetski modifikovanim životinjama (Millan, 2003; Savić i sar., 2005, 2008). Perspektiva ovih komplementarnih ispitivanja jeste utvrđivanje veze koja postoji između GABA-ergičke neurotransmisije, procesa učenja, kognitivnih i emotivnih procesa i, s druge strane, razvoj selektivnih lekova, sa specifičnim i selektivnim profilom dejstava.

### **1.1. GABA kao neurotransmiter**

GABA je glavni inhibitorni neurotransmiter u mozgu sisara (Jacob i sar., 2008). Procenjeno je da 30-40 % svih sinapsi u centralnom nervnom sistemu (CNS) pripada GABA-ergičkom sistemu. Sadržaj GABA-e u različitim strukturama CNS-a varira. Najviše je ima u supstanciji nigri, globusu palidusu i hipotalamusu, a najmanje u frontalnom, motornom i cerebelarnom korteksu. Koncentracije GABA-e u strukturama CNS-a su mikromolarne i znatno su veće nego u drugim tkivima.

GABA je neesencijalna amino kiselina. U mozgu sisara postoji enzimski sistem za njenu sintezu iz glutaminske kiseline. Ova sinteza se odvija pod dejstvom enzima piridoksal fosfat zavisne dekarboksilaze glutaminske kiseline (GAD). GAD enzim nalazi se u dve izoforme, kodirane različitim genima, koje se razlikuju u afinitetu za kofaktor, piridoksal fosfat, i subcelularnoj lokalizaciji (Petroff, 2002). GABA, sintetisana u nervnim ćelijama deponuje se u sinaptičkim vezikulama, kao i drugi neurotransmiteri, a iz njih se oslobađa pri depolarizaciji membrane presinaptičkih završetaka GABA-ergičkih neurona. Specifični transportni proteini obezbeđuju brzo

uklanjanje oslobođenog transmitera iz sinaptičke pukotine u GABA-ergički završetak i astrocite.

Otkriće GABA-e kao glavnog inhibitornog neurotransmitera izmijenili su u mnogome viđenje načina funkcionisanja CNS. Naime, glutamat je glavni transmiter brze ekscitatorne, a GABA glavni transmiter brze inhibitorne sinaptičke neurotransmisije. Uravnoteženost ekscitatornih i inhibitornih signala posredovanih glutatom i GABA-om primarno određuje funkcionalni status CNS-a (Petroff, 2002). Smanjena ili povećana aktivnost jednog ili drugog sistema se povezuje sa nizom neuroloških i psihijatrijskih oboljenja (Whiting, 2003). Posebno je značajna uloga GABA-ergičke neurotransmisije u etiologiji i patogenezi poremećaja raspoloženja i epilepsije (Jacob i sar., 2008; Jones-Davis i Macdonald, 2003; Millan, 2003).

## 1.2. Tipovi receptora za GABA-u

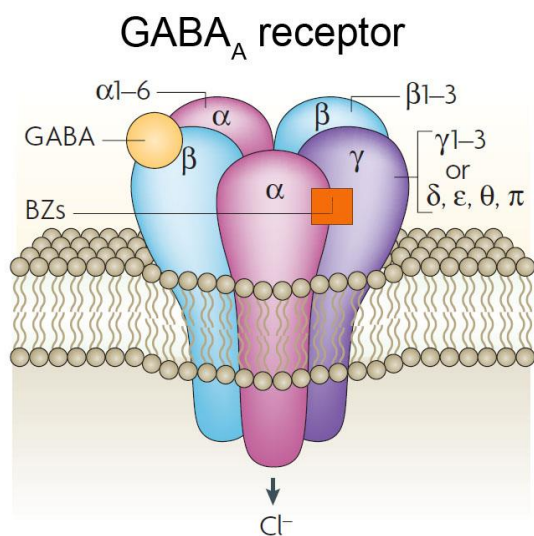
GABA deluje na dva tipa receptora: ligand-zavisne jonske kanale i G-protein-vezane receptore. Svi jonotropni receptori za GABA-u se označavaju kao GABA-A receptori, dok su metabotropni receptori GABA-B tipa. GABA receptori su povezani najčešće sa hloridnim kanalom, ali u različitoj meri mogu biti povezani i sa natrijumskim, kalijumskim i kalcijumskim kanalom. GABA-A receptori, u centralnom nervnom sistemu, posreduju većinu inhibitornih dejstava GABA-e (Jacob i sar., 2008). S obzirom na svoju kompleksnu strukturu, označeni su u ovom radu kao *GABA<sub>A</sub>-BDZ-hloridni kanal receptorski kompleks*. GABA-B receptori su lokalizovani pre- i post-sinaptički, negativno modulišu adenilil ciklazu i sintezu inozitol trifosfata, sa krajnjim efektom aktivacije kalijumskih kanala i/ili inhibicije voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala. Zavisno od lokalizacije GABA-B receptora, inhibitorni uticaji posredovani GABA-om mogu da budu potencirani (postsinaptički receptori, presinaptički heteroreceptori na glutamatergičkim završecima) ili umanjeni (autoreceptori) (Bettler i sar., 2004; Olsen i Sieghart, 2008).

### 1.3. GABA<sub>A</sub>-BDZ-hloridni kanal receptorski kompleks (GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl)

GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorski kompleks čine pentamerni transmembranski proteini koji formiraju jonski kanal selektivno permeabilan za hloridni anjon (Olsen i Sieghart, 2008). Pretežno su lokalizovani u sinapsama, na postsinaptičkoj membrani. U brojnim regijama su lokalizovani i ekstrasinaptički, što je posebno izraženo za GABA-A receptore koji sadrže  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  ili  $\alpha 6$  podjedinicu (Brunig i sar., 2002; Fritschy i Brunig, 2003). GABA-A receptori su prisutni i na glijalnim ćelijama i mogli bi da imaju značajnu ulogu u adaptaciji ovih ćelija potrebama okolnih neurona (Lin i Bergles, 2004). GABA-ergički mehanizmi su uključeni i u metaboličke procese (Korpi i sar., 2002). Utvrđena je negativna korelacija između intenziteta GABA-ergičke neurotransmisije i metaboličkih procesa u moždanom tkivu (Obradović i sar., 2002, 2003). Aktivacija GABA-A receptora dovodi do promene konformacijskog stanja pripadajućeg jonskog kanala, što za posledicu ima povećanje provodljivosti za hloridne jone (Korpi i sar., 2002; Olsen i Sieghart, 2008). Na samom GABA-A receptoru je utvrđeno 14 različitih, strukturno specifičnih mesta vezivanja, koja predstavljaju receptorska mesta u užem smislu (Chebib i Johnston, 2000).

Do sada je klonirano je 19 podjedinica GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorskog kompleksa, a podjedinice su svrstane u nekoliko strukturno povezanih podfamilija koje obuhvataju izoforme visokog stepena homologije ( $\alpha$  1-6,  $\beta$  1-3,  $\gamma$  1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\rho$  1-3) (**Slika 1**). Najčešće zastupljena receptorska populacija je agregat sastavljen od dve  $\alpha$ , dve  $\beta$  i jedne  $\gamma$  podjedinice (Jacob i sar., 2008). Redi su receptori koji pored dve  $\alpha$  i dve  $\beta$  podjedinice sadrže neku drugu, ne- $\gamma$  podjedinicu, a postoje i receptori sastavljeni samo od  $\alpha$  i  $\beta$  izoformi (Fritschy i Möhler, 1995). S obzirom da dve različite  $\alpha$  i/ili  $\beta$  podjedinice mogu da budu prisutne u istom receptoru, u mozgu, najverovatnije postoji više od 500 različitih GABA-A receptora (Sieghart, 2000), Međutim, imunoprecipitaciona ispitivanja pokazuju da je broj glavnih podtipova GABA-A receptora manji od 10, sa kombinacijom  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  prisutnom u 43%,  $\alpha_2\beta_2\gamma_3$  u 18%, i  $\alpha_3\beta_n\gamma_{2/3}$  u 17% slučajeva (McKernan i Whiting, 1996; McKernan, 2002). S druge strane, opsežna imunocitohemijska istraživanja distribucije 13 najčešćih podjedinica ( $\alpha$  1-6,  $\beta$  1-3,  $\gamma$  1-3,  $\delta$ ) u mozgu pacova, pokazuju da ogromna većina receptora sadrži  $\gamma_2$  podjedinicu,

dok su  $\delta$  i  $\gamma_1$  podjedinice ograničene na veoma mali broj područja. U manjoj koncentraciji,  $\gamma_3$  podjedinica je difuzno prisutna u celom mozgu. Od  $\alpha$  podjedinica,  $\alpha_1$  pokazuje najizraženiju imunoreaktivnost i prisutna je praktično u svim moždanim regijama. Ostale  $\alpha$  podjedinice više su ograničene na pojedine regije (Pirker i sar., 2000).



**Slika 1.** Shematski prikaz GABA-A receptora i njegovih subjedinica (Jacob i sar., 2008).

### 1.3.1. Mehanizam delovanja GABA-e

Većina farmakoloških efekata GABA-e odvija se preko aktivacije GABA-A receptora koja ima za posledicu otvaranje  $\text{Cl}^-$  kanala, što dovodi do povećanja provodljivosti postsinaptičke membrane. Posledica GABA-om povećane provodljivosti membrane zavisiće od razlike membranskog potencijala mirovanja i ravnotežnog elektrohemijskog potencijala za  $\text{Cl}^-$  jone (Atack, 2009). Najčešće je ravnotežni elektrohemijski potencijal  $\text{Cl}^-$  jona negativniji od membranskog potencijala mirovanja. U tom slučaju se, pri otvaranju  $\text{Cl}^-$  kanala, povećava ulazak  $\text{Cl}^-$  jona u ćeliju do uspostavljanja ravnotežnog potencijala, što će imati za posledicu hiperpolarizaciju ćelijske membrane. Kada je ravnotežni potencijal za  $\text{Cl}^-$  jone pozitivniji od potencijala mirovanja ćelijske membrane, dolazi do depolarizacije membrane. U svakom slučaju,

pri promeni provodljivosti za  $\text{Cl}^-$  jone pri aktivaciji GABA-A receptora, dolazi do smanjenja efikasnosti, ekscitatorne  $\text{Na}^+$  konduktance, u smanjenju membranskog potencijala do kritičnog depolarizacionog nivoa, na kome će nastati akcioni potencijal. Posledica toga je da u oba slučaja stimulacija GABA-A receptora dovodi do inhibitornog efekta na postsinaptičkoj membrani. Većina GABA-ergičkih neurona su interneuroni koji inervišu druge neurone u istoj strukturi mozga. Ove lokalne neuronske veze mogu imati funkciju ushodne ili povratne inhibicije, a ona može biti presinaptička i postsinaptička. GABA-ergički neuroni mogu biti u seriji (npr. u cerebelarnom korteksu), tako da aktivacija jednog GABA neurona ima za posledicu dezinhibiciju neurona inervisanog drugim GABA-ergičkim neuronom (Obradović i sar., 2003, 2006; Olsen i Sieghart, 2008).

### **1.3.2. Ligandi za GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorski kompleks**

Utvrđeno je, do sada, 14 različitih, strukturno specifičnih mesta na GABA-A receptoru: 1) mesto vezivanja GABA-e i drugih agonista, kao i kompetitivnih antagonista; 2) pikrotoksinsko mesto u jonskom kanalu; 3) mesto vezivanja barbiturata; 4) mesto vezivanja neuroaktivnih steroida; 5) benzodiazepinsko (BDZ) mesto; 6) mesto vezivanja etanola; 7) stereoselektivna mesta vezivanja inhalacionih anestetika; 8) mesto vezivanja diuretika furosemida; 9) mesto vezivanja  $\text{Zn}^{2+}$  jona; 10) mesto za vezivanje drugih bivalentnih katjona, 11) mesto za  $\text{La}^{3+}$  jone; 12) mesta vezivanja fosfolipida; 13) mesta za fosforilaciju specifičnim protein kinazama; i 14) mesta uključena u interakciju GABA<sub>A</sub> receptora i mikrotubula, koji učestvuju u grupisanju receptora na postsinaptičkim membranama (Chebib i Johnston, 2000). Dodatno, postoje mesta vezivanja antikonvulziva loreklezola i "agonističko" mesto za metil 6,7-dimetoksi-4-etil-(3-karbolin-3-karboksilat (DMCM), koja nisu u potpunosti definisana (Korpi i sar., 2002).

### 1.3.3. Benzodiazepinski (BDZ) receptor

Još sedamdesetih i osamdesetih godina XX veka pretpostavljeno je da se BDZ mesta vezivanja, odnosno BDZ receptori, koji su prostorno i funkcionalno povezani sa GABA receptorima, nalaze različito zastupljeni u pojedinim delovima mozga. Najviše BDZ receptora ima u cerebralnom korteksu (posebno u frontalnom delu), nešto manje u cerebelarnom korteksu, strukturama limbičkog sistema, talamusu i hipotalamusu, a najmanje u moždanom stablu i kičmenoj moždini (Braestrup i Squires, 1977; Braestrup i Nielsen, 1980; Möhler i Okada, 1977; Möhler i Richard, 1981). Kasnije je utvrđeno da se BDZ mogu vezati za receptore koji nisu vezani za GABA-ergički sistem, a primarno su lokalizovani na spoljašnjoj membrani mitohondrija, u većini tkiva (Gavish i sar., 1999; Olsen i Sieghart, 2008). Međutim, ovi receptori, iako prisutni i u CNS-u, označavaju se kao periferni benzodiazepinski receptori, koji poseduju nizak afinitet za BDZ-e (Gavish i sar., 1999), i značajni su za regulaciju transporta holesterola u endokrinim i drugim tkivima (Lacapere i Papadopoulos, 2003).

BDZ i drugi ne-benzodiazepinski analozi koji se vezuju za BDZ regulatorno mesto (BDZ receptor), smešteno na međupovršini između  $\alpha$  i  $\gamma_2$  podjedinice, alosterno povećavaju afinitet GABA-e za receptor (Sigel i Buhr, 1997). Posledica ovog modulatornog uticaja je porast frekvence otvaranja jonskog kanala u prisustvu date koncentracije neurotransmitera, odnosno, porast efikasnosti GABA-ergičke neurotransmisije (Mehta i Ticku, 1999). BDZ receptor zavisi od prisustva  $\gamma_2$ -podjedinice, ali selektivnost sa kojom se BDZ ligandi vežu za GABA<sub>A</sub> receptore različite strukture prevashodno zavisi od šest različitih  $\alpha$  podjedinica. Tako, zolpidem ima visok afinitet vezivanja za GABA<sub>A</sub> receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu (Rudolph i sar., 2001; Möhler i sar., 2001; 2002). Danas se GABA-A receptori koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu uglavnom označavaju kao GABA<sub>A1</sub> receptori. 1,4-BDZ, poput diazepama, sa približno istim afinitetom se vezuju za GABA<sub>A1</sub> receptore kao i za GABA-A receptore koji sadrže  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , i  $\alpha_5$  podjedinicu, koji se označavaju kao GABA<sub>A2</sub>, GABA<sub>A3</sub>, i GABA<sub>A5</sub> receptori. Prema tome, diazepam pokazuje komparabilan afinitet za sve BDZ-senzitivne receptore (GABA-A receptori koji sadrže  $\gamma_2$ ,  $\beta$ , i  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ili  $\alpha_5$  podjedinicu), dok se ne vezuju za BDZ- nesenzitivne receptore (receptori koji sadrže  $\alpha_4$

ili  $\alpha_6$  podjedinicu). Molekulski supstrat ove pojave je razjašnjen: BDZ-senzitivni receptori poseduju aminokiselinsku reziduu histidina (H) u N-terminalnom delu  $\alpha$ -podjedinice kritičnom za interakciju sa molekulom liganda (na poziciji 101 u  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  podjedinici, odnosno pozicijama 126 i 105 u  $\alpha_3$  i  $\alpha_5$  podjedinicama) (Benson i sar., 1998; Möhler i sar., 2002), dok  $\alpha_4$  i  $\alpha_6$  podjedinice u odgovarajućoj poziciji sadrže reziduu arginina (R) (Knoflach i sar., 1996). Prema tome, BDZ i srodna jedinjenja su alosterni modulatori jedne subpopulacije GABA-A receptora.

Na jednom receptorskom kompleksu postoji samo jedno mesto prepoznavanja BDZ (BDZ receptor), iako, po pravilu, ovaj proteinski kompleks poseduje dve  $\alpha$  podjedinice (Williams i Akabas, 2000, 2001). Naime, i  $\gamma$  podjedinica, određenim aminokiselinskim reziduama, učestvuje u formiranju BDZ receptora, a, najverovatnije je smeštena u susedstvu samo jedne  $\alpha$  podjedinice, tako da mogućnost vezivanja drugog molekula BDZ preko druge  $\alpha$  podjedinice ostaje nerealizovana. S druge strane, GABA se vezuje za receptorsko mesto smešteno na međupovršini  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica, koje su zastupljene sa dva para međusobno susednih makromolekula, tako da se dva molekula neurotransmitera mogu vezati za jedan receptorski kompleks.

Elektrofiziološka ispitivanja pokazuju da BDZ, primenjeni u nanomolarnim koncentracijama, dovode do konformacijskih promena jednog veznog mesta za GABA-u, i to najverovatnije onog u čijem formiranju učestvuje  $\alpha$  podjedinica koja je učestvovala i u vezivanju BDZ. Prema tome, zahvaljujući premeštanju konformacijske promene sa  $\alpha$ - $\gamma$  međupovršine (BDZ receptor) ka susednoj  $\alpha$ - $\beta$  međupovršini (vezno mesto za GABA-u), BDZ povećavaju afinitet za vezivanje jednog molekula GABA-e. Konformacijske promene se ne prenose do druge  $\alpha$  podjedinice, odnosno veznog mesta za drugi molekul GABA-e (Williams i Akabas, 2001), što bi moglo objasniti činjenicu da BDZ ne mogu sami da otvore receptorski jonski kanal, odnosno, za razliku od barbiturata, ne mogu da deluju u odsustvu GABA-e. Kao rezultat prikazanog mehanizma interakcije BDZ-a i GABA-A receptorskog kompleksa nastaju standardni farmakološki efekti BDZ-a: redukcija anksioznosti, sedacija, indukcija sna, smanjenje mišićnog tonusa, otežavanje motorne koordinacije, suzbijanje konvulzivne aktivnosti, anterogradna amnezija, razvoj zavisnosti (Jacob i sar., 2008).



Receptori koji sadrže  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , ili  $\alpha_5$  subjedinicu, u kombinaciji sa  $\gamma_2$  i nekom od  $\beta$  subjedinica, predstavljaju dominantnu frakciju GABA-A receptora (Möhler i sar., 2002; Olsen i Sieghart, 2008). Oko 60% svih GABA-A receptora sadrži  $\alpha_1$  subjedinicu. Retka su područja u kojima su ovi receptori odsutni; primer su motoneuroni kičmene moždine (Möhler i sar., 2002), a distribucija u pojedinim regijama je veoma neujednačena (Pirker i sar., 2000). U amigdaloidnom kompleksu na primer,  $\alpha_1$  subjedinica je dominantno zastupljena u bazolateralnom jedru, a malo prisutna u centralnom jedru (Kaufmann i sar., 2003).

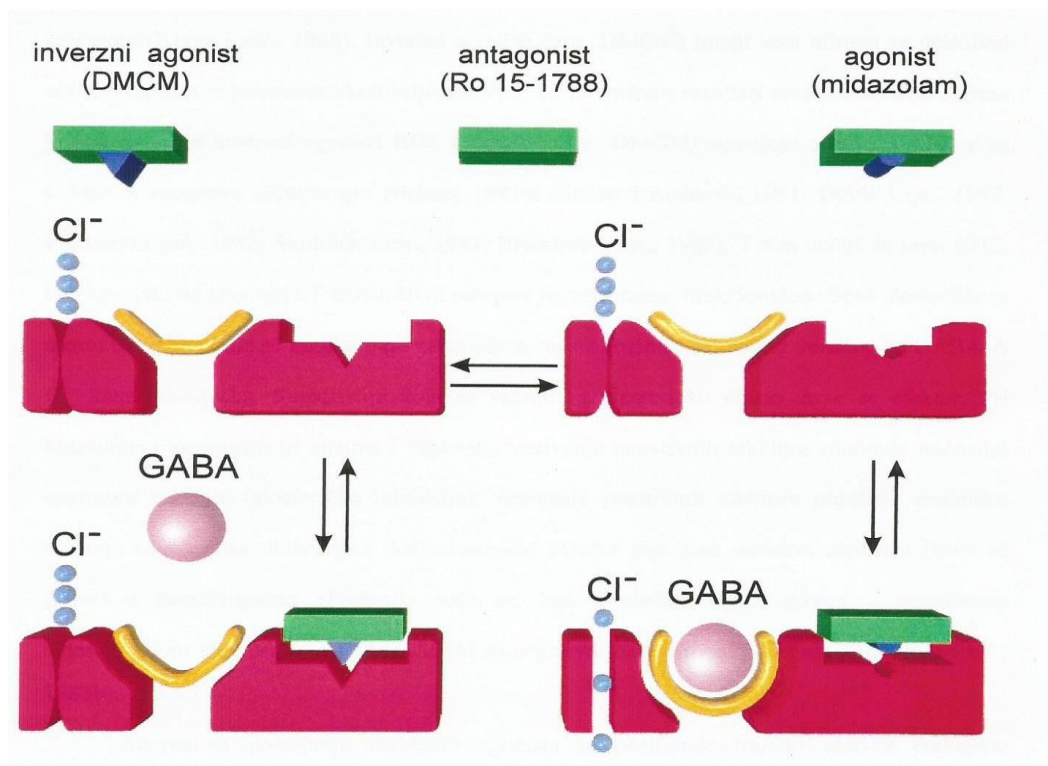
Zastupljenost GABA-A receptora koji sadrže  $\alpha_2$  subjedinicu je 15-20% od ukupne populacije (Möhler i sar., 2002). U malom broju struktura ova subjedinica je potpuno odsutna, a po pravilu je manje izražena od  $\alpha_1$  subjedinice. Jedan od izuzetaka je centralno jedro amigdale, u kome je  $\alpha_2$  subjedinica dominantna (Kaufmann i sar., 2003). Receptori koji sadrže ovu subjedinicu su gusto distribuirani i na inicijalnim segmentima aksona projekcionih ćelija cerebralnog korteksa i hipokampusa (Rudolph i sar., 2001; Rudolph i Möhler, 2004). GABA-A receptori sa  $\alpha_3$  subjedinicom učestvuju sa 10-15% u ukupnom broju (Möhler i sar., 2002). Distribucija je neujednačena, u većem broju regija su ovi receptori odsutni (Pirker i sar., 2000). Subjedinica je značajno zastupljena u amigdaloidnom kompleksu, kao i u strukturama retikularno-aktivacijskog sistema (noradrenergički, serotonergički i dopaminergički neuroni) i bazalnog proencefalona (holinergički neuroni) (Rudolph i sar., 2001; Rudolph i Möhler 2004). Manje od 5% receptora sadrži  $\alpha_5$  subjedinicu. U pojedinim strukturama su ovi receptori izraženije zastupljeni (pojedine regije kore velikog mozga, olfaktornog sistema, hipotalamusa, bazalnih ganglija) (Pirker i sar., 2000), dok u hipokampusu  $\alpha_5$  subjedinica ulazi u sastav 15-20% svih BDZ-senzitivnih GABA-A receptora (Atack, 2010; Möhler i sar., 2002; Savić i sar., 2008; Harris i sr., 2008).

### 1.3.4. Benzodiazepinski receptor kao mesto delovanja agonista i inverznih agonisa

Postoje tri vrste modulatora GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorskog kompleksa: pozitivni alosterni modulatori, koji potenciraju protok Cl jona uzrokovan GABA-om - agonisti, negativni alosterni modulatori, koji smanjuju fluks Cl jona uzrokovan GABA-om - inverzni agonisti, i neutralni alosterni modulatori, koji kompetitivno otežavaju efekte ove dve vrste agonista – antagonist (Slika 2). Receptorska aktivnost jednog liganda određena je kombinacijom afiniteta vezivanja za receptorsko mesto i unutrašnje aktivnosti regulisanog biohemijskog procesa (Kenakin i Onaran, 2002). Ligandi za BDZ receptor se vezuju za četiri osnovne grupe GABA<sub>A</sub> receptora ( $\alpha_1\beta_x\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta_x\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta_x\gamma_2$ ,  $\alpha_5\beta_x\gamma_2$ ). Mogući raspon aktivnosti liganda je veliki (agonist, parcijalni agonist, antagonist, parcijalni inverzni agonist, inverzni agonist), a kombinacije dejstva na različitim mestima vezivanja su izuzetne (Huang i sar., 2000).

Analizirajući delovanje BDZ kao agonista BDZ receptora,  $\beta$ -karbolina kao inverznih agonista i flumazenila kao antagoniste, nastalo je više modela BDZ receptora. Braestrup sa saradnicima je još osamdesetih predložio model u kome se govori da BDZ receptor postoji u dva oblika. Aktivni oblik (desno) i neaktivni oblik (levo) se nalaze u ekvilibrijumu (**slika 2**). Prisustvo BDZ agoniste, koji ima veliki afinitet za aktivni oblik receptora, pomera ekvilibrijum udesno i tako povećava procenat aktivnih oblika receptora, neophodnih da bi GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorski kompleks bio aktivan u GABA-ergičkoj neurotransmisiji. To je u skladu sa nalazima mnogih autora da BDZ povećavaju afinitet i vezivanje GABA-e za GABA-A receptore, kao i frekvencu otvaranja Cl kanala pri delovanju GABA-e. Antagonisti BDZ receptora imaju isti afinitet za aktivni i neaktivni oblik receptora, te ne menjaju ekvilibrijum. U prilog tome govore i činjenice da flumazenil ne menja afinitet GABA-e za GABA-A receptore, niti GABA menja vezivanje flumazenila za BDZ receptore. Inverzni agonisti (npr. DMCM) imaju veći afinitet za neaktivni oblik receptora te pomeraju ekvilibrijum ulevo. To potvrđuju rezultati eksperimenata u kojima je pokazano da inverzni agonisti BDZ receptora (npr. DMCM) smanjuju afinitet GABA-e za GABA-A receptore (Obradović i sar., 2003).

GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl<sup>-</sup> kanal receptorski kompleks, generalno, značajan je za regulaciju pažnje, anksioznosti, mišićne tenzije, epileptogene aktivnosti, učenje i memorijske funkcije. Svi ovi bihevioralni efekti su međusobno povezani, a pojačanje brze sinaptičke inhibicije posredovane ovim receptorima se nalazi u osnovi farmakoterapije različitih neuroloških i psihijatrijskih poremećaja. BDZ, kao najpropisivaniji psihofarmaci, predstavljaju grupu psihoaktivnih supstanci sa većim brojem farmakoloških efekata od kojih su najvažniji: antikonvulzivni efekt, sedacija, anksiolitički efekt, hipnotički efekt, anterogradna amnezija, miorelaksacija, nepotpuna anestezija i druga (Rudolph i Möhler, 2004; Sieghart i Ernst, 2005).



**Slika 2.** GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorski kompleks

### 1.3.5. Endogeni ligandi za BDZ receptor

Kada su prvi put u CNS-u otkriveni specifični BDZ receptori (Braestrup i Squires, 1977; Möhler i Okada, 1977), otvoreno je pitanje postojanja endogenih liganada. Braestrup je sa saradnicima 1980. godine prvi izolovao n-etil- $\beta$ -karbolin-3-karboksilat iz urina i ekstrakta mozga. Kasnije su pronađene i druge supstance, kao na pr.  $\beta$ -karbolin-3-karboksilat etil estar ( $\beta$ -CCE) i  $\beta$ -karbolin-3-karboksilat metil estar ( $\beta$ -CCM) koje imaju visoki afinitet za BDZ receptore, a koje pokazuju psihofarmakološke efekte suprotne BDZ - inverzni agonisti (Celerier i sar., 2004). Ovaj inverzni agonizam podrazumeva provociranje napada anksioznosti kod ljudi, potenciranje anksioznosti u testovima na eksperimentalnim životinjama i prokonvulzivni i konvulzivni efekt (Stephens i sar., 1987). Svi ovi efekti, kao i efekti BDZ, mogu biti blokirani flumazenilom kao kompetitivnim antagonistom. Guidotti i sar. su okarakterisali peptid nađen u nervnom tkivu koji sa visokim afinitetom inhibiše vezivanje liganada za BDZ receptor (BDZ, flumazenil,  $\beta$ -karbolini); peptid je pokazao pro-konfliktno dejstvo na ponašanje pacova, i nazvan je inhibitor vezivanja diazepama (DBI). Endogeni proteolitički fragment DBI, oktadekaneuropeptid (ODN), pokazao je sličnu receptorsku i bihejvioralnu aktivnost. ODN se oslobađa iz glijalnih ćelija, i značajno stimuliše sintezu neurosteroida, analogno ne-peptidnom inverznom agonisti DMCM-u; efekt se može antagonizovati flumazenilom (Do-Rego i sar., 2001). Godine 1986. su iz mozga govečeta izolovani i endogeni benzodiazepin N- desmetildiazepam (Sangameswaran i sar, 1986) i endogeni  $\beta$ -karbolin, n-butil  $\beta$ - karbolin-3- karboksilat ( $\beta$ CCB) (Pena i sar., 1986). Postavljen je veliki broj hipoteza o ulozi endogenih liganada BDZ receptora u fiziološkim funkcijama i patofiziološkim stanjima: npr. endogeni inverzni agonisti bi mogli da budu značajni za generisanje REM faze sna (Wichlinski, 1996), a endogeni BDZ za prolaznu amneziju (Danek i sar., 2002). Ipak, mehanizmi sinteze u moždanom tkivu i prisustvo endogenih liganda BDZ mesta vezivanja u sinaptičkim vezikulama, za sada, nisu nedvosmisleno utvrđeni, tako da njihov fiziološki značaj ostaje kontroverzan. S druge strane, unošenje prirodnih BDZ hranom je pouzdano utvrđeno; u 100 g krompira, žitarica, pečuraka, grožđa nalazi se 0.001 do 0.06 mg različitih farmakološki aktivnih BDZ (Sand i sar., 2000).

#### 1.4. Bihevioralni efekti modulatora BDZ receptora

Brojni podaci u literaturi govore o značajnim bihevioralnim efektima modulatora BDZ receptora. Još tokom osamdesetih i devedesetih godina, postoje podaci o facilitirajućim efektima  $\beta$ -karbolina na učenje (Venault i sar., 1986; Jensen i sar., 1987), a o negativnom delovanju BDZ na učenje (Thiebot, 1985; Lal i sar., 1990). Kasnije su Sharma i Kulkarni ukazali na značaj GABA-ergičkog neurotransmiterskog sistema za proces učenja novih sadržaja. Nalazi Pererire, Izquierda i saradnika, takođe, govore da aktivacija BDZ receptora (agonistima ili inverznim agonistima), kao i inhibicija antagonistima, može biti od značaja u regulaciji učenja, naročito u uslovima stresa i anksioznosti. Tako je efekt flumazenila na učenje pokazan u dozama, znatno manjim od doza potrebnih za druge psihofarmakološke efekte. Ovaj efekt se sastoji u antagonizovanju efekata BDZ i  $\beta$ -karbolina. Male, neanksiogene doze flumazenila (5mg/kg ili manje) date pre treninga povećavaju proces habituacije na jak ton i učenje aktivnog izbegavanja, ali ne i habituaciju na nepoznatu sredinu, što predstavlja znatno manji stres (testiranje u otvorenom polju). Ovo govori da sticanje u modelima učenja može biti smanjeno unutrašnjim mehanizmima koji uključuju oslobađanje BDZ agoniste i u skladu je sa nalazom da se u akutnom stresu (npr. plivanje životinja u hladnoj vodi) smanjuje vezivanje egzogeno aplikovanih BDZ za svoje receptore u CNS-u. Na taj način odnos između stresa (ili anksioznosti) i učenja postaje jasniji. Delimična ekscitiranost ili određeni nivo anksioznosti, ili čak stresa, neophodan je za učenje (Izquierdo i McGaugh, 2000; McGaugh, 2004). Kasnija istraživanja na životinjama i ljudima pokazuju da su anksioznost i pamćenje dva blisko povezana entiteta (Chapouthier i Venault, 2002; McGaugh, 2004), kao i anksioznost i depresivna ispoljavanja (Kalueff i sar., 2007). Postoji jasna tendencija da se emocionalno pobudjuća iskustva lakše pamte (McGaugh, 2004). Interakcija između formiranja memorije i stanja anksioznosti i depresije bi mogla da uključi neke zajedničke nervne supstrate i/ili međusobnu modulaciju u adaptivnom smislu.

Memorijski procesi se dele u tri faze: sticanje (eng. acquisition), konsolidaciju i pozivanje (eng. retrieval) (Abel i Lattal, 2001). Sticanje, odnosno učenje, i konsolidacija su faze formiranja memorije, i veoma su podložne modulatornim uticajima.

Eksperimentalno, veoma je teško razdvojiti pojedine faze memorije, s obzirom da, zavisno od vremenskog toka manipulacije, dve ili sve tri faze mogu da budu pod uticajem ispitivanog tretmana. Memorijski zadatak se sastoji od procedure kojoj se eksperimentalna životinja ponavljano izlaže; tretman koji se ispituje može da se primeni pre ili neposredno posle prvog, akvizicionog izlaganja zadatku, ili neposredno pre testiranja u retencionoj sesiji. U slučaju primene tretmana pre trening sesije, ne mogu da se izbegnu efekti na druge procese (pažnja, motivacija, motorna aktivnost) koji indirektno utiču na učenje i pozivanje (McGaugh i Izquierdo, 2000).

Izuzetno raznoliki mehanizmi i neurotransmiterski sistemi su povezivani sa formiranjem i modulacijom procesa učenja (Millan, 2003; Myhrer, 2003; Savić i sar., 2003, 2008). Na molekularnom nivou, najviše proučavan mehanizam formiranja memorije je uticaj glutamata na NMDA receptore, koji su vezani za Ca-kanale. Glutamat tokom procesa učenja, u dovoljnoj koncentraciji, stimuliše NMDA receptore, čime se povećava intracelularna koncentracija  $Ca^{2+}$ . Na taj način se pokreće intracelularni mehanizam koji za posledicu ima promene u ekspresiji gena, pre svega c-fosa. Povećana ekspresija i fosforilacija c-fosa smatra se ključnim molekularnim mehanizmom u razvoju plastičnosti nervnih ćelija. GABA-ergički sistem ima modulatornu funkciju u ovom procesu, na taj način što vrši podešavanje i finu regulaciju ekspresije gena. Da li će GABA-ergički sistem povećati ili smanjiti ekspresiju gena, zavisi od vremena kada se aktivira i stanja ostalih neurotransimtera (Collins i sar., 2009; Reul i sar., 2009).

Uopšte, utvrđeno je da agonisti BDZ receptora ispoljavaju amnestička dejstva, dok inverzni agonisti, poput  $\beta$ -karbolina, pokazuju promnestičke efekte (Krazem i sar., 2001; Chapouthier i Venault, 2002; Chapouthier, 2003). Kada se govori o anterogradnoj amneziji BDZ, specifični efekti na memorijsku funkciju odnose se više na nemogućnosti ili otežavanje učenja odnosno sticanja novih informacija, nego na pozivanje prethodno naučenog. Stoga je, možda, adekvatniji termin za ovaj efekt "slabljenje sticanja memorije" umesto navedenog "amnestičkog" efekta. Upravo ova hipoteza je poslužila kao polazna tačka za naredna genetska i bihejvioralna ispitivanja koja su imala za cilj izazivanje obrnutog efekta, odnosno pojačanje sticanja memorije

(promnestički efekt), ukoliko se primene inverzni agonisti, odnosno negativni modulatori GABA-A receptora (Samardžić, 2008; Savić i sar., 2005, 2008).

Početakom XXI veka, primenom tehnologija genetski modifikovanih životinja, stekli su se uslovi za izvođenje studija i eksperimenata u cilju utvrđivanja korelacije između pojedinih efekata liganada BDZ receptora i njihovog specifičnog molekuskog i neuronskog supstrata delovanja (Möhler i sar., 2002, Olsen i Sieghart, 2008). Ova, do danas, aktuelna istraživanja imaju za cilj razvoj selektivnih lekova koji deluju preko benzodiazepinskog receptora sa novim, suženim profilom dejstava, kako terapijskih tako i neželjenih. Do sada je najviše postignuto na dobijanju liganada selektivnih za  $\alpha_1$  podjedinicu. Zolpidem predstavlja selektivni agonist za GABA-A receptore, koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu i široko se primenjuje u tretmanu nesanice (Holm i Goa, 2000).

### **1.5. Učenje zavisno od biohemijskog miljea (engl. state-dependent learning)**

U neuropsihofarmakologiji pojam „state-dependent learning“, odnosno učenje zavisno od biohemijskog miljea, označava činjenicu da se informacije i sadržaji, koji su učeni u određenom biohemijskom miljeu, odnosno pod dejstvom određene supstance, kasnije znatno bolje pozivaju i efikasnije uče u ponovljenom istom biohemijskom miljeu, nego kada su biohemijski uslovi izmenjeni (Colpaert, 1990; Darbandi i sar., 2008). U eksperimentalnim bihejvioralnim modelima, životinje koje uče pod dejstvom određene supstance, povećavaju efikasnost učenja pri ponovljenoj primeni iste supstance, odnosno smanjuju efikasnost učenja prilikom promene supstance. Što supstanca ima veću farmakološku aktivnost, utoliko je ovaj fenomen više izražen. Učenje zavisno od biohemijskog miljea je posebno pokazano za pojedine grupe lekova, kao što su opioidni analgetici, intravenski anestetici, anksiolitici i etanol (Colpaert 1990, Carlezzone i sar., 1995, Darbandi i sar., 2008).

S obzirom da mehanizam, koji je u osnovi učenja zavisnog od biohemijskog miljea, do danas nije u potpunosti razjašnjen, novija literatura ne objašnjava ovaj fenomen per se, već se on javlja kao prateća pojava u brojnim bihejvioralnim

eksperimentima. Međutim, smatramo da je ovaj fenomen od izuzetnog značaja, posebno za supstance koje utiču na proces učenja. Stoga, svaka supstanca, koja pretenduje da ima promnastički potencijal, mora biti testirana na ovaj fenomen, odnosno mora se ispitati da li je njen promnastički potencijal posledica facilitacije učenja ili je to posledica ponovljenih biohemijskih i farmakoloških uslova.

## **1.6. Psihofiziološke osnove reakcije aktivnog izbegavanja i forsiranog plivanja**

U bihevioralnim eksperimentima već dugi niz godina se koristi reakcija izbegavanja za proučavanje različitih memorijskih procesa. Uređaji koji se koriste su različiti, ali se svode na to da izvesna aktivnost životinje, koja se može registrovati, bude sredstvo prekida neprijatne (averzivne) draži. Ukoliko se od životinje zahteva pasivnost u toku delovanja uslovne draži, onda govorimo o pasivnom izbegavanju. Ako je prelazak određena aktivnost životinje način izbegavanja neprijatne draži, onda se govori o aktivnom izbegavanju (Samardžić, 2008).

Reakcija AA je ponašanje koje se lako uči, a teško zaboravlja, pa je na taj način obezbeđena visoka reproducibilnost rezultata pri ispitivanju uticaja lekova na učenje ove reakcije. Sama reakcija AA je složeno stečeno ponašanje, koje se ispoljava izbegavanjem averzivne draži u strogo kontrolisanim uslovima izlaganja životinje ovoj draži. Strah i bežanje predstavljaju dva odlučujuća momenta za učenje ovog ponašanja. U prvoj fazi učenja, udruživanjem uslovne draži (svetlo, zvuk) i bezuslovne draži (električni šok) formira se, po klasičnim principima Pavlovljevog kondicioniranja, uslovni refleks straha. Ovaj strah, u daljem procesu učenja reakcije AA, uzrokuje motornu reakciju bežanja sa mesta delovanja averzivne draži; životinja ne beži zbog dejstva draži, već zbog težnje da razreši strah. U drugoj fazi učenja, strah predstavlja psihofiziološki preduslov za dalje učenje reakcije AA. Druga faza, tj. instrumentalizacija ponašanja, nastaje onda kad životinja prvi put pobegne pri pojavi samo uslovne draži, što znači da izbegava pojavu bezuslovne draži. Na taj način, pojava samo uslovne draži predstavlja preduslov za nastajanje straha, koji je onda osnovni motiv za pojavu reakcije izbegavanja. Razrešavanje (nestajanje) straha uslovljeno je



pojavom adekvatnog motornog akta, tj. izbegavanjem pri pojavi naredne uslovne draži. Na taj način, strah je neophodan za nastajanje reakcije aktivnog izbegavanja, a nestanak straha pri izvođenju ove reakcije je bitan preduslov za njeno učenje (Samardžić, 2008).

Test forsiranog plivanja (FST), prema Porsoltu i saradnicima iz 1978. godine, predstavlja standardni test za procenu antidepresivnih efekata supstanci. Postavljanjem životinje u ograničen prostor ispunjen vodom, stvara se averzivna situacija koja izaziva reakciju „očaja“ i bespomoćnosti. Supstance sa antidepresivnim potencijalom produžavaju vreme koje životinja provodi u borbi za pronalaženjem izlaza iz cilindra, odnosno smanjuju vreme imobilnosti.

Međutim, poslednjih godina se ukazuje na mnogo složeniju psihofiziološku osnovu FST reakcije. Naime, pri ponavljanoj primeni FST postaje značajan model za proučavanje procesa motivacije i formiranja kontekstualne memorije u averzivnoj situaciji (Chandramohan i sar., 2008, Collins i sar., 2009), analogno reakciji aktivnog izbegavanja, koja predstavlja proces instrumentalnog učenja pod dejstvom averzivne draži. U ranoj fazi forsiranog plivanja, pod dejstvom averzivne situacije, izaziva se odbrambena reakcija kojom životinja pokušava da napusti averzivni prostor. Vremenom, nakon brojnih bezuspešnih pokušaja, životinja prelazi u stanje mirovanja, odnosno imobilnosti. U kojoj meri će životinja nastaviti borbu najviše zavisi od stepena motivacije. Na taj način, reakcija forsiranog plivanja omogućava praćenje efekata poput antidepresivnih, koji su u značajnoj meri određeni stepenom motivacije, što ukazuje na motivaciju kao dodirnu tačku u smislu faktora pozitivnog potkrepljenja učenja reakcije izbegavanja averzivne draži i uspešnog razrešavanja konflikta, praćenih depresivnim ispoljavanjima.

## II CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu, često kontradiktorne, podatke u literaturi o delovanju inverznih agonista na benzodiazepinsko mesto vezivanja  $GABA_A$ -BDZ-Cl<sup>-</sup> receptorskog kompleksa, cilj istraživanja bio je da se, primenom dva komplementarna, i u oblasti bihevioralne farmakologije široko korišćena testa (aktivno izbegavanje averzivne draži i forsirano plivanje) utvrdi sledeće :

1. Ispitati uticaj jednokratne primene rastućih doza DMCM-a, inverznog agoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA-A receptora, na procese učenja pacova u reakciji aktivnog izbegavanja averzivne draži

2. Ispitati uticaj ponavljane primene rastućih doza DMCM-a, inverznog agoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA-A receptora, na procese učenja pacova u reakciji aktivnog izbegavanja averzivne draži

3. Ispitati uticaj jednokratne primene rastućih doza DMCM-a, inverznog agoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA-A receptora, na procese motivacije tokom forsiranog plivanja pacova

4. Ispitati uticaj ponavljane primene rastućih doza DMCM-a, inverznog agoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA-A receptora, na procese motivacije tokom forsiranog plivanja pacova

5. Ispitati uticaj rastućih doza DMCM-a, inverznog agoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA-A receptora, na spontanu lokomotornu aktivnost pacova, u cilju eliminisanja inhibitornih, odnosno ekscitatornih lokomotornih uticaja

6. U okviru analize mehanizma dejstva utvrditi, primenom antagoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja, da li se efekti inverznih agonista ostvaruju preko specifičnih mesta vezivanja u sklopu  $GABA_A$ -BDZ-Cl receptorskog kompleksa

### III MATERIJAL I METODE

#### Životinje:

Ispitivanja su sprovedena na albino pacovima soja Wistar, muškog pola, telesne mase 200- 250 g, odgajanim na farmi VMA u Beogradu. Pacovi su držani u standardnim kavezima od pleksiglasa, u grupi po šest životinja u kavezu, na konstantnoj temperaturi od  $21\pm 1$  °C i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (osvetljenje od 06.00 h do 18.00 h, intenzitet svetla 120 luksa). Uzimanje hrane (Veterinarski institut, Zemun) i vode bilo je ad libitum. Negovanje životinja i bihevioralno testiranje su sprovedeni tokom svetle faze ciklusa.

#### Supstance:

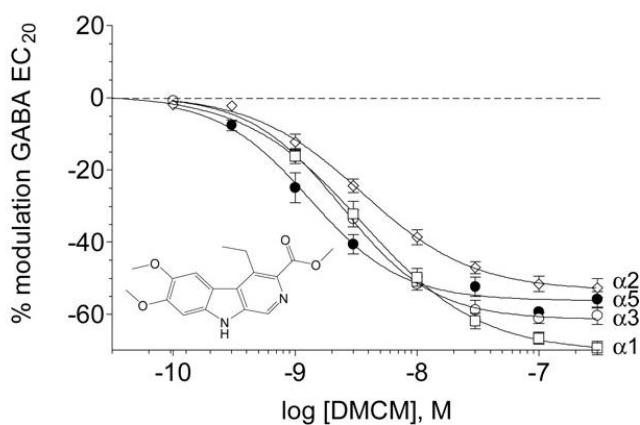
U eksperimentima su korišćene sledeće supstance: DMCM, inverzni agonista na benzodiazepinsko mesto vezivanja  $GABA_A$ -BDZ-CL receptorskog kompleksa (Research Biochemicals Incorporated, Natick, USA) i flumazenil, antagonist na benzodiazepinsko mesto vezivanja  $GABA_A$ -BDZ-CL receptorskog kompleksa (F. Hoffman-La Roche, Bazel, Švajcarska) (**Tabela 1** i **Slika 3**). Supstance su rastvarane/suspendovane uz korišćenje ultrazvučnog kupatila, u vehikulumu koji sadrži 85% destilovane vode, 14% propilenglikola i 1% Tween-a 80. Aktivne supstance, kao i rastvarači u kontrolnim grupama (fiziološki rastvor, vehikulum), primenjivane su intraperitonealno (i.p.), u zapremini 1 ml/kg telesne mase eksperimentalne životinje, 20 min pre bihevioralnog testiranja. Sve doze su izražavane kao bazni oblici supstanci. Na dva različita mesta ubrizgavanja, svaka životinja je primala ukupnu zapreminu od 2 ml/kg ispitivanih supstanci ili odgovarajućih rastvarača. U slučaju kombinovanih tretmana, agonisti su ubrizgavani neposredno nakon antagonista.

U istraživanju je korišćen "međugrupni" dizajn (eng. between-subject design), odnosno, različiti tretmani su primenjivani na različitim, nezavisnim grupama životinja.

Odabrani broj životinja u grupi u bihevioralnim testovima (6-7 po pojedinačnom tretmanu), prilagođen je povećanoj varijabilnosti rezultata svojstvenoj ovom dizajnu (Kelley, 1993).

**Tabela 1.** Afinitet vezivanja i efikasnost DMCM-a i flumazenila na rekombinantnim GABA-A receptorima, koji pored  $\beta 3$  i  $\gamma 2$  subjedinice, sadrže  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ili  $\alpha_5$  subjedinicu (Platt i sar., 2002; Dawson i sar., 2006).

Ligand	Afinitet vezivanja				Efikasnost			
	Ki (nM)				Maksimalni procenat potencijacije			
	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\alpha_5$	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\alpha_5$
<b>DMCM</b>	5,7	8,3	4,0	1,04	-50	-50	-75	-40
<b>Flumazenil</b>	0,8	0,9	1,1	0,6	0	20	18	-5



**Slika 3.** Modulacija GABA-ergičke neurotransmisije u prisustvu DMCM-a (Dawson i sar., 2006).

U svim testovima ispitivanje je sprovedeno kroz odvojene eksperimente:

**Eksperiment 1:** Procena bihevioralnih efekata rastvarača, u poređenju sa fiziološkim rastvorom, i praćenje aktivnosti antagoniste flumazenila (2.5 - 10.0 mg/kg) u testu aktivnog izbegavanja. Za eksperimente 2 i 3 izabrane su maksimalne bihevioralno neaktivne doze antagoniste.

**Eksperiment 2:** Procena bihevioralnih efekata jednokratne primene DMCM-a (0.1 - 1.0 mg/kg) u testu aktivnog izbegavanja i praćenje uticaja flumazenila na dejstva inverznog agoniste.

**Eksperiment 3:** Procena bihevioralnih efekata ponavljane primene DMCM-a u testu aktivnog izbegavanja.

**Eksperiment 4:** Procena bihevioralnih efekata rastvarača, u poređenju sa fiziološkim rastvorom, i praćenje aktivnosti antagoniste flumazenila (2.5 - 10.0 mg/kg) u testu forsiranog plivanja. Za eksperimente 5 i 6 izabrane su maksimalne bihevioralno neaktivne doze antagoniste.

**Eksperiment 5:** Procena bihevioralnih efekata jednokratne primene DMCM-a (0.1 - 1.0 mg/kg) u testu forsiranog plivanja, i praćenje uticaja flumazenila na dejstva inverznog agoniste

**Eksperiment 6:** Procena bihevioralnih efekata ponavljane primene DMCM-a u testu forsiranog plivanja

**Eksperiment 7:** Procena bihevioralnih efekata rastvarača, u poređenju sa fiziološkim rastvorom, i praćenje aktivnosti antagoniste flumazenila (2.5 - 10.0 mg/kg) u testu spontane lokomotorne aktivnosti. Za eksperiment 8 izabrana je maksimalna bihevioralno neaktivna doza antagoniste.

**Eksperiment 8:** Procena bihevioralnih efekata jednokratne primene DMCM-a (0.1 - 1.0 mg/kg) u testu spontane lokomotorne aktivnosti, i praćenje uticaja flumazenila na dejstva inverznog agoniste

### **3.1. Etičnost procedure**

Eksperimenti su sprovedeni u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije („Službeni glasnik RS“, broj 41/09) i odgovarajućim pravilnikom („Službeni glasnik RS“, broj 39/10), kao i međunarodnom zakonskom regulativom (Directive 2010/63/EU; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed, NIH, USA). Odobrenje je dobijeno od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, a uz pribavljeno mišljenje Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (Odluka br. 742/2).

### **3.2. Metoda određivanja učenja reakcije aktivnog izbegavanja (AA)**

U našem istraživanju, eksperimenti su sprovedeni u automatskom uređaju za izvođenje uslovljenog ponašanja tipa AA (Campden Instruments, SAD) (**Slika 4**). Uređaj se sastoji od programera (generator uslovnih i bezuslovnih draži sa ugrađenim brojačem za registrovanje odgovora životinje) i kaveza klackalice (eng. shuttlebox), dimenzija 48 x 21 x 22.5 cm, koji je kablom spojen sa programerom. Kavez-klackalica ima pod od poprečno postavljenih žica prečnika 0.5 cm, međusobno udaljenih 0.8 cm, kroz koje se emituje struja male jačine za bolno draženje šapica (bezuslovna draž). Pod je konstruisan tako da ga, pri prelasku sa jedne na drugu stranu kaveza, životinja sopstvenom težinom može pokrenuti kao klackalicu. Na spoljnim ivicama poda ugrađeni su mikroprekidači koji služe za aktiviranje strujnog kola, kako za elektrifikaciju poda, tako i za stvaranje impulsa koji se šalju na brojače programera. Na sredini plafona kaveza-klackalice, sa unutrašnje strane, postavljen je zvučnik za emitovanje tona kao uslovne draži, a kavez-klackalica se nalazi u većem, zvučno izolovanom kavezu, u kojem ventilator obezbeđuje izmenu vazduha.



**Slika 4.** Aparatura za izvođenje uslovljenog ponašanja tipa aktivnog izbegavanja (AA).

U našem eksperimentu, životinje su u razmaku od 24 h podvrgavane treningu i testiranju u protokolu 2 x 100 pokušaja, odnosno tokom 5 dana kod ponavljane primene u protokolu 5 x 50 pokušaja (eng. trial). Kao uslovna draž korišćen je ton jačine 68 dB, a безусловnu draž je predstavljalo draženje šapica električnom strujom jačine 0.5 mA. Svaki pokušaj počinjao je pojavom uslovnog stimulusa - tona, u trajanju od 5 s. Prelazak životinje na drugu stranu kaveza-klackalice u toku delovanja uslovne draži prekidao je njeno prezentovanje i onemogućavao započinjanje безусловne draži. Ukoliko se životinja ne bi pomerila na drugu stranu kaveza u ovom periodu, javljala se безусловna draž u trajanju od 7 s. Prelazak životinje na drugu stranu kaveza za vreme trajanja безусловne draži prekidao je njeno dejstvo. Pokušaj se završavao pauzom od 18 s, tako da jedan pokušaj traje maksimalno 30 s.

Prema tome, tokom izvođenja testa uslovljenog ponašanja tipa reakcije AA, moguća su tri tipa odgovora eksperimentalne životinje:

1. odgovor aktivnog izbegavanja безусловne draži (eng. avoid) - prelazak na drugu stranu kaveza u toku delovanja uslovne draži;
2. odgovor bežanjem (eng. escape) - prelazak na drugu stranu kaveza u toku delovanja безусловne draži;
3. izostanak odgovora (eng. wrong) - izdržavanje elektrošoka u punom trajanju.

### **3.2.1. Protokol 2 x 100 pokušaja**

Uticaj lekova na učenje reakcije AA proučavan je korišćenjem modela 2x100 pokušaja, što podrazumeva dvodnevni trening u ciklusima od po 100 pokušaja. Efikasnost učenja reakcije AA tokom prvog dana poslužila je kao kriterijum u formiranju grupa za ispitivanje delovanja supstanci na učenje AA tokom drugog dana treninga. Prvog dana treninga životinje su učile reakciju AA putem ekspozicije velikom broju pokušaja bez farmakološkog tretmana. Na osnovu broja postignutih (AA) odgovora prvog dana, životinje delimo u grupe od 0-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50 i grupa sa više od 50 AA odgovora. Grupe se za drugi dan treniranja formiraju tako da svaki navedeni interval bude podjednako zastupljen. Na taj način dobijamo uravnotežene grupe po mogućnosti da, pri delovanju leka tokom drugog dana, promene broj tačnih odgovora u odnosu na grupu koja prima fiziološki rastvor ili rastvarač leka, kao i približno iste kontrolne vrednosti za prvi dan.

Drugog dana životinje nastavljaju učenje u istim kavezima i u isto vreme kao i prvog dana, a supstance su davane intraperitonealno (i.p.) 30 min. pre početka eksperimenta. Na osnovu broja pruženih AA odgovora tokom drugog dana, a u poređenju sa kontrolnom grupom, procenjivan je uticaj datih supstanci na proces učenja reakcije AA.

Rezultati eksperimenata u modelu 2x100 pokušaja prikazani su kao broj AA odgovora drugog dana.

### **3.2.2. Protokol 5 x 50 pokušaja**

Uticaj ponavljane primene supstanci na učenje reakcije AA proučavan je korišćenjem protokola 5x50 pokušaja, što podrazumeva petodnevni trening u ciklusima od po 50 pokušaja. Prvog dana treninga životinje su učile reakciju AA putem ekspozicije velikom broju pokušaja bez farmakološkog tretmana. Na osnovu broja postignutih (AA) odgovora prvog dana, životinje delimo u dve grupe. Grupe se za



naredne dane treniranja formiraju tako da svaka bude približno iste srednje vrednosti broja AA odgovora prvog dana treninga. Na taj način dobijamo dve uravnotežene grupe sa mogućnošću da, pri delovanju leka ili rastvarača za lek tokom sledećih dana, promene broj tačnih odgovora, kao i približno iste kontrolne vrednosti za prvi dan.

U protokolu 5 x 50 bez promene tretmana, životinje drugog i narednih dana nastavljaju učenje u istim kavezima i u isto vreme kao i prvog dana, a supstance su davane intraperitonealno (i.p.) 30 minuta pre početka eksperimenta.

U protokolu 5 x 50 sa promenom tretmana, trećeg dana vršimo izmenu tretmana. Grupi koja je primala ispitivanu supstancu davali smo rastvarač, a grupi koja je primala rastvarač za prva dva dana, davali smo ispitivanu supstancu. Četvrtog i petog dana grupe životinja su primale ispitivanu supstancu ili rastvarač, kao prvog i drugog dana.

Rezultati eksperimenata u protokolu 5 x 50 pokušaja prikazani su kao broj AA odgovora svakog od pet dana. Na osnovu broja pruženih AA odgovora tokom trećeg dana testiranja (pri izmeni tretmana), a u poređenju sa kontrolnom grupom, procenjivan je uticaj na proces disocijacije učenja reakcije AA.

### **3.3. Metoda određivanja učenja reakcije forsiranog plivanja (FS)**

U našem istraživanju, eksperimenti su izvođeni u aparaturi za test forsiranog plivanja, koja se sastoji od providnog staklenog cilindra visine 45 cm i prečnika 20 cm (**Slika 5**). Cilindar je napunjen vodom do visine 30 cm i temperatura vode je 21-23° C. U našem eksperimentu, životinje su u razmaku od 24 h podvrgnute treningu i testiranju kod jednokratne primene supstanci, odnosno u razmaku od 2 nedelje kod ponavljane primene supstanci. Trening traje 15 min od spuštanja životinje u cilindar, a testiranje 5 minuta pri čemu se meri vreme imobilnosti u sekundama, odnosno vreme koje pacov provodi plutajući po vodi, tako da mu najmanje tri od četiri šapice miruju. Pre svakog testiranja, vrši se ispiranje cilindra, zamena i zagrevanje vode.



**Slika 5.** Cilindar za izvođenje testa forsiranog plivanja (FST)

### **3.4. Merenje spontane lokomotorna aktivnost**

Spontana lokomotorna aktivnost, u smislu dužine pređenog puta životinja, praćena je u providnim plastičnim boksevima, dimenzija 40 ×25 × 35 cm, 30 minuta nakon primene rastućih doza DMCM-a (0.05, 0.1, 0.5 i 1 mg/kg), odnosno rastvarača (Sol). Životinje su snimane i praćene digitalnom kamerom, tokom perioda od 30 min bez habituacije, uz pomoć softvera ANY-maze Video Tracking System (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

### **3.5. Statistička obrada rezultata**

Rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška. Svaka dozno-efektna kriva (inverzni agonist, antagonist ili inverzni agonist + antagonist) je procenjena jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA). U slučaju značajnosti ANOVA testa ( $p < 0,05$ ), svaki nivo tretmana je upoređen sa odgovarajućom kontrolom, primenom Dunnett-ovog testa. Interakcije između inverznih agonista i antagonista su procenjene primenom dvofaktorskog ANOVA testa, sa dozom inverznog agoniste i kotretmanom (antagonist ili fiziološki rastvor) kao faktorima.

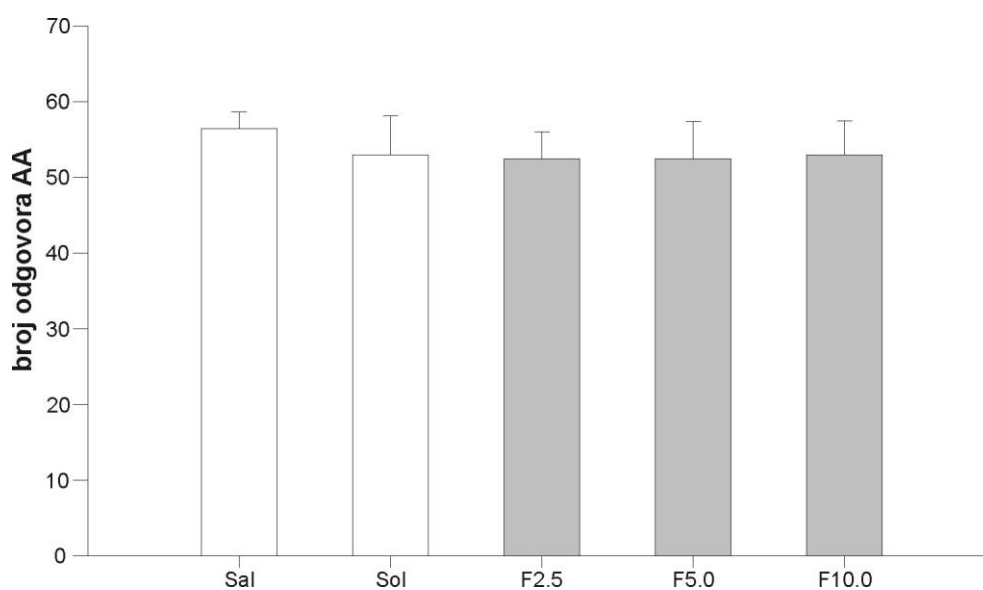
U svim testovima, razlike na nivou  $p < 0,05$  uzimane su kao statistički značajne. Statistička analiza je sprovedena primenom komercijalnog statističkog softvera IBM SPSS Statistics verzija 20, dok su svi grafici crtani u programu CorelDRAW verzija 11.

## IV REZULTATI

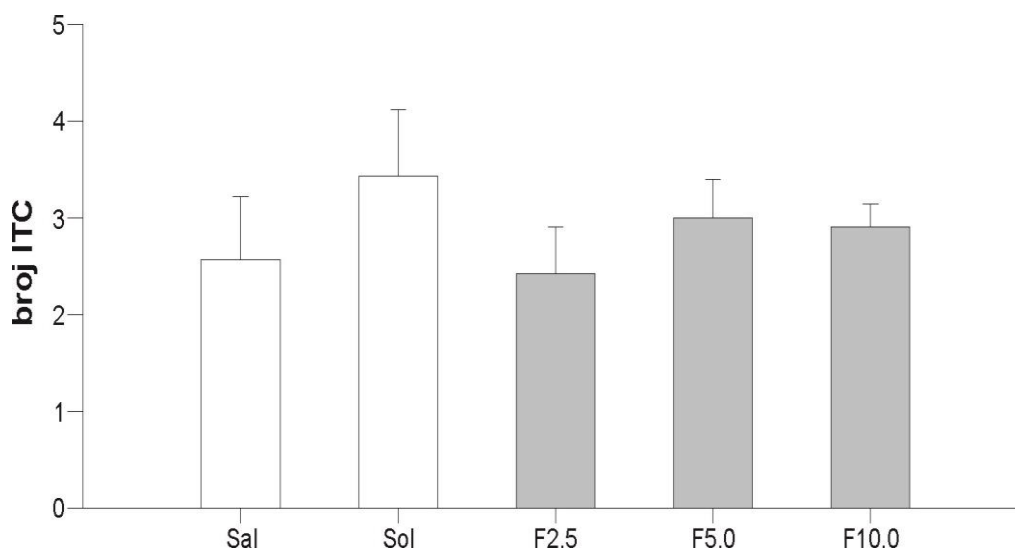
### 4.1. Test aktivnog izveganje averzivne draži

#### Eksperiment 1.

Statistička analiza nije pokazala značajne razlike između grupa koje su tretirane rastvaračem (Sol) i fiziološkim rastvorom (Sal). Flumazenil nije značajno menjao bihevioralne parametre, broj uspešnih odgovora AA ( $F(4,30)=0,128$ ,  $p>0,05$ ) i parametar motorne aktivnosti - ITC ( $F(4,30)=0,539$ ,  $p>0,05$ ), koji su dobijeni u AA testu, u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 6.** za broj AA i **Slika 7.** za broj ITC).



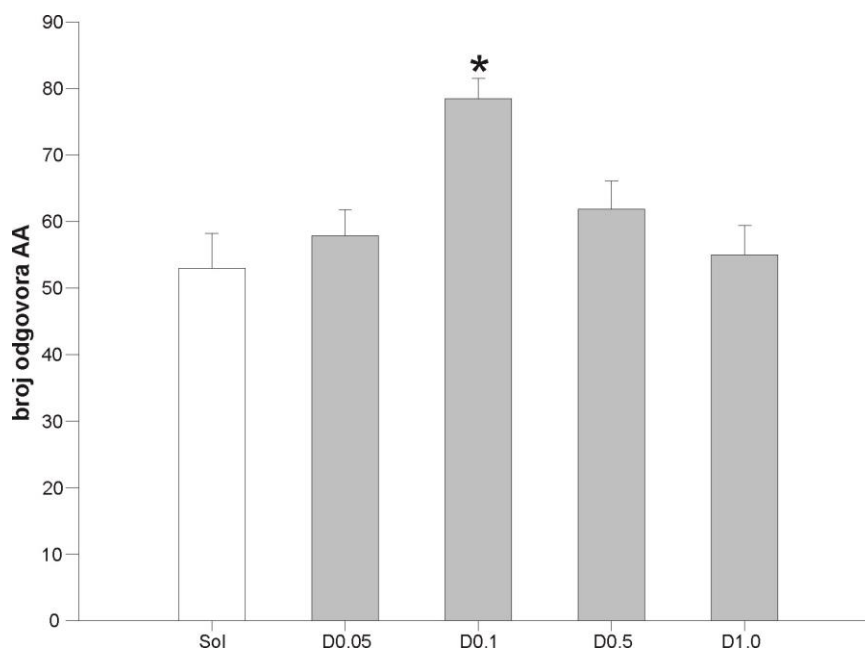
**Slika 6.** Uticaj flumazenila (F: 2.5, 5.0 i 10.0 mg/kg) na broj odgovora AA. Sal: grupa tretirana fiziološkim rastvorom; Sol: kontrolna grupa tretirana rastvaračem.



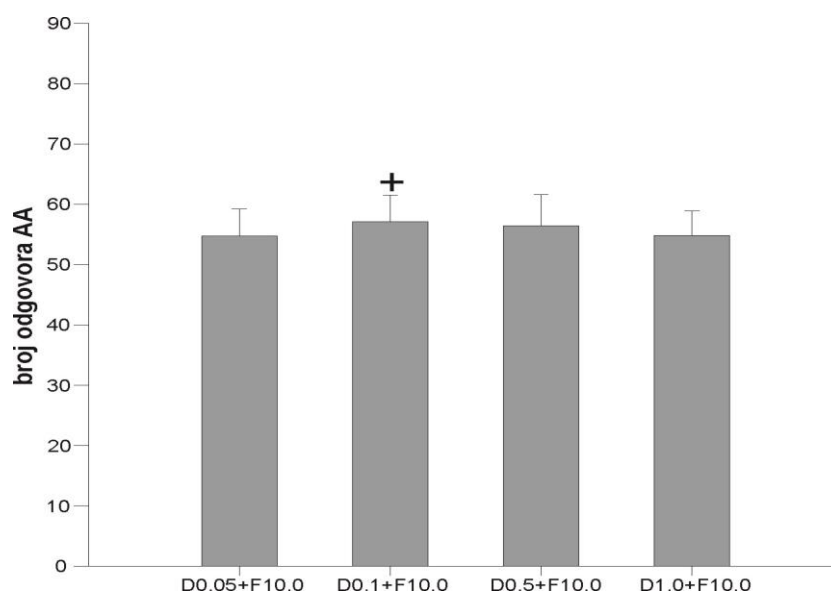
**Slika 7.** Uticaj flumazenila (F: 2.5, 5.0 i 10.0 mg/kg) na broj prelazaka životinje s jedne na drugu stranu kaveza u periodima pauza između pokušaja – ITC. Sal: grupa tretirana fiziološkim rastvorom; Sol: kontrolna grupa tretirana rastvaračem.

## **Eksperiment 2.**

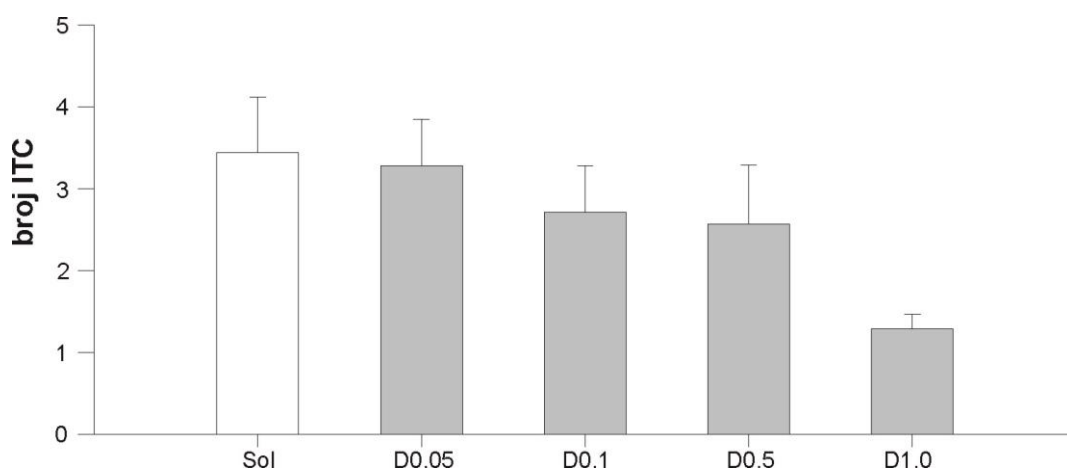
Statistička analiza je pokazala da jednokratna primena DMCM-a drugog dana u testu aktivnog izbegavanja utiče na broj odgovora AA ( $F(8,54) = 3,431, p < 0,05$ ). Doza od 0,1 mg/kg DMCM-a pokazala je facilitirajući uticaj na učenje reakcije AA (Dunnett-ov test, **Slika 8**), dok je flumazenil u potpunosti antagonizovao ovaj efekt (**Slika 9**). Primena DMCM-a i flumazenila nije uticala na broj prelazaka životinje s jedne na drugu stranu kaveza u periodima pauza između pokušaja – ITC ( $F(8,54) = 1,356, p > 0,05$ ) (**Slika 10** i **Slika 11**).



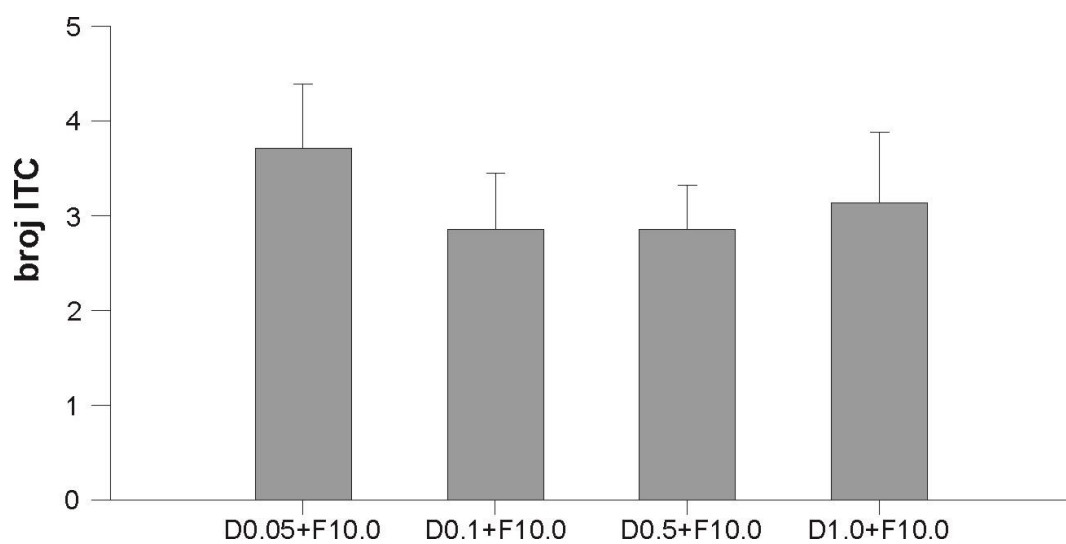
**Slika 8.** Uticaj DMCM-a (D: 0.05, 0.1, 0.5 i 1.0 mg/kg) na broj AA (\*  $p < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu (Sol) tretiranu rastvaračem)



**Slika 9.** Uticaj flumazenila (F: 10.0 mg/kg) na efekte DMCM-a u testu AA (+  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajući efekt inverznog agoniste)



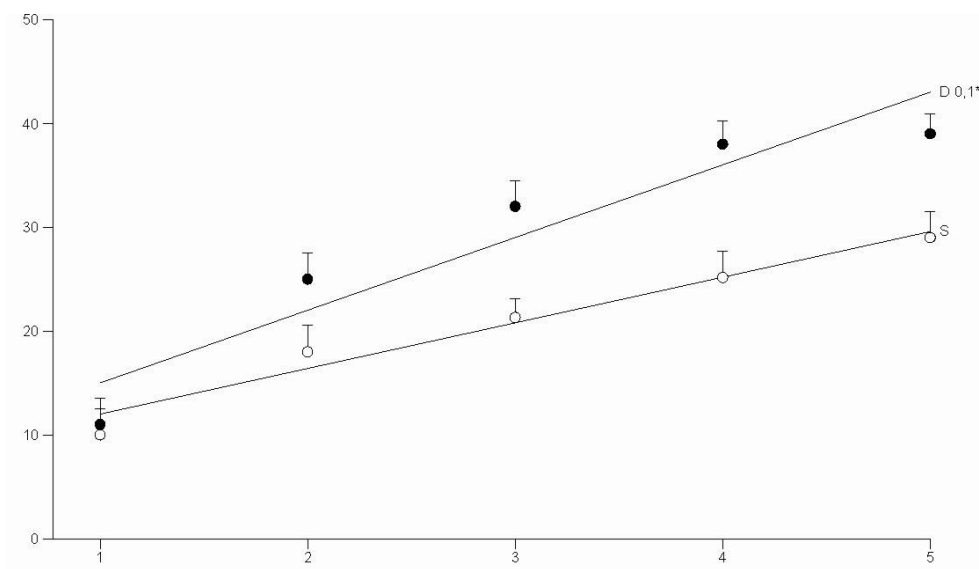
**Slika 10.** Uticaj DMCM-a (D: 0.05, 0.1, 0.5 i 1.0 mg/kg) na broj prelazaka životinje s jedne na drugu stranu kaveza u periodima pauza između pokušaja – ITC; Sol: kontrolna grupa tretirana rastvaračem.



**Slika 11.** Uticaj flumazenila (F: 10.0 mg/kg) na efekte DMCM-a na broj prelazaka životinje s jedne na drugu stranu kaveza u periodima pauza između pokušaja – ITC

### Eksperiment 3.

Uticao DMCM-a u dozi koja je pokazala facilitatorne efekte pri jednokratnoj primeni (0,1 mg/kg), ispitivana je pri ponavljanoj primeni u protokolu 5 x 50 pokušaja, u odnosu na kontrolnu grupu, tretiranu rastvaračem (Sol), sa ili bez promene tretmana trećeg dana. Bez promene tretmana trećeg dana, grupa eksperimentalnih životinja koja je dobijala DMCM (0,1 mg/kg) povećava broj odgovora AA svakog narednog dana, a četvrtog i petog dana statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu ( $F(1,18) = 4,663$ ;  $F(1,12) = 15,732$ ;  $p < 0,05$ ; **Slika 12**).

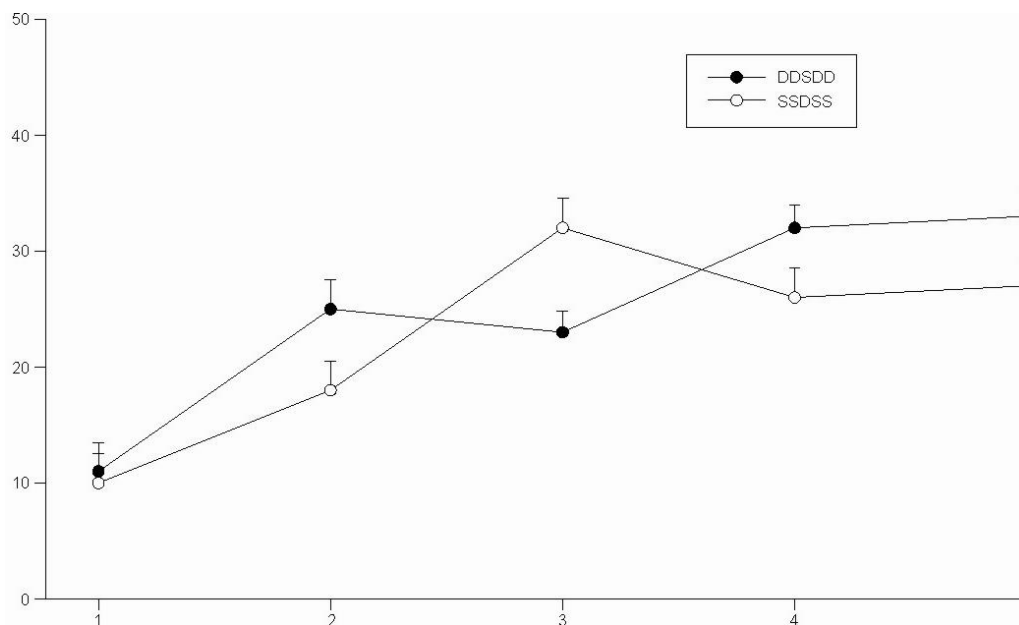


**Slika 12.** Uticaj DMCM-a (0,1 mg/kg) i rastvarača (S) na učenje reakcije AA u protokolu 5 x 50, bez promene tretmana trećeg dana

U slučaju promene tretmana (**Slika 13**), davanje DMCM-a (0,1 mg/kg) grupi eksperimentalnih životinja koja je prva dva dana primala rastvarač (Sol) dovodi do daljeg povećanja broja odgovora AA. Međutim, promena tretmana u grupi životinja koja je prva dva dana primala DMCM, u smislu davanja rastvarača (Sol), ima za posledicu smanjenje broja AA, što je statistički značajno ( $F(1,12) = 28,667$ ;  $p < 0,05$ ).



Četvrtog i petog dana, kada se životinjama daje ista supstanca kao i prva dva dana, grupa koja nastavlja da prima DMCM povećava broj tačnih odgovora.

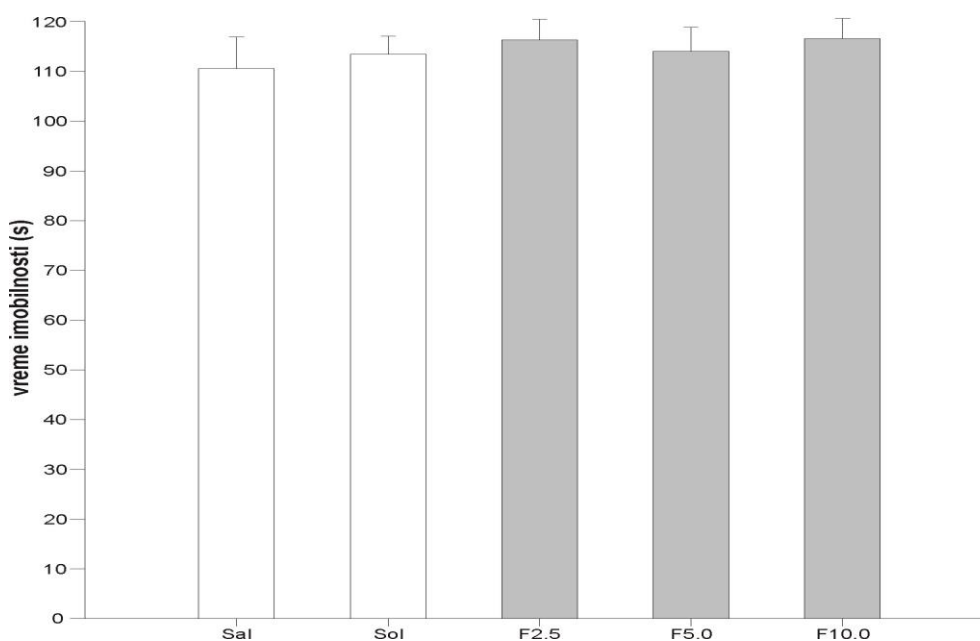


**Slika 13.** Uticaj DMCM-a 0,1 mg/kg (D) i rastvarača (S) na učenje reakcije AA u prtokolu 5 x 50, sa promenom tretmana trećeg dana

## 4.2. Test forsiranog plivanja

### Eksperiment 4.

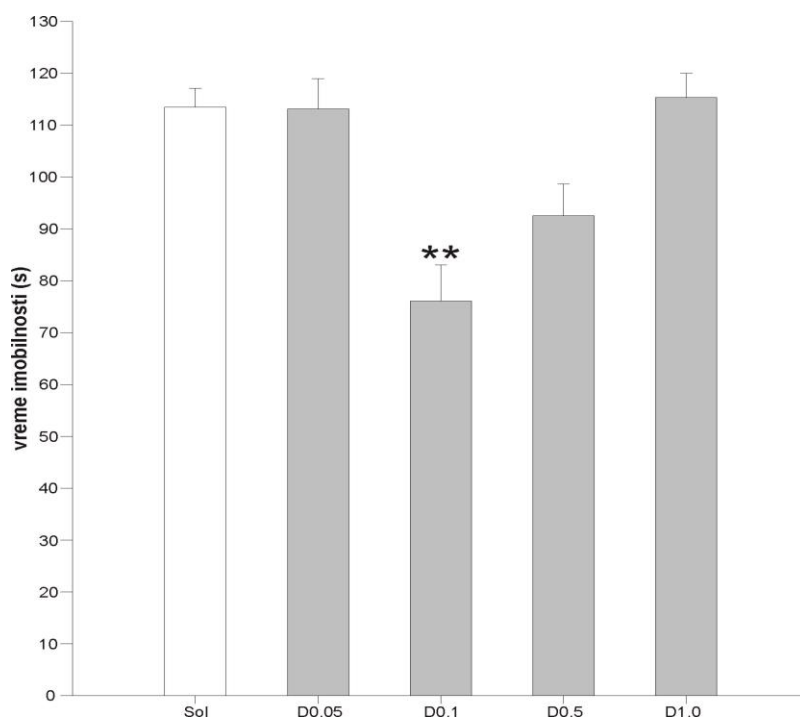
Statistička analiza nije pokazala značajne razlike između grupa koje su tretirane rastvaračem i fiziološkim rastvorom u testu forsiranog plivanja. Takođe, flumazenil nije značajno menjao bihevioralne parametre, odnosno vreme imobilnosti životinja u odnosu na kontrolnu grupu ( $F(4,32) = 0,267, p > 0.05$ ) (**Slika 14**). Motorni parametri, u smislu plivanja i gnjurenja, nisu se značajno razlikovali ni kod jedne grupe tokom ispitivanja, tako da ovi podaci neće biti prikazani.



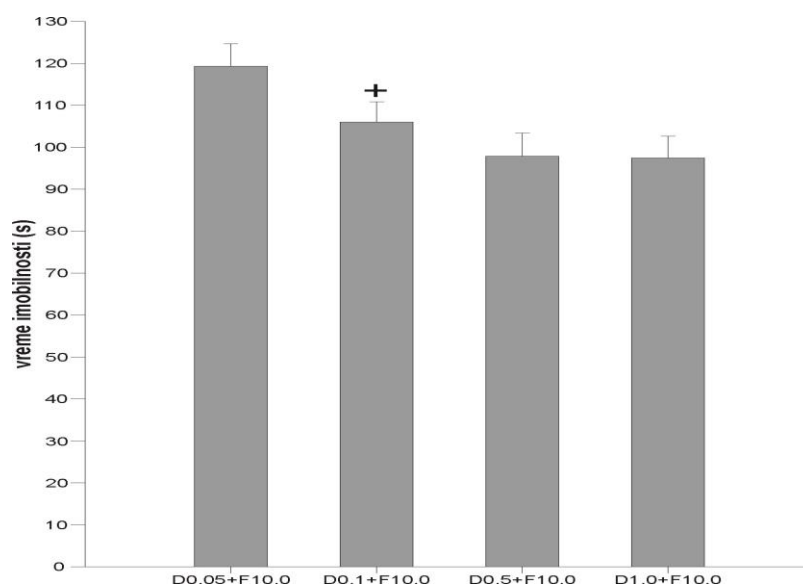
**Slika 14.** Uticaj flumazenila (F: 2.5, 5.0 i 10.0 mg/kg) na vreme imobilnosti životinja tokom forsiranog plivanja. Sal: grupa tretirana fiziološkim rastvorom; Sol: kontrolna grupa tretirana rastvaračem.

## Eksperiment 5.

Statistička analiza je pokazala da jednokratna primena DMCM-a drugog dana u testu forsiranog plivanja utiče na vreme imobilnosti životinja ( $F(8,54) = 6,203$ ,  $p < 0.001$ ). Doza od 0,1 mg/kg DMCM-a pokazala je smanjenje vremena imobilnosti (Dunnett-ov test, **Slika 15**), dok je flumazenil u potpunosti antagonizovao ovaj efekt (**Slika 16**).



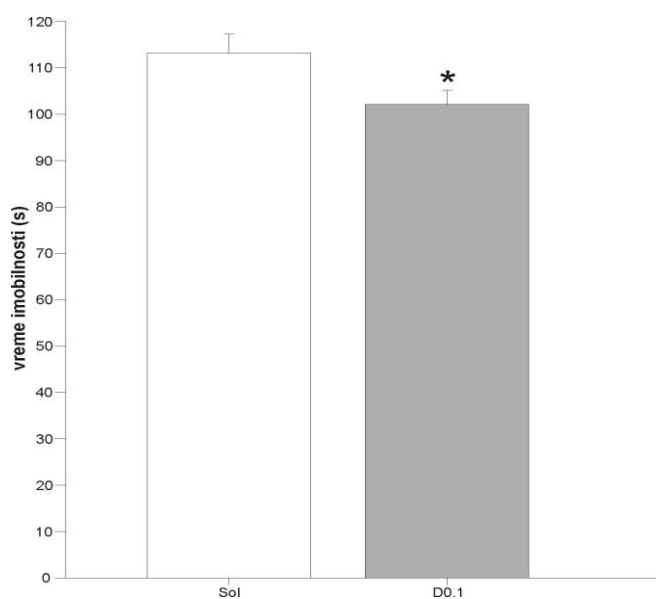
**Slika 15.** Uticaj DMCM-a (D: 0.05, 0.1, 0.5 i 1.0 mg/kg) na vreme imobilnosti tokom forsiranog plivanja (\*\*  $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu grupu (Sol) tretiranu rastvaračem)



**Slika 16.** Uticaj flumazenila (F: 10.0 mg/kg) na efekte DMCM-a tokom forsiranog plivanja (<sup>+</sup> p<0.05 u odnosu na odgovarajući efekt inverznog agoniste)

## Eksperiment 6.

Statistička analiza je pokazala i da ponavljana primena doze DMCM-a od 0,1 mg/kg, tokom 14 dana, statistički značajno smanjuje vreme imobilnosti životinja u odnosu na kontrolnu grupu tretiranu rastvaračem ( $F(1,18) = 4,779, p < 0.05$ ). (Slika 17).

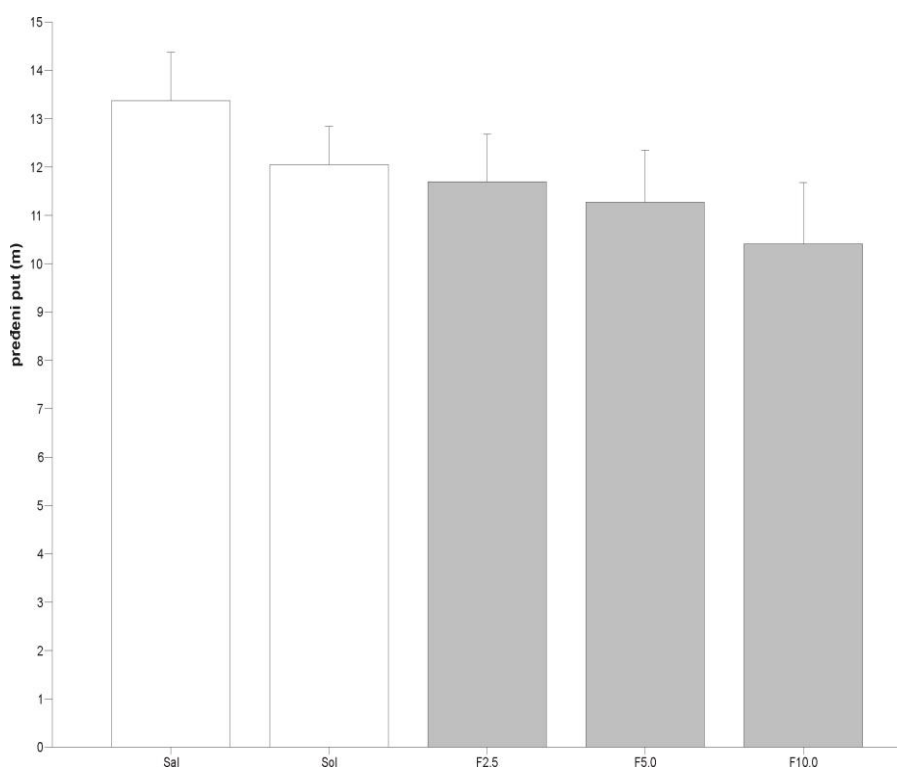


**Slika 17.** Uticaj ponavljane primene DMCM-a (0.1 mg/kg) na vreme imobilnosti tokom forsiranog plivanja (\*  $p < 0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu (Sol) tretiranu rastvaračem)

### 4.3. Test spontane lokomotorne aktivnosti

#### Ekperiment 7.

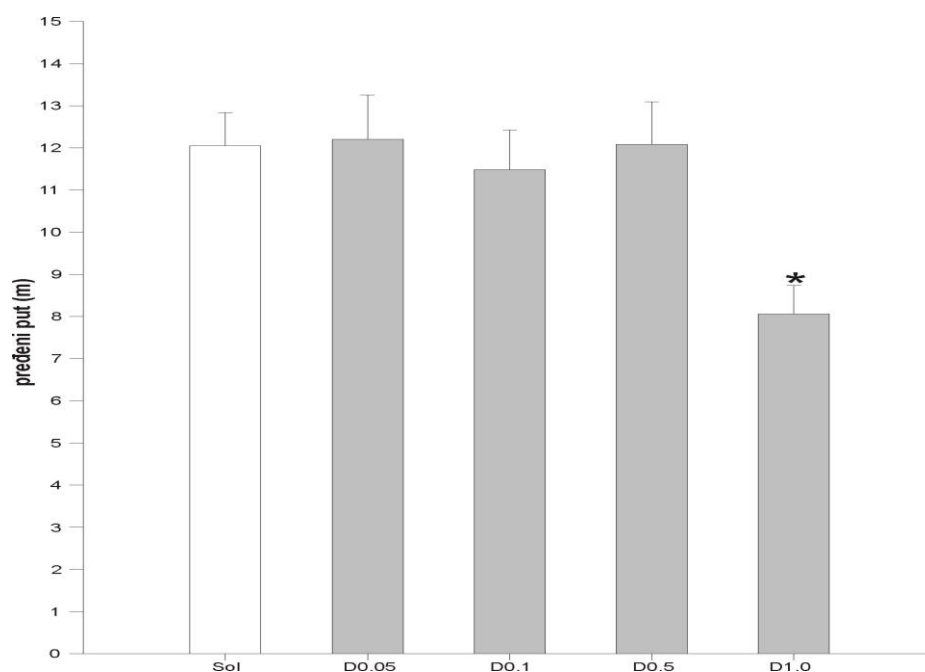
Statistička analiza nije pokazala značajne razlike prilikom testiranja spontane lokomotorne aktivnosti između grupa koje su tretirane rastvaračem i fiziološkim rastvorom, dok flumazenil nije značajno menjao bihevioralne parametre ( $F(4,30)=1,104, p>0.05$ ) (**Slika 18**).



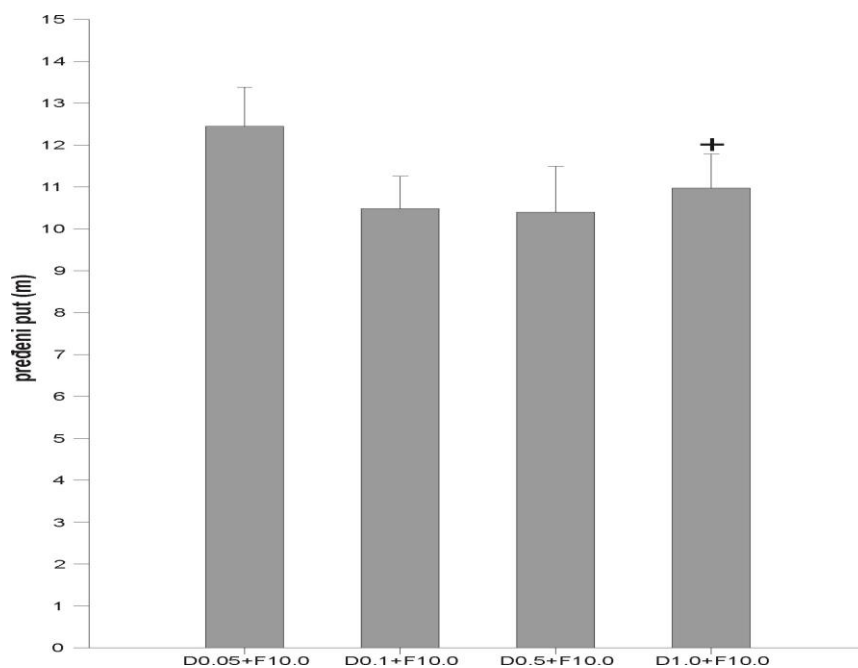
**Slika 18.** Uticaj flumazenila (F: 2.5, 5.0 i 10.0 mg/kg) na dužinu pređenog puta. Sal: grupa tretirana fiziološkim rastvorom; Sol: kontrolna grupa tretirana rastvaračem.

## Eksperiment 8.

Statistička analiza je pokazala da primena DMCM-a utiče na dužinu pređenog puta životinja ( $F(8,54)=2,302$ ,  $p<0.05$ ) i da najveća primenjena doza od 1,0 mg/kg DMCM-a smanjuje lokomotornu aktivnost životinja (Dunnett-ov test, **Slika 19**), dok je flumazenil antagonizovao ovaj efekt (**Slika 20**).



**Slika 19.** Uticaj DMCM-a (D: 0.05, 0.1, 0.5 i 1.0 mg/kg) na dužinu pređenog puta (\* $p<0.05$  u odnosu na kontrolnu grupu (Sol) tretiranu rastvaračem)



**Slika 20.** Uticaj flumazenila (F: 10.0 mg/kg) na efekte DMCM-a u testu sponatne lokomotorne aktivnosti (+  $p < 0.05$  u odnosu na odgovarajući efekt inverznog agoniste).



## V DISKUSIJA

Dosadašnji rezultati u oblasti istraživanja GABA-ergičkog neurotransmiterskog sistema i molekulske osnove dejstva supstanci koje, preko BDZ mesta vezivanja na GABA-A receptorima, odnosno preko BDZ receptora, moduliraju efekte GABA-e ukazuju na sledeće:

- GABA je glavni inhibitorski neurotransmiter u CNS-u sisara (30-40% svih sinapsi su GABA-ergičke). Najviše GABA-e ima u supstanciji nigri, globusu palidusu i hipotalamusu, a najmanje u motornom i frontalnom korteksu. GABA svoje efekte ostvaruje preko dva tipa receptora: GABA-A i GABA-B (Burt, 2003). Većinu poznatih farmakoloških efekata GABA ostvaruje preko GABA-A receptora koji je povezan sa hloridnim kanalom (Jacob i sar., 2008; Olsen i Sieghart, 2008)

- GABA-A receptori su pentamerni transmembranski proteini koji formiraju jonski kanal selektivno permeabilan za hloridni anjon (Nayeem i sar., 1994). Aktivacija GABA-A receptora GABA-om dovodi do promene konformacijskog stanja pripadajućeg jonskog kanala, što za posledicu ima povećanje provodljivosti za Cl<sup>-</sup> jone, hiperpolarizaciju ili depolarizaciju te membrane i inhibitorski efekt na postsinaptičkoj membrani (Jacob i sar., 2008; Korpi i sar., 2002)

- GABA-A receptori su značajni za regulaciju anksioznosti, pažnje, epileptogene aktivnosti, mišićnog tonusa i memorijske funkcije (Benes i sar., 2001; Rudolph i Möhler, 2004; Macdonald i sar., 2010) i postoji najmanje 14 različitih, strukturno specifičnih mesta vezivanja na GABA-A receptoru, preko kojih različite supstance, među kojima i nekoliko klasa lekova, ostvaruju modulatorne efekte na GABA-ergičku neurotransmisiju (Chebib i Johnston, 2000)

- Postoje tri vrste modulatora na BDZ mestu vezivanja GABA-A receptora: pozitivni alosterični modulatori, koji potenciraju protok Cl<sup>-</sup> jona uzrokovan GABA-om ("agonisti"), neutralni alosterični modulatori ("antagonisti") i negativni alosterični

modulatori, koji smanjuju protok  $\text{Cl}^-$  jona uzrokovan GABA-om ("inverzni agonisti") (Chebib i Johnston, 2000; Dubiela i sar., 2010; McMahon i sar., 2006)

- Lekovi koji pojačavaju inhibitornu neurotransmisiju klinički se koriste u terapiji anksioznih poremećaja, poremećaja sna, epilepsije, obustave alkohola, za uvođenje i održavanje anestezije (Grauer i sar., 2009; Jacob i sar., 2008; Korpi i sar., 2002), a od nedavno se ispituje njihov značaj i kod depresivnih ispoljavanja i drugih neuropsihijatrijskih oboljenja (Lang i Borgwardt, 2013; Samardžić i sar., 2013). Među ovim lekovima, značajno mesto u farmakoterapiji zauzimaju BDZ, koji deluju kao pozitivni modulatori na BDZ mestu vezivanja GABA-A receptora, odnosno preko BDZ receptora (Barnard i sar., 1998). S druge strane, negativni modulatori, odnosno inverzni agonisti, koji uglavnom smanjuju afinitet GABA-e za GABA-A receptor, mada ga mogu i povećavati u zavisnosti od kombinacije subjedinica ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ) koje su u sastavu  $\text{GABA}_A$ -BDZ- $\text{Cl}^-$  receptorskog kompleksa, i dalje su nedovoljno istraženi i farmakološki profilisani (Chebib i Johnston, 2000; Dubiela i sar., 2010)

- GABA-A receptor je fizički i funkcionalno povezan sa BDZ receptorom i zajedno čine  $\text{GABA}_A$ -BDZ- $\text{Cl}^-$  receptorski kompleks. Usled kompleksne, pentamerne strukture i velikog broja gradivnih subjedinica, u mozgu postoji verovatno više od 500 različitih podtipova GABA-A receptora (Sieghart, 2000). Utvrđivanjem molekulske osnove vezivanja BDZ-a za modulatorno mesto na GABA-A receptoru, broj osnovnih podtipova receptora značajnih za dejstva BDZ-a sužen je na četiri: kombinacije koje sadrže  $\alpha_1\beta_n\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta_n\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta_n\gamma_2$  i  $\alpha_5\beta_n\gamma_2$  subjedinice, odnosno GABA-A1, GABA-A2, GABA-A3 i GABA-A5 receptori (Jacob i sar., 2008; Rudolph i sar., 2001)

- DMCM, kao  $\alpha$ -neselektivni inverzni agonista, na različit način moduliše GABA-ergičku neurotransmisiju, zavisno od prisustva konkretne  $\alpha$  subjedinice. Kada je GABA-A receptor koji je sastavljen iz subjedinica  $\alpha_1\beta_n\gamma_2$  stimulisan DMCM-om smanjuje se GABA-om aktivirana struja  $\text{Cl}^-$  jona, a ako je sastavljen iz  $\alpha_5\beta_n\gamma_2$  subjedinica, onda njegova stimulacija dovodi do povećanja te struje (Dawson i sar., 2006; Obradović i sar., 2003).

- Poslednja istraživanja uz korišćenje genetski modifikovanih životinja, ukazuju na sve veći značaj GABA-ergičke neurotransmisije i aktivnosti GABA-A receptora u razvoju depresije i drugih poremećaja raspoloženja (Hines i sar., 2012). Imajući u vidu ove podatke, kao i mnoge oprečne rezultate u literaturi o delovanju liganada na benzodiazepinsko mesto vezivanja GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorskog kompleksa, jasno je da su bihevioralna ispitivanja neophodna u cilju daljeg pojašnjavanja rezultata genetskih i molekularnih istraživanja.

## 5.1. Aktivno izbegavanje averzivne draži i učenje

Sposobnost inverznih agonista na benzodiazepinsko mesto vezivanja GABA-A receptora da ispolje facilitatorne uticaje na procese sticanja i/ili konsolidacije pamćenja pokazana je u različitim testovima za procenu memorije (Krazem i sar., 2001). Naša istraživanja su pokazala da DMCM, inverzni agonista benzodiazepinskog mesta vezivanja ima značajan uticaj na učenje reakcije aktivnog izbegavanja (AA). Naime, DMCM, u najmanjoj primenjenoj dozi od 0,1 mg/kg povećava broj AA odgovora, odnosno poboljšava učenje reakcije AA. Takođe, pokazano je da postoji linearna korelacija između ove doze i efekta DMCM-a na učenje reakcije AA tokom ponavljane primene DMCM-a. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima prethodnih studija, koje su pokazale da male doze DMCM-a mogu biti korisne za podizanje vigiliteta (pažnje) kod eksperimentalnih životinja što bi moglo imati za posledicu bolje učenje (Jensen i sar., 1987; Savić i sar., 2005). S druge strane, rastuće doze DMCM-a ne dovode do povećanja lokomotorne aktivnosti, mereno brojem prelazaka životinje s jedne na drugu stranu kaveza za AA u periodima između pokušaja (ITC), što ukazuje da učenje reakcije AA nije bila posledica povećane aktivnosti životinja.

Eksperimenti u kojima je ispitivan efekt antagoniste BDZ receptora na delovanje različitih doza DMCM-a na učenje reakcije AA pokazali su da blokada BDZ receptora pomoću flumazenila dovodi do inverzije efekata DMCM-a na AA. U prisustvu flumazenila (10,0 mg/kg), DMCM, u dozi 0,1 mg/kg, gubi promnistički potencijal, odnosno flumazenil poništava facilitatorne efekte DMCM-a i ukazuje da se ovi efekti ostvaruju preko specifičnog BDZ mesta vezivanja u sklopu GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorskog kompleksa, odnosno preko BDZ receptora.

Cilj naredne serije eksperimenata bio je provera da li su efekti određenih doza DMCM-a na učenje reakcije aktivnog izbegavanja averzivne draži (AA), posledica direktnog delovanja na proces učenja AA ili je u pitanju učenje zavisno od biohemijskog miljea (engl. state-dependent learning). Ovo je ispitivano u modelu 5x50 pokušaja sa promenom tretmana trećeg dana. Grupa eksperimentalnih životinja koja je dobijala DMCM (0,1 mg/kg) povećavala je broj AA odgovora svakog narednog dana

statistički značajno više od grupe koja je dobijala rastvarač (S). Promena tretmana trećeg dana, u modelu 5x50 pokušaja, odnosno davanje DMCM-a (0,1 mg/kg) grupi eksperimentalnih životinja koja je prva dva dana primala rastvarač (S) dovodi do daljeg povećanja broja tačnih odgovora (AA). Promena tretmana trećeg dana, u smislu davanja rastvarača (S) grupi životinja koja je prva dva dana primala DMCM, ima za posledicu smanjenje broja AA na nivo koji je čak niži od onog koji je bio trećeg dana tretmana samo rastvaračem. Četvrtog i petog dana, kada se životinjama daje ista supstanca kao i prva dva dana, grupa koja nastavlja da prima DMCM poveća broj tačnih odgovora. Grupa koja nastavlja tretman rastvaračem, posle primanja DMCM trećeg dana, smanjuje broj ispravnih odgovora AA 4. i 5. dana. Ovakav nalaz govori u prilog pretpostavci da je facilitirajuće delovanje DMCM (0,1 mg/kg) na učenje AA u modelu 5x50, ali i u modelu 2x100 pokušaja, posledica specifičnog stimulantnog efekta na sam proces učenja reakcije AA, a ne posledica boljeg izvođenja naučenog sadržaja samo zbog ponovljenih istih fizičkih ili biohemijskih uslova u kojima je učen dati sadržaj, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (Venault i sar., 1987; Raffalli-Sebille i sar., 1990, 1991; Krazem i sar., 2001; DeLorey i sar., 2001, Obradović i sar., 2004, 2006).

O delovanju agonista, antagonista i inverznih agonista BDZ receptora na učenje postoji mnogo neusaglašenih podataka u literaturi. U određenim studijama pokazan je bifazni efekt DMCM-a, kao inverznog agoniste BDZ receptora, na pasivno izbegavanje averzivne draži (File i Pellow, 1988; Cole i Jones, 1995, Savić i sar., 2005). U ovoj seriji naših eksperimenata, u cilju utvrđivanja uticaja malih doza inverznih agonista BDZ receptora na učenje, korišćeni dozni režim nije pokazao statistički značajan bifazni efekt, već samo tendenciju. Treba imati u vidu da su, u ovoj seriji naših eksperimenata, korišćene male doze DMCM-a, manje od 1 mg/kg, koje prethodno nisu pokazale anksigene i prokonvulzivne efekte. Odsustvo facilitacije učenja, prilikom primene većih doza DMCM-a, može se, donekle, objasniti razlikom u farmakologiji pojedinih liganda BDZ receptora, koje su uzrokovane specifičnim afinitetima za različite podtipove  $\alpha$  subjedinice GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorskog kompleksa (Obradović i sar., 2006), kao njene kombinacije sa podtipovima  $\beta$  i  $\gamma$  subjedinica. Pokazano je, takođe, da se DMCM u malim koncentracijama vezuje samo za BDZ receptore i smanjuje GABA-om indukovanu struju Cl<sup>-</sup> jona i to na  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  i  $\alpha 3\beta 2\gamma 2$  podtipovima GABA-A receptora

(što se i očekuje od inverznog agoniste), ali ne prouzrokuje nikakve promene na  $\alpha 6\beta 2\gamma 2$  podtipu (deluje kao neutralni antagonist). Veće koncentracije DMCM deluju tako da povećavaju struju  $\text{Cl}^-$  jona indukovanu GABA-om, na svim podtipovima GABA-A receptora (Obradović i sar., 2006). Stoga, promnestički efekt DMCM-a bi mogao da bude dominantno posredovan  $\alpha 1$  i  $\alpha 3$  subjedinicama.

Za razliku od ovih podataka, nedavna eksperimentalna istraživanja, primenom inverznih agonista selektivnih za GABA-A receptore koji sadrže  $\alpha 5$  podjedinicu, ukazuju na facilitaciju učenja i pamćenja u modelima kognitivnih oštećenja (Ballard i sar., 2009; Braudeau i sar., 2011; Nutt i sar., 2007). Međutim, uloga i značaj  $\alpha 5$  podjedinice zahteva dalja ispitivanja, s obzirom da rezultati naših istraživanja sa selektivnim ligandima za GABA-A receptore koji sadrže  $\alpha 5$  podjedinicu, nisu pokazali ovakve promnestičke efekte u testu aktivnog izbegavanja, a pri većim dozama ovi ligandi čak smanjuju spontanu lokomotornu aktivnost, odnosno pokazuju hipolokomotorne efekte (Savić i sar., 2008).

Pored efekata na učenje, ispitivanja u proceduri aktivnog uslovljenog izbegavanja omogućila su praćenje uticaja ispitivanih supstanci i na stanje anksioznosti. U većim dozama, preko 1 mg/kg, DMCM pokazuje anksiogenu aktivnost, odnosno povećava broj tzv. „freezing“ reakcija, odnosno ukočenosti kod pacova, dok je flumazenil antagonizovao ove efekte. Razmatrajući rezultate iz testa aktivnog izbegavanja, treba naglasiti da sve paradigme koje uključuju električne šokove poseduju jaku emocionalnu komponentu, što značajno otežava razdvajanje direktnih efekata na memorijske procese od indirektnih efekata preko uticaja na nivo anksioznosti (Beuzen i Belzung, 1995). Sposobnost facilitacije sticanja i/ili konsolidovanja memorije primenom inverznih agonista ispitivana je u različitim memorijskim zadacima (Raffalli-Sebille i sar., 1991; Krazem i sar., 2001; Savić i sar., 2008 ) i doza  $\beta$ -karbolina potrebna za osnaživanje memorijskih procesa je obično niža od doza koje izazivaju promene ponašanja povezane sa povećanjem nivoa anksioznosti (Chapouthier i Venault, 2002), što je u skladu i sa našim rezultatima. Nekoliko studija uputilo je na pretpostavku da anksioznost i pamćenje nisu samo međusobno povezani procesi, već da je anksioznost neophodan korak u formiranju memorije (Mathews, 1990). Ovi podaci upućuju na

zaključak da anksiolitički procesi dele zajedničke neurohemijske supstrate sa amnezijom, i obrnuto, da je formiranje memorije efikasnije u anksioznim okolnostima (Ribeiro i sar., 1999). Chapouthier i Venault (2002) navode da normalni memorijski procesi kod zdravih ljudi uključuju umeren nivo anksioznosti. Naši nalazi sa efektima DMCM-a potkrepljuju hipotezu da normalno stanje memorijske aktivnosti predstavlja blagu formu GABA-kontrolisane anksioznosti (Chapouthier i Venault, 2002). Naime, facilitatorni efekti DMCM-a na memoriju su postignuti pri dozi od 0,1 mg/kg i bez merljivih anksioznih uticaja, što je procenjeno u istovetnim eksperimentalnim uslovima.

U prilog korelacije anksioznosti i procesa učenja govori i studija Ribeira i sar. (1999), u kojoj je pokazano poboljšano formiranje memorije kod nativno anksioznih životinja izloženih stresnom testu sa efektima potencijalnih endogenih inverznih agonista. Naime, primenom radio-obebeženog flumazenila utvrdili su da je gustina BDZ mesta vezivanja u hipokampusu (ali ne i amigdali) značajno veća kod anksioznih u odnosu na ne-anksiozne pacove. Endogeni inverzni agonisti oslobođeni u stresnoj situaciji bi stoga mogli da izraženije facilituju memorijsku obradu stresnog zadatka u anksioznoj grupi. Međutim, gustina vezivanja kod anksioznih u odnosu na normalne životinje se nije razlikovala (Ribeiro i sar., 1999), tako da objašnjenje nije potpuno jasno. Kod Roman pacova, koji su izvedeni iz Wistar soja, selektovane su linije koje brzo i sporo uče odgovor aktivnog izbegavanja (ne-anksiozna, odnosno anksiozna linija), i utvrđeno je da nema značajnih razlika u vezivanju radio-obebeženog flumazenila u malom mozgu, hipokampusu i kori velikog mozga između ove dve grupe (Bentareha i sar., 1998). Istovremeno, kod linije koja pokazuje dobro akviziciono izvođenje AA zadatka pokazane su značajno veće koncentracije metabolita progesterona koji pozitivno moduliraju GABA-ergičku neurotransmisiju (Steimer i sar., 1997). Sa ili bez uključivanja potencijalnih endogenih liganada za BDZ receptor ili dokazanih endogenih neuroaktivnih steroida (Reddy, 2003), nepobitno je utvrđeno da se emocionalno pobuđujuća iskustva bolje pamte (McGaugh, 2004). Na kraju, treba podsetiti da je ponašanje istovremeno zbir nezavisnih parametara i integralni obrazac aktivnosti (Guyton, 2006). Dok je funkcionisanje organizma s jedne strane autonomno,

s druge strane je i jako integrisano kao celina i nema razloga da se ista zakonitost ne primeni i na kompleksnu strukturu i funkciju GABA-A receptora.

## **5.2. Forsirano plivanje, antidepresivni efekti i spontana lokomotorna aktivnost**

Test forsiranog plivanja (FST) predstavlja validan i pouzdan bihevioralni model za ispitivanje depresije kod glodara i, takođe, važan test za proučavanje neurobioloških mehanizama koji su uključeni u ispoljavanje antidepresivnih efekata (Xing i sar., 2011). Postavljanjem životinje u ograničen prostor ispunjen vodom stvara se averzivna situacija koja izaziva reakciju „očaja“ i bespomoćnosti, a supstance sa antidepresivnim potencijalom produžavaju vreme koje životinja provodi u borbi za pronalaženjem izlaza iz cilindra, a smanjuju vreme imobilnosti. U našem istraživanju, smanjena imobilnost životinja jasno je uočena prilikom jednokratne primene najmanje doze DMCM-a (0,1 mg/kg), ukazujući na potencijalne antidepresivne efekte inverznog agoniste DMCM-a, ali se takav trend gubi pri većim dozama. Pored toga, u testu nisu zabeleženi značajni uticaji DMCM-a na vreme borbe, odnosno motoriku životinje, što govori u prilog tome da efekti supstance u testu forsiranog plivanja i uočen antidepresivni potencijal nisu posledica promene motornih funkcija, odnosno povećanja aktivnosti životinja.

Koliko nam je poznato, naša studija je prvi izveštaj o uticaju inverznih agonista BDZ mesta vezivanja na ponašanje pacova u testu forsiranog plivanja, kao i o uticaju ovih supstanci na motivaciju. Rezultati koje smo dobili su, na prvi pogled, iznenađujući i u suprotnosti sa postavljenim hipotezama da smanjenje GABA-ergičke neurotransmisije i aktivnosti GABA-A receptora doprinosi razvoju depresije (Hines i sar., 2012). S druge strane, akutni antidepresivni efekti, pokazani u našem istraživanju, pokazuju značajnu sličnost sa nedavno objavljenim rezultatima efekata blokade glutamatskih NMDA receptora (Li i sar., 2010; Autry i sar., 2011). U navedenim studijama, uticaj liganada za mesta vezivanja na NMDA receptorima akutno i trenutno utiče na forsirano plivanje i motivaciju eksperimentalnih životinja, a ketamin, kao antagonist NMDA receptora, dospeo je u samu žižu naučne javnosti. Našim



istraživanjem je, nesumnjivo, prošireno polje ispitivanja u smislu značaja brzih ekscitatornih (glutamatskih) ali i inhibitornih (GABA-ergičkih) uticaja za neurobiologiju depresije, posebno što su ovi efekti znatno brži i izraženiji u poređenju sa konvencionalnim efektima modulacije monoaminergičkih sistema. Aktuelne smernice u farmakoterapiji depresije su, uglavnom, fokusirane na modulaciju monoaminskih neurotransmiterskih sistema. Ipak, podaci iz epidemioloških studija da 20 - 40 % pacijenata lečenih klasičnim antidepresivima ostaje rezistentno na terapiju (Souery i sar., 2006), a da 50-80 % pacijenata doživi relaps (Williams i sar., 2010), ukazuju na potrebu za intenzivnim biološkim i bihejvioralnim ispitivanjima i eventualnim revidiranjem postojećih hipoteza.

Cilj naših daljih istraživanja bio je provera da li su efekti određenih doza DMCM-a na motivaciju pacova u testu forsiranog plivanja posledica direktnog delovanja inverznog agoniste na specifično mesto vezivanja GABA-A receptora, odnosno BDZ receptor i u tom smislu je korišćen antagonist BDZ receptora – flumazenil. Eksperimenti u kojima je ispitivan efekt antagoniste BDZ receptora na delovanje različitih doza DMCM-a na reakciju FS pokazali su da blokada BDZ receptora pomoću flumazenila dovodi do potpune blokade efekata DMCM-a na forsirano plivanje i motivaciju. Naime, u prisustvu flumazenila (10,0 mg/kg), DMCM, u dozi 0,1 mg/kg, nema antidepresivni potencijal, odnosno flumazenil poništava antidepresivne efekte DMCM-a i ukazuje da se efekti inverznih agonista ostvaruju preko specifičnih mesta vezivanja u sklopu GABAA-BDZ-Cl receptorskog kompleksa, odnosno preko BDZ receptora.

Mnogobrojni i različiti bihejvioralni efekti DMCM-a mogu da budu posledica delovanja inverznih agonista na specifične regije nervnog sistema, odnosno na specifične podtipove GABA-A receptora, koji sadrže različite  $\alpha$  subjedinice. Kao što je već naznačeno, DMCM se vezuje različitim afinitetom za GABA-A receptore koji sadrže različite  $\alpha$  subjedinice i to sledećim redosledom prema afinitetu:  $\alpha_1 > \alpha_2 = \alpha_3 > \alpha_5 > \alpha_6$  (Luddens i Wisden, 1991). Pokazano je, takođe, da se DMCM u malim koncentracijama vezuje samo za BDZ receptore i smanjuje GABA-om indukovanu struju Cl- jona i to na  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  i  $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  podtipovima GABA-A receptora. Na taj način,

naši podaci ukazuju da negativna modulacija GABA-A receptora, koji sadrže  $\alpha_1$  i  $\alpha_3$  subjedinice može pokrenuti akutne antidepresivne efekte, te bi u tom smislu trebalo usmeriti istraživanja sinteze selektivnih liganada. I upravo se, poslednjih godina, primenom tehnologija genetski modifikovanih životinja, sprovode intenzivna istraživanja u cilju utvrđivanja korelacije između pojedinih efekata liganada BDZ receptora i njihovog specifičnog molekuskog i neuronskog supstrata delovanja. Ova, do danas, aktuelna istraživanja imaju za cilj razvoj selektivnih lekova koji deluju preko benzodiazepinskog receptora sa specifičnim, suženim profilom dejstava, kako terapijskih tako i neželjenih.

S obzirom na hronični karakter depresivnih ispoljavanja, kao logični nastavak naših daljih istraživanja, ispitivan je uticaj ponavljanih doza negativnih modulatora GABA-ergičke neurotransmisije u ispoljavanju antidepresivnih efekata. U tom cilju korišćen je protokol ponavljane primene DMCM-a tokom 2 nedelje i zatim merenje antidepresivnog potencijala i uticaja na motivaciju. Rezultati ove serije eksperimenata su u skladu sa efektima akutne primene DMCM-a, odnosno, vreme imobilnosti je značajno smanjeno primenom DMCM-a u odnosu na rastvarač i nakon ponavljane primene. Na ovaj način, potkrepljena je uloga negativne modulacije GABA-ergičke neurotransmisije u ispoljavanju antidepresivnih uticaja, ne samo nakon akutne, već i ponavljane primene.

Poslednjom serijom eksperimenata, posebno je ispitivan uticaj rastućih doza DMCM-a na dužinu pređenog puta životinja, odnosno na spontanu lokomotornu aktivnost, u cilju eliminisanja mogućih inhibitornih ili ekscitatornih uticaja na motoriku životinja. DMCM, u doznom režimu u kome pokazuje promnestičke i antidepresivne uticaje (0,1 mg/kg), nije uticao na spontanu lokomotornu aktivnost, što ukazuje da učenje reakcije AA i uočeni antidepresivni efekti nisu bili posledica povećane aktivnosti životinja. Tek u većim dozama DMCM (1 mg/kg) smanjuje lokomotornu aktivnost, odnosno ispoljava hipolokomotorni efekt, što je u saglasnost sa prethodnim rezultatima aktivnog izbegavanja.

Pokazan uticaj inverznih agonista benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA-A receptora na antidepresivnu aktivnost i učenje eksperimentalnih životinja u skladu je sa kliničkim nalazima, da su poremećaji raspoloženja često u komorbiditetu sa anksioznim poremećajima i kognitivnim oštećenjima (Kalueff i sar., 2007). I nedavno eksperimentalno potvrđena korelacija poremećaja raspoloženja i kognicije (Elizalde i sar., 2008; Bondi i sar., 2010), u potpunosti je u skladu sa našim rezultatima, koji pokazuju da su promnestički i antidepresivni efekti inverznog agoniste DMCM-a postignuti pri istom doznom režimu. Stoga, sveukupni povoljni učinak negativne modulacije GABA-ergičke neurotransmisije može odražavati povoljne uticaje na učenje, kogniciju i motivaciju, istovremeno.

## VI ZAKLJUČCI

Na osnovu bihevioralnih ispitivanja efekata jednokratne i ponavljane primene inverznog agoniste DMCM-a na spontano i uslovljeno ponašanje pacova u testovima aktivnog izbegavanja, forsiranog plivanja i lokomotorne aktivnosti kao i utvrđivanja uticaja antagoniste flumazenila na ove efekte, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. DMCM, neselektivni inverzni agonista BDZ mesta vezivanja GABA-A receptora, utiče na učenje reakcije aktivnog izbegavanja, i u malim dozama akutno facilitira učenje, bez izraženog uticaja na parametre lokomotorne aktivnosti.
2. Efekti facilitacije učenja DMCM-om ostvaruju se preko BDZ mesta vezivanja u sklopu GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorskog kompleksa, na šta ukazuje i rezultat da se ovi efekti mogu blokirati flumazenilom, antagonistom BDZ receptora.
3. Prilikom ponavljane primene (u modelu 5x50), DMCM, pri istoj dozi koja jednokratno facilitira učenje, potvrđuje direktne promnestičke efekte.
4. DMCM, neselektivni inverzni agonista BDZ mesta vezivanja GABA-A receptora, utiče na vreme imobilnosti životinja u testu forsiranog plivanja i u malim dozama poboljšava motivaciju i pokazuje efekte poput antidepresivnih, bez izraženog uticaja na parametre spontane lokomotorne aktivnosti.
5. Antidepresivni efekti DMCM-a ostvaruju se preko BDZ mesta vezivanja u sklopu GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorskog kompleksa, na šta ukazuje i rezultat da se ovi efekti mogu blokirati flumazenilom, antagonistom BDZ receptora.
6. DMCM, pri istom doznom režimu koji ispoljava akutne antidepresivne uticaje, pokazuje takve efekte i nakon ponavljane primene tokom 2 nedelje.

## ZNAČAJ REZULTATA

Dobijeni rezultati bi mogli doprineti jasnijem sagledavanju značaja benzodiazepinskih receptora u okviru GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorskog kompleksa i njihove uloge u utvrđivanju kompleksne povezanosti faktora koji su uključeni u nastanak i razvoj poremećaja raspoloženja i kognicije, kroz svoj uticaj na motivacione faktore u interakciji sa uslovima spoljne sredine. Na osnovu dostupnih podataka iz literature, naše istraživanje predstavlja jedan od prvih izveštaja o uticaju inverznih agonista benzodiazepinskog mesta vezivanja na stepen motivacije i antidepresivna ispoljavanja. U kliničkom smislu, negativna modulacija GABA-ergičke neurotransmisije otvara novo polje istraživanja u oblasti neurobiologije depresije i učenja i mogla bi da predstavlja drugačiji pristup u terapiji depresivnih stanja i sa njima povezanih kognitivnih poremećaja.

## VII LITERATURA

Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 180-7.

Atack JR. Subtype-selective GABA(A) receptor modulation yields a novel pharmacological profile: the design and development of TPA023. *Adv Pharmacol*. 2009; 57:137-85.

Atack JR. Preclinical and clinical pharmacology of the GABA-A receptor alpha5 subtype-selective inverse agonist alpha5IA. *Pharmacol Ther*. 2010; 125: 11-26.

Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, et al. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 2011; 475: 91–5.

Ballard TM, Knoflach F, Prinssen E, Borroni E, Vivian JA, Basile J, Gasser R, Moreau JL, Wettstein JG, Buettelmann B, Knust H, Thomas AW, Trube G, Hernandez MC. RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABAA alpha5 subunit-containing receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009; 202: 207-23.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Möhler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 291-313.

Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25: 1-27.

Benson JA, Low K, Keist R, Möhler H, Rudolph U. Pharmacology of recombinant gamma-aminobutyric acid A receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated alpha-subunits. *FEBS Lett* 1998; 431: 400-4.

Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* 2004; 84: 835-67.

Beuzen A, Belzung C. Link between emotional memory and anxiety states: a study by principal component analysis. *Physiol Behav* 1995; 58: 111-8.

Bondi CO, Jett JD, Morilak DA. Beneficial effects of desipramine on cognitive function of chronically stressed rats are mediated by alpha1-adrenergic receptors in medial prefrontal cortex. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2010;34:913–23.

Braestrup C, Nielsen M. Multiple benzodiazepine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 1980; 1:424-427.

Braudeau J, Delatour B, Duchon A, Pereira PL, Dauphinot L, de Chaumont F, et al. Specific targeting of the GABA-A receptor  $\gamma_5$  subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *Journal of Psychopharmacology* 2011;25(8):1030–42.

Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 3805-9.

Brunig I, Scotti E, Sidler C, Fritschy JM. Intact sorting, targeting, and clustering of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes in hippocampal neurons in vitro. *J Comp Neurol* 2002; 443: 43-55.

Burt DR. Reducing GABA receptors. *Life Sci* 2003; 73: 1741-58.

Carlezzone JR, Mendrek A, Wise RA. MK-801 disrupts the expression but not the development of bromocriptine sensitization: a state-dependency interpretation *Synapse* 1995; 20: 1–9.

Celerier A, Pierard C, Beracochea D. betaCCM enhances retrieval of serial contextual but not of serial spatial memory in mice. *Behav Pharmacol* 2004; 15: 123-31.

Chandramohan Y, Droste SK, Arthur JS, Reul JM. The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *Eur J Neurosci*. 2008; 27: 2701-13.

Chapouthier G, Venault P. GABA-A receptor complex and memory processes. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 841-51.

Chapouthier G. GABA receptor subunits and global behaviour. *Drug Discov Today* 2003; 8: 778.

Chebib M, Johnston GA. GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem* 2000; 43: 1427-47.

Cherlyn SY, Woon PS, Liu JJ, Ong WY, Tsai GC, Sim K. Genetic association studies of glutamate, GABA and related genes in schizophrenia and bipolar disorder: a decade of advance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2010;34:958–77.

Collins A, Hill LE, Chandramohan Y, Whitcomb D, Droste SK, Reul JM. Exercise Improves Cognitive Responses to Psychological Stress through Enhancement of Epigenetic Mechanisms and Gene Expression in the Dentate Gyrus. *PLoS ONE* 2009; 4: 4330.



Colpaert FC. Amnesic trace locked into the benzodiazepine state of memory, *Psychopharmacology* 1990; 102: 28–36.

Danek A, Uttner I, Straube A. Is transient global amnesia related to endogenous benzodiazepines? *J Neurol* 2002; 249: 628.

Darbandi N, Rezayof A, Zarrindast MR. Modulation of morphine state-dependent learning by muscarinic cholinergic receptors of the ventral tegmental area. *Physiol Behav.* 2008; 94: 604-10.

Dawson GR, Maubach KA, Collinson N, Cobain M, Everitt BJ, MacLeod AM, Choudhury HI, McDonald LM, Pillai G, Rycroft W, Smith AJ, Sternfeld F, Tattersall FD, Wafford KA, Reynolds DS, Seabrook GR, Atack JR. An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABAA receptors enhances cognition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 316: 1335-45.

DeLorey TM, Lin RC, McBrady B, He X, Cook JM, Lamah J, Loew GH. Influence of benzodiazepine binding site ligands on fear-conditioned contextual memory. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 45-54.

Do-Rego JL, Mensah-Nyagan AG, Beaujean D, Leprince J, Tonon MC, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. The octadecaneuropeptide ODN stimulates neurosteroid biosynthesis through activation of central-type benzodiazepine receptors. *J Neurochem* 2001; 76: 128-38.

Dubiela FP, Oliveira MG, Moreira KM, Nobrega JN, Tufik S, Hipólido DC. Inverse benzodiazepine agonist beta-CCM does not reverse learning deficit induced by sleep deprivation. *Neurosci Lett.* 2010; 469(1):169-73.

Earnheart JC, Schweizer C, Crestani F, Iwasato T, Itohara S, Möhler H, et al. GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *Journal of Neuroscience* 2007;27:3845–54.

Elizalde N, Gil-Bea FJ, Ramírez MJ, Aisa B, Lasheras B, Del Rio J, et al. Longlasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 2008;199:1–14.

File SE, Pellow S. Low and high doses of benzodiazepine receptor inverse agonists respectively improve and impair performance in passive avoidance but do not affect habituation. *Behav Brain Res* 1988; 30: 31-6.

Fritschy JM, Brunig I. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 299-323.

Fritschy JM, Möhler H. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* 1995; 359: 154-94.

Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, Katz Y, Veenman L, Weisinger G, Weizman A. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 629-50.

Grauer SM, Pulito VL, Navarra RL, Kelly MP, Kelley C, Graf R, et al. Phosphodiesterase 10A inhibitor activity in preclinical models of the positive, cognitive, and negative symptoms of schizophrenia. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2009;331:574–90.

Guyton AC. Cerebral cortex, intellectual functions of the brain, learning and memory. In: Guyton AC., Hall J. *Textbook of medical physiology*. China, 2006.723-727.

Harris D, Clayton T, Cook J, Sahbaie P, Halliwell RF, Furtmüller R, Huck S, Sieghart W, DeLorey TM. Selective influence on contextual memory: physiochemical properties associated with selectivity of benzodiazepine ligands at GABAA receptors containing the alpha5 subunit. *J Med Chem.* 2008; 51: 3788-803.

Hines RM, Davies PA, Moss SJ, Maguire J. Functional regulation of GABA(A) receptors in nervous system pathologies. *Curr Opin Neurobiol.* 2012; 22: 552-8.

Huang Q, He X, Ma C, Liu R, Yu S, Dayer CA, Wenger GR, McKernan R, Cook JM. Pharmacophore/receptor models for GABA(A)/BzR subtypes (alpha1beta3gamma2, alpha5beta3gamma2, and alpha6beta3gamma2) via a comprehensive ligand-mapping approach. *J Med Chem* 2000; 43: 71-95.

Izquierdo I, McGaugh JL. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol* 2000; 11: 517-34.

Jensen LH, Stephens DN, Sarter M, Petersen EN. Bidirectional effects of beta-carbolines and benzodiazepines on cognitive processes. *Brain Res Bull* 1987; 19: 359-64.

Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9(5):331-43.

Jones-Davis DM, Macdonald RL. GABA(A) receptor function and pharmacology in epilepsy and status epilepticus. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 12-8.

Kalueff AV, Nutt DJ. Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and Anxiety* 2007;24:495–517.

Kaufmann WA, Humpel C, Alheid GF, Marksteiner J. Compartmentation of alpha 1 and alpha 2 GABA(A) receptor subunits within rat extended amygdala: implications for benzodiazepine action. *Brain Res* 2003; 964: 91-9.

Kelley AE. Locomotor activity and exploration. In: Van Haaren F, editor. *Methods in behavioral pharmacology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1993. pp.499-518.

Kenakin T, Onaran O. The ligand paradox between affinity and efficacy: can you be there and not make a difference? *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 275-80.

Knoflach F, Benke D, Wang Y, Scheurer L, Luddens H, Hamilton BJ, Carter DB, Möhler H, Benson JA. Pharmacological modulation of the diazepam-insensitive recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors alpha 4 beta 2 gamma 2 and alpha 6 beta 2 gamma 2. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 1253-61.

Korpi ER, Grunder G, Luddens H. Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol* 2002; 67:113-59.

Krazem A, Borde N, Beracochea D. Effects of diazepam and beta-CCM on working memory in mice: relationships with emotional reactivity. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 68: 235-44.

Lacapere JJ, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 2003; 68: 569- 85.

Lal H, Forster MJ. Flumazenil improves active avoidance performance in aging NZB/BINJ and C57BL/6NNia mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;35:747-50.

Lang UE, Borgwardt S. Molecular Mechanisms of Depression: Perspectives on New Treatment Strategies. *Cell Physiol Biochem*. 2013; 31: 761-777.

Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 2010;329(5994):959–64.

Lin SC, Bergles DE. Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia* 2004; 47: 290-8.

Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL. GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 2011;70:385–409.

Luddens H, Wisden W. Function and pharmacology of multiple GABAA receptor subunits. *TIPS* 1991;12:49–51.

Mathews A. Why worry? The cognitive function of anxiety. *Behav Res Ther* 1990; 28: 455- 68.

Macdonald RL, Kang JQ, Gallagher MJ. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *Journal of Physiology* 2010;588(Pt. 11):1861–9.

McGaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 1-28.

McGaugh JL, Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 208-10.

McKernan RM. The role of GABA-A receptors subtypes in the effects of benzodiazepines. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002; 12: S155-S156.

McKernan RM, Whiting PJ. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 1996; 19: 139-43.

McMahon LR, Gerak LR, France CP. Efficacy and the discriminative stimulus effects of negative GABAA modulators, or inverse agonists, in diazepam-treated rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 318: 907-13.

Mehta AK, Ticku MK. An update on GABAA receptors. *Brain Res Rev* 1999; 29: 196-217.

Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 2003; 70: 83-244.

Möhler H, Okada T. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science* 1977; 198: 849-51.

Möhler H, Richards JG. Agonist and antagonist benzodiazepine receptor interaction in vitro. *Nature, Lond.* 1981; 294: 763-765.

Möhler H, Crestani F, Rudolph U. GABA(A)-receptor subtypes: a new pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 22-5.

Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 2-8.

Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta- analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Brain Res Rev* 2003; 41: 268-87.

Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA. Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* 1994; 62: 815-8.

Nutt DJ, Besson M, Wilson SJ, Dawson GR, Lingford-Hughes AR. Blockade of alcohol's amnestic activity in humans by an alpha5 subtype benzodiazepine receptor inverse agonist. *Neuropharmacology* 2007; 53 :810-20.

Obradović D, Bokonjić D, Savić M, Anđelković D, Ugrešić N, Stojiljković M. GABA- benzodiazepine receptor complex in brain oxidative metabolism regulation. *Pharmacol Res* 2002; 46: 149-154.

Obradović D, Savić M, Anđelković D, Ugrešić N, Bokonjić D. The influence of midazolam and flumazenil on rat brain slices oxygen consumption. *Pharmacol Res* 2003; 47: 127-131.

Obradović D, Savić M, Anđelković D, Ugrešić N, Bokonjić D. The influence of midazolam on active avoidance retrieval and acquisition rate in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 77: 77-83.

Obradović DI, Savić MM, Obradović MM, Ugrešić ND, Bokonjić DR. The lack of bicuculline and picrotoxin influence on midazolam depressant action on brain oxygen consumption. *Neurosci Lett*. 2006; 397: 201-4.

Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacological Reviews* 2008;60(3):243–60.

Pena C, Medina JH, Novas ML, Paladini AC, De Robertis E. Isolation and identification in bovine cerebral cortex of n-butyl beta-carboline-3-carboxylate, a potent benzodiazepine binding inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4952-6.

Petroff OA. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist* 2002; 8: 562-73.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 2000; 101:815-50.

Platt DM, Rowlett JK, Spealman RD, Cook J, Ma C. Selective antagonism of the ataxic effects of zolpidem and triazolam by the GABAA/alpha1-preferring antagonist beta-CCt in squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002;164: 151-9.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology* 1978;47(4):379-91.

Raffalli-Sebille MJ, Chapouthier G, Venault P, Dodd RH. Methyl beta-carboline-3- carboxylate enhances performance in a multiple-trial learning task in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; 35: 281-4.

Raffalli-Sebille MJ, Chapouthier G. Similar effects of a beta-carboline and of flumazenil in negatively and positively reinforced learning tasks in mice. *Life Sci* 1991; 48: 685-92.

Reddy DS. Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol* 2003; 15: 197-234.

Reul JM, Hesketh SA, Collins A, Mécinas MG. Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation. *Epigenetics* 2009; 4: 434-9.

Ribeiro RL, Andreatini R, Wolfman C, Viola H, Medina JH, Da Cunha C. The "anxiety state" and its relation with rat models of memory and habituation. *Neurobiol Learn Mem* 1999; 72: 78-94.

Rudolph U, Crestani F, Möhler H. GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 188-94.



Rudolph U, Möhler H. Analysis of GABA<sub>A</sub> receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 475-98.

Samardžić J. Eksperimentalni modeli anksioznosti. Akademski specijalistički rad. Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2008.

Samardžić J, Savić K, Stefanović N, Matunović R, Baltezarević D, Obradović M, Jancić J, Oprić D, Obradović D. Anxiolytic and antidepressant effect of zinc on rats and its impact on general behavioural parameters. *Vojnosanit Pregl.* 2013; 70: 391-5.

Sand P, Kavvadias D, Feineis D, Riederer P, Schreier P, Kleinschnitz M, Czygan FC, Abou- Mandour A, Bringmann G, Beckmann H. Naturally occurring benzodiazepines: current status of research and clinical implications. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2000; 250: 194-202.

Sangameswaran L, Fales HM, Friedrich P, De Blas AL. Purification of a benzodiazepine from bovine brain and detection of benzodiazepine-like immunoreactivity in human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 9236-40.

Savić M, Obradović D, Ugrešić N, Bokonjić D. The influence of diazepam on atropine reversal of behavioural impairment in dichlorvos-treated rats. *Pharmacol Toxicol* 2003; 93: 211-218.

Savić MM, Obradović DI, Ugrešić ND, Cook JM, Yin W, Bokonjić DR. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the passive avoidance task: differential antagonism by flumazenil and b-CCt. *Behav Brain Res* 2005; 158: 293-300.

Savić MM, Clayton T, Furtmüller R, Gavrilović I, Samardžić J, Savić S, et al. PWZ-029, a compound with moderate inverse agonist functional selectivity at GABAA receptors containing  $\alpha 5$  subunits, improves passive, but not active avoidance learning in rats. *Brain Research* 2008;1208: 150–9.

Sharma AC, Kulkarni SK. (+/-) Baclofen sensitive scopolamine-induced short term memory deficits in mice. *Indian. J. Ehp. Biol.* 1993; 31(4): 348-52.

Shen Q, Lal R, Luellen BA, Earnheart JC, Andrews AM, Luscher B: gamma-Aminobutyric acid-type A receptor deficits cause hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity and antidepressant drug sensitivity reminiscent of melancholic forms of depression. *Biological Psychiatry* 2010;68:512–20.

Sieghart W. Unraveling the function of GABA(A) receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21: 411-3.

Sieghart W, Ernst M. Heterogeneity of GABAA receptors: revived interest in the development of subtype-selective drugs. *Curr Med Chem - CNS Agents* 2005; 5: 217-242.

Souery D, Papakostas GI, Trivedi MH. Treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry* 2006; 67: 16–22.

Stephens DN, Schneider HH, Kehr W, Jensen LH, Petersen E, Honore T. Modulation of anxiety by beta-carbolines and other benzodiazepine receptor ligands: relationship of pharmacological to biochemical measures of efficacy. *Brain Res Bull* 1987; 19: 309-18.

Tauber M, Calame-Droz E, Prut L, Rudolph U, Crestani F.  $\alpha 2$ -gamma-Aminobutyric acid (GABA)<sub>A</sub> receptors are the molecular substrates mediating precipitation of narcosis but not of sedation by the combined use of diazepam and alcohol in vivo. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 2599-604.

Thiebot M. Some evidence for amnesic-like effects of benzodiazepine in animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1985; 9: 87-93.

Van Rijnsoever C, Tauber M, Choulli MK, Keist R, Rudolph U, Möhler H, Fritschy JM, Crestani F. Requirement of alpha5-GABAA receptors for the development of tolerance to the sedative action of diazepam in mice. *J Neurosci.* 2004; 24: 6785-90.

Venault P, Chapouthier G, de Carvalho LP, Simiand J, Morre M, Dodd RH, Rossier J. Benzodiazepine impairs and beta-carboline enhances performance in learning and memory tasks. *Nature* 1986; 321: 864-6.

Venault P, Chapouthier G, Simiand J, Dodd RH, Rossier J. Enhancement of performance by methyl beta-carboline-3-carboxylate, in learning and memory tasks. *Brain Res Bull* 1987; 19: 365-70.

Whiting PJ. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today* 2003; 8: 445-50.

Wichlinski LJ. Possible involvement of an endogenous benzodiazepine receptor ligand of the inverse agonist type in the regulation of rapid-eye movement (REM) sleep: an hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1996; 20: 1 -44.

Williams DB, Akabas MH. Benzodiazepines induce a conformational change in the region of the gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha(1)-subunit M3 membrane-spanning segment. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 1129-36.

Williams DB, Akabas MH. Evidence for distinct conformations of the two alpha 1 subunits in diazepam-bound GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* 2001; 41: 539-45.

Williams JM, Russell IT, Crane C, Russell D, Whitaker CJ, Duggan DS, Barnhofer T, Fennell MJ, Crane R, Silverton S. Staying well after depression: trial design and protocol. *BMC Psychiatry* 2010; 10:23.

Xing B, Zhao Y, Zhang H, Dang Y, Chen T, Huang J, et al. Microinjection of valproic acid into the ventrolateral orbital cortex exerts an antidepressant-like effect in the rat forced swim test. *Brain Research Bulletin* 2011;85:153–7.

## VIII DODATAK

### *LISTA PUBLIKOVANIH RADOVA I SAOPŠTENJA IZ DOKTORATA*

1. Samardžić J, Švob Štrac D, Obradović M, Oprić D, Obradović DI. DMCM, a benzodiazepine site inverse agonist, improves active avoidance and motivation in the rat. *Behav Brain Res.* 2012; 235 (2): 195– 9.

2. Samardžić J, Obradović DI. Antidepressant-like effects of benzodiazepine site inverse agonists in the rat forced swim test. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2012; 13(Suppl 1): A1.

## LISTA ILUSTRACIJA

*Slika 1. Shematski prikaz GABA-A receptora i njegovih subjedinica*

*Slika 2. GABA<sub>A</sub>-BDZ-Cl receptorski kompleks*

*Slika 3. Modulacija GABA-ergičke neurotransmisije u prisustvu DMCM-a*

*Slika 4. Aparatura za izvođenje uslovljenog ponašanja tipa aktivnog izbegavanja (AA)*

*Slika 5. Cilindar za izvođenje testa forsiranog plivanja (FST)*

*Slika 6. Uticaj flumazenila (F: 2.5, 5.0 i 10.0 mg/kg) na broj odgovora AA*

*Slika 7. Uticaj flumazenila (F: 2.5, 5.0 i 10.0 mg/kg) na broj prelazaka životinje s jedne na drugu stranu kaveza u periodima pauza između pokušaja – ITC*

*Slika 8. Uticaj DMCM-a (D: 0.05, 0.1, 0.5 i 1.0 mg/kg) na broj AA*

*Slika 9. Uticaj flumazenila (F: 10.0 mg/kg) na efekte DMCM-a u testu AA*

*Slika 10. Uticaj DMCM-a (D: 0.05, 0.1, 0.5 i 1.0 mg/kg) na broj prelazaka životinje s jedne na drugu stranu kaveza u periodima pauza između pokušaja – ITC*

*Slika 11. Uticaj flumazenila (F: 10.0 mg/kg) na efekte DMCM-a na broj prelazaka životinje s jedne na drugu stranu kaveza u periodima pauza između pokušaja – ITC*

*Slika 12. Uticaj DMCM-a (0,1 mg/kg) i rastvarača (S) na učenje reakcije AA u protokolu 5 x 50, bez promene tretmana trećeg dana*

**Slika 13.** Uticaj DMCM-a 0,1 mg/kg (D) i rastvarača (S) na učenje reakcije AA u protokolu 5 x 50, sa promenom tretmana trećeg dana

**Slika 14.** Uticaj flumazenila (F: 2.5, 5.0 i 10.0 mg/kg) na vreme imobilnosti životinja tokom forsiranog plivanja

**Slika 15.** Uticaj DMCM-a (D: 0.05, 0.1, 0.5 i 1.0 mg/kg) na vreme imobilnosti tokom forsiranog plivanja

**Slika 16.** Uticaj flumazenila (F: 10.0 mg/kg) na efekte DMCM-a tokom forsiranog plivanja

**Slika 17.** Uticaj ponavljane primene DMCM-a (0.1 mg/kg) na vreme imobilnosti tokom forsiranog plivanja

**Slika 18.** Uticaj flumazenila (F: 2.5, 5.0 i 10.0 mg/kg) na dužinu pređenog puta.

**Slika 19.** Uticaj DMCM-a (D: 0.05, 0.1, 0.5 i 1.0 mg/kg) na dužinu pređenog puta

**Slika 20.** Uticaj flumazenila (F: 10.0 mg/kg) na efekte DMCM-a u testu spontane lokomotorne aktivnosti

**Tabela 1.** Afinitet vezivanja i efikasnost DMCM-a i flumazenila na rekombinantnim GABA-A receptorima, koji pored  $\beta 3$  i  $\gamma 2$  subjedinice, sadrže  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ili  $\alpha_5$  subjedinicu

## **IX BIOGRAFIJA AUTORA**

Dr Janko Samardžić rođen je 18. septembra 1980. u Kragujevcu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 1999/2000, a diplomirao je februara 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,20.

Poslediplomske akademske specijalističke studije iz Eksperimentalne farmakologije upisao je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2006/2007. godine, a završni specijalistički rad odbranio je februara 2009. Osnovnu, zdravstvenu specijalizaciju iz Kliničke farmakologije upisao je 2009/10 godine, a specijalistički ispit je položio januara 2013. godine sa odličnom ocenom.

Od januara 2007. godine je zaposlen u Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u zvanju asistenta. Član je projekta projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Autor je više u celini štampanih radova u međunarodnim i domaćim časopisima, više poglavlja u udžbenicima, kao i brojnih saopštenja sa naučnih skupova.

Član je Srpskog lekarskog društva, Srpskog farmakološkog društva, Austrijskog farmakološkog društva i Evropskog udruženja za neuropsihofarmakologiju (ECNP).



## X PRILOZI

Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписани-а JANKO SAMARDŽIĆ

број индекса \_\_\_\_\_

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

UTICAJ NEGATIVNE MODULACIJE BENZODIAZEPINSKOG  
MESTA VEZIVANJA GABA-A RECEPTORA NA ISPOBJAVANJE  
RAZLIČITIH BIHEVIDRALNIH EFEKATA BENZODIAZEPINA  
KOD PACOVA

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

Потпис докторанда

У Београду, 10. 06. 2013.

Janko Samardžić

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора JANKO SAMARDŽIĆ

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм MEDICINSKA FARMAKOLOGIJA

Наслов рада UTICAJ NEGATIVNE MODULACIJE BENZODIAZEPINSKOG MESTA

VEZIVANJA GABA RECEPTORA NA ISPOBUVANJE RAZLIČITIH PSIHEDRORALNIH

Ментор EPEKATA BENZODIAZEPINA, KOD ŽACOVA

PROF. DR. DRAGAN OBRADOVIĆ

Потписани/а JANKO SAMARDŽIĆ

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

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 10.06.2013.

Janko Samardžić

Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

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

UTICAJ NEGATIVNE MODULACIJE BENZODIAZEPINSKOG MESTA VEZIVANJA GABA-A RECEPTORA NA ISPOBJAVANJE RAZLIČITIH BIHEVIORALNIH EFEKATA BENZODIAZEPINA KOD PACOVA  
која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 10. 06. 2013.

