

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Katarina R. Savi Vujovi

Efekti opioida i antagonista NMDA  
receptora na telesnu temperaturu i akutni  
nociceptivni bol kod pacova

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2014. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Katarina R. Savi Vujovi

The effects of opioids and NMDA receptor  
antagonists on the body temperature and  
acute nociceptive pain in rats

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

**Mentor:**  
**Prof. dr Sonja Vučković ,**  
**Medicinski fakultet u Beogradu,**

**Članovi komisije:**

---

**Prof. dr Milica Prostran,**  
**Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu,**  
**predsednik komisije**

---

**Prof. dr Dragan Stokić ,**  
**Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu,**

---

**Prof. dr Miroslav Radenković ,**  
**Medicinski fakultet, Univerzitet u**  
**Beogradu**

---

**Prof. dr Dragan Milovanović ,**  
**Medicinski fakultet , Univerzitet u**  
**Kragujevcu**

---

**Doc. Maja Tomić ,**  
**Farmaceutski fakultet, Univerzitet u**  
**Beogradu**

---

## *Zahvalnica*

*Ova teza je urađena na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.*

*Sastavni je deo projekta Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja (br. 175023) pod nazivom: "Bazilna i klinička ko-farmakološka istraživanja mehanizama dejstva i interakcija lekova u nervnom i kardiovaskularnom sistemu", čiji je rukovodilac prof. dr Milica Prostran.*

*Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Milici Prostran na podršci, usmeravanju i veri u ono što radim.*

*Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr Sonji Vučković koja me je uvela u svet nauke i nesebično podelila svoja znanja sa mnom.*

*Zahvaljujem se svim laborantima koji su mi pomogli u tehničkom delu eksperimenata za tezu.*

*Zahvaljujem se svojoj porodici. Bez Vas ovo ne bi bilo moguće.*

*Zahvaljujem se mom Filipu.*

*Katarina Savić Vujović*

## **Efekti opioida i antagonista NMDA receptora na telesnu temperaturu i akutni nociceptivni bol kod pacova**

Uvod: Pored antinocicepcije, opioidi ispoljavaju značajne efekte i na telesnu temperaturu. Brojni dokazi podržavaju postojanje endogenog glutamatergičkog sistema koji modulira telesnu temperaturu preko *N*-metil-D-aspartat (NMDA) receptora. Ketamin i magnezijum, NMDA antagonisti, su poznati po svojim anestetičkim, analgetičkim i mišičkim svojstvima, kao i dejstvu protiv drhtavice. Takođe, oni mogu povećati antinociceptivne efekte opioidnih analgetika u različitim modelima bola kod životinja, kao i kod ljudi.

Cilj ispitivanja: Cilj ovog ispitivanja bilo je poređenje antinociceptivnih i hipertermičkih odgovora između dve grupe agonista  $\mu$ -opioidnih receptora: derivata fentanila (4-anilinopiperidinski tip) i morfina (fenantrenski tip) kod pacova. Takođe, ova studija imala je za cilj ispitivanje efekata ketamina i magnezijum sulfata na telesnu temperaturu i akutni nociceptivni bol kod pacova, da utvrdi tip interakcije između ova dva leka i da ispita da li magnezijum sulfat dodat ketaminu ili kombinaciji morfin-ketamin, povećava analgetički efekt ovih lekova i njihov efekt na telesnu temperaturu.

Metode: Analgetička aktivnost procenjena je testom potapanja repa mužjaka Wistar pacova (200-250 g) u toplu vodu. Distalni 5 cm repa stavljano je u toplu vodu ( $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) i kao odgovor mereno je vreme za koje životinja povuče rep iz tople vode. Telesna temperatura je merena stavljanjem termometarske sonde u dužini od 5 cm u debelo crevo.

Rezultati: Fentanil, ( $\pm$ )-cis-3-metil fentanil (CM), ( $\pm$ )-cis-3-karbometoksi fentanil, ( $\pm$ )-trans-3-karbometoksi fentanil i ( $\pm$ )-cis-3-butil-fentanil, kao i morfin, oksikodon (O), tebakon i 6,14-etenomorfinan-7-metanol, 4,5-epoksi-6-fluoro-3-hidroksi- $\alpha,\alpha,17$ -trimetil-, ( $5\alpha,7\alpha$ ) izazivali su dozno-zavisno povećanje antinocicepcije i hipertermije. Derivati morfina (fenantrenski tip) i fentanila (4-anilinopiperidinski tip) izazivali su hipertermiju kod pacova u dozama koje su oko 2 puta niže i 6-11 puta više od njihovih srednjih antinociceptivnih doza.

Magnezijum sulfat (5 i 60 mg/kg, sc) nema uticaj ni na bazalnu telesnu temperaturu, ni na morfinsku hipertermiju. Subanesteti ke doze ketamina (5-30 mg/kg), dovode do dozno-zavisnog sniženja bazalne telesne temperature, kao i morfinske hipertermije. Analizom krive doza-odgovor za efekte ketamina, kao i za kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat, utvr eno je da postoji sinergisti ka interakcija, kao i da se doza ketamina smanjuje za 5,3 puta, kada se lekovi daju u fiksnoj kombinaciji (1:1). Mala fiksna doza magnezijum sulfata (5 mg/kg) pove ava sniženje bazalne temperature izazvano ketaminom (1,25-10 mg/kg) za 2,5 puta, kao i sniženje morfinske hipertermije za 5,3 puta.

Magnezijum sulfat (2,5-60 mg/kg, s.c.) i ketamin (2,5-30 mg/kg i.p.) primenjeni sami, nemaju nikakav antinociceptivni efekt. Postoji sinergisti ka interakcija izme u ketamina (2,5, 5 i 10 mg/kg) i magnezijum sulfata (5 mg/kg) u izazivanju antinocicepcije. Tako e i ketamin i magnezijum sulfat, kao i njihova kombinacija potenciraju antinociceptivne efekte morfina (2,6 mg/kg, i.p.). Ve i efekt se postiže kada se ketamin primeni pre magnezijum sulfata.

Zaklju ak: Ovo je prvo ispitivanje kojim je pokazana razlika izme u dve klase opioidnih lekova u ja ini izazivanja hipertermije. U ovoj studiji je pokazano da magnezijum sulfat potencira analgeti ki efekt ketamina i morfin-ketamin kombinacije kod pacova u testu potapanja repa u toplu vodu, a ve i efekt se postiže kada se ketamin primeni pre magnezijum sulfata. Ovo je prva studija kojom je pokazana sinergisti ka interakcija izme u magnezijum sulfata i ketamina u snižavanju telesne temperature i antinocicepciji, kao i statisti ka potvrda iste. Mogu e je da bi sinergizam izme u ketamina i magnezijum sulfata mogao biti od klini kog zna aja.

Klju ne re i: NMDA antagonist, opioidi, telesna temperatura, akutni bol

Nau na oblast: Farmakologija

## **The effects of opioids and NMDA receptor antagonists on the body temperature and acute nociceptive pain in rats**

**Introduction:** In addition to producing antinociception, opioids exert profound effects on body temperature. A large body of evidence supports the existence of an endogenous glutamate system that tonically modulates body temperature *via* N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Ketamine and magnesium, both NMDA receptor antagonists, are known for their anesthetic, analgesic and anti-shivering properties. They also enhance the antinociceptive effects of opioid analgesics in different animal models of pain, as well as in humans.

**Aim:** This study aimed at comparing antinociceptive and hyperthermic responses between two groups of  $\mu$ -opioid receptor agonists: fentanyl (4-anilinopiperidine-type) and morphine (phenanthrene-type) derivatives in rats. Also, study is aimed at evaluating the effects of ketamine and magnesium sulphate on body temperature and acute nociceptive pain in rats, to determine the type of interaction between them and at evaluating whether magnesium sulfate added to ketamine or morphine-ketamine combination produces higher level of analgesia and higher effect on body temperature.

**Methods:** Analgesic activity was assessed by tail-immersion test in male Wistar rats (200-250 g). The distal 5 cm of the tail was immersed in a warm water bath ( $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) and the time for tail-withdrawal was measured as a response latency. The body temperature was measured by insertion of a thermometer probe 5 cm into the colon of unrestrained rats.

**Results:** Fentanyl, ( $\pm$ )cis-3-methyl fentanyl, ( $\pm$ )cis-3-carbomethoxy fentanyl, ( $\pm$ )trans-3-carbomethoxy fentanyl and ( $\pm$ )cis-3 butyl fentanyl and morphine, oxycodone, thebacon and 6,14-Ethenomorphinan-7-methanol, 4,5-epoxy-6-fluoro-3-hydroxy- $\alpha,\alpha,17$ -trimethyl-, ( $5\alpha,7\alpha$ )produced dose-dependent increase in antinociception and hyperthermia. Morphine (phenanthrene-type) and fentanyl (4-anilinopiperidine-type) derivatives produced hyperthermia in rats at doses about 2 times lower, and 6 to 11 times higher, than their median antinociceptive doses.

Magnesium sulphate (5 and 60 mg/kg, sc) showed influence neither on baseline, nor on morphine-evoked hyperthermic response. Subanesthetic doses of ketamine (5-30 mg/kg, ip) given alone, produced significant dose-dependent reduction in both baseline colonic temperature and morphine-induced hyperthermia. Analysis of the log dose–response curves for the effects of ketamine and ketamine-magnesium sulphate combination revealed synergistic interaction, and about 5.3 fold reduction in dosage of ketamine when the drugs were applied in fixed ratio (1:1) combinations. In addition, fixed low dose of magnesium sulphate (5 mg/kg, sc) enhanced the temperature lowering effect of ketamine (1.25-10 mg/kg, ip) on baseline body temperature and morphine-induced hyperthermia by factors of about 2.5 and 5.3, respectively.

Magnesium sulfate (2.5-60 mg/kg, s.c.) and ketamine (2.5-30 mg/kg, i.p.) given alone did not produce any effect on antinociception. However, there is a synergistic interaction between ketamine (2.5, 5 and 10 mg/kg) and magnesium sulfate (5 mg/kg). Also, both ketamine and magnesium sulfate, as well as their combination potentiated the antinociceptive effect of morphine (2.6 mg/kg, i.p.). The greater response was obtained when ketamine is given before magnesium sulfate.

Conclusion: This study is first to identify difference between these two classes of opioid drugs in their potencies in producing hyperthermia. This study revealed potentiation of ketamine and morphine-ketamine combination by magnesium sulfate in tail-immersion test in rats with higher activity when ketamine is given before magnesium sulfate. It is first time to demonstrate the synergistic interaction between magnesium sulphate and ketamine in lowering body temperature and in antinociception and its statistical confirmation. It is possible that the synergy between ketamine and magnesium may have clinical relevance.

Keywords: NMDA antagonist, opioids, body temperature, acute pain  
Scientific area: Pharmacology





## **SADRŽAJ:**

<b>I UVOD</b> .....	<b>1</b>
I.1. Patofiziologija bola .....	1
I.2. Opioidni analgetici .....	2
I.2.1. Opioidni receptori .....	4
I.2.2. Neželjena dejstva opioidnih analgetika.....	7
I.2.3. Uticaj opioida na telesnu temperaturu.....	8
I.3. NMDA receptori .....	8
I.3.1. Uloga NMDA receptora u nocicepciji .....	11
I.3.2. Ketamin i magnezijum u le enju bola.....	11
I.3.3. Ketamin .....	12
I.3.4. Magnezijum.....	13
I.3.5. Opioidi i antagonisti NMDA receptora u analgeziji .....	14
I.3.6. Uticaj NMDA receptora na telesnu temperaturu.....	15
I.4. Hipotalami ka regulacija telesne temperature .....	17
I.5. Uticaj razli itih sistema u regulaciji telesne temperature.....	18
I.5.1. Uticaj adrenergi kog sistema u regulaciji telesne temperature .....	18
I.5.3. Uloga gabaergergi kog sistema u regulaciji telesne temperature .....	19
I.5.4. Uloga NO u regulaciji telesne temperature .....	19
I.5.5. Uloga opioidergergi kog sistema u regulaciji telesne temperature.....	20
I.5.6. Uloga ATP senzitivnih kalijumskih kanala u regulaciji telesne temperature .....	20
<b>II CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>22</b>
<b>III MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>23</b>

III.1. Eksperimentalne životinje .....	23
III.2. Supstance korištene u eksperimentima: .....	23
III.3. Eksperimentalni protokol (1-5) .....	25
III.4. Metode .....	26
III.4.1. Test potapanja repa u toplu vodu (eng. tail-immersion test) .....	26
III.4.2. Merenje telesne temperature.....	27
III.4.3. Rotarod test.....	27
III.5. Analiza rezultata .....	28
III.5.1. Analiza dejstva analoga morfina i fentanila na antinocicepciju i telesnu temperaturu.....	28
III.5.2. Analiza efekta morfina, ketamina i magnezijum sulfata na antinocicepciju ....	29
III.5.3. Analiza efekta morfina, ketamina i magnezijum sulfata na telesnu temperaturu .....	31
III.5.4. Analiza dejstva antagonista na ketamin i na kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat .....	34
III.6. Statistička analiza .....	35
<b>IV REZULTATI .....</b>	<b>36</b>
IV.1. Uticaj derivata morfina i fentanila na antinocicepciju i telesnu temperaturu kod pacova.....	36
IV.1.1. Derivati fentanila: jačina u izazivanju antinocicepcije i hipertermije .....	36
IV.1.2. Derivati morfina: jačina u izazivanju antinocicepcije i hipertermije .....	38
IV.1.3. Veličina dejstva fentanila i morfina na telesnu temperaturu .....	40
IV.1.4. Vreme postizanja maksimalnih antinociceptivnih i hipertermnih efekta derivata fentanila i morfina i dužina trajanja.....	40

IV.1.5. Efekt naloksona na antinociceptivne i hipertermne efekte derivata fentanila i morfina .....	40
IV.2. Antinociceptivni efekt magnezijum sulfata, ketamina, morfina i njihovih kombinacija .....	44
IV.2.1. Efekt magnezijuma sulfata na antinocicepciju izazvanu morfinom.....	44
IV.2.2. Efekt ketamina na antinocicepciju izazvanu morfinom .....	45
IV.2.3. Sinergizam izme u ketamina i magnezijum sulfata u testu potapanja repa u toplu vodu .....	46
IV.2.4. Uticaj kombinacija ketamin-magnezijum sulfati magnezijum sulfat-ketamin na antinocicepciju izazvanu morfinom u testu potapanja repa u toplu vodu .....	49
IV.2.5. Dejstvo naloksona na kombinaciju morfin-ketamin-magnezijum sulfat .....	52
IV.2.6. Dejstvo kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat na motornu spretnost pacova.....	54
IV.3. Efekt magnezijum sulfata, ketamina, morfina i njihovih kombinacija na telesnu temperaturu pacova.....	55
IV.3.1. Efekt magnezijum sulfata na bazalnu temperaturu i na morfinsku hipertermiju .....	55
IV.3.2. Efekt ketamina na bazalnu temperaturu .....	56
IV.3.3. Efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat na telesnu temperaturu pacova .....	58
IV.3.4. Efekti ketamina i magnezijum sulfata na morfinsku hipertermiju .....	64
IV.3.5. Nalokson antagonizuje dejstvo morfina i kombinacije morfin-ketamin i morfin-ketamin-magnezijum sulfat na telesnu temperaturu kod pacova .....	69
IV.4. Mehanizam hipotermnog dejstva kombinacije ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg), rezultati .....	71

IV.4.1. Dejstvo johimbina na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	71
IV.4.2. Dejstvo metizergida na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	73
IV.4.3. Dejstvo bikukulina na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	74
IV.4.4. Dejstvo L-arginina na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	76
IV.4.5. Dejstvo L-NAME na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	77
IV.4.6. Dejstvo naloksona na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	78
IV.4.7. Dejstvo glibenklamida na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg) .....	80
IV.5. Mehanizam hipotermnog dejstva ketamina (10 mg/kg).....	81
IV.5.1. Dejstvo johimbina na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg) .....	81
IV.5.2. Dejstvo metizergida na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg).....	82
IV.5.3. Dejstvo bikukulina na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg).....	84
IV.5.4. Dejstvo L-arginina na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg).....	85
IV.5.5. Dejstvo L-NAME na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg) .....	86
IV.5.6. Dejstvo naloksona na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg) .....	87
IV.5.7. Dejstvo glibenklamida na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg).....	88
<b>V DISKUSIJA .....</b>	<b>89</b>
V.1. Uticaj derivata morfina i fentanila na antinocicepciju i telesnu temperaturu kod pacova.....	89

V.2. Antinociceptivni efekt magnezijum sulfata, ketamina, morfina i njihovih kombinacija .....	91
V.3. Efekt magnezijum sulfata, ketamina, morfina i njihovih kombinacija na telesnu temperaturu pacova.....	95
V.4. Mehanizam hipotermnog dejstva ketamina (10 mg/kg)/kombinacije ketamin-magnezijum sulfat .....	100
V.4.1. Dejstvo johimbina na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	101
V.4.2. Dejstvo bikukulina na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	103
V.4.3. Dejstvo metizergida na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	104
V.4.4. Dejstvo L-arginina i L-NAME na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	106
V.4.5. Dejstvo naloksona na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	108
V.4.6. Dejstvo glibenklamida na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg).....	110
<b>VI ZAKLJU CI .....</b>	<b>112</b>
<b>VII LITERATURA .....</b>	<b>115</b>

## I UVOD

Bol se definiše kao neprijatan osećaj i emocionalno iskustvo izazvano stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (IASP – International Association for Study of Pain). Najčešći je simptom koji pacijenta dovodi do lekara. Prema mehanizmu nastanka bol može biti nociceptivni i neuropatski (Vučković i sar., 2012). Nociceptivni bol je posledica aktivnosti nervnog sistema kojom se mozak upozorava da na organizam deluju ugrožavajući i bolni stimulus (noksia). Noksije mogu biti mehaničke, termičke i hemijske, a sa aspekta terapije bola najvažnije su hemijske noksije, koje se oslobađaju iz ishemijskih ili povrednog tkiva (u procesu zapaljenja). Noksije deluju na specifične receptore za bol (nociceptore), ogođjene nervne završetke primarnih senzornih neurona, i prouzrokuju stvaranje bolnih impulsa. Nociceptivni bol može biti somatski i visceralni (Vučković i sar., 2012).

### I.1. Patofiziologija bola

Oštećenje tkiva uzrokuje doživljaj bola u sadejstvu četiri fiziološka procesa: transdukcija, transmisija, percepcija i modulacija (Berry i sar., 2006). Transdukcija je proces konverzije mehaničke, termičke ili hemijske energije bolne draži u električnu energiju receptora za bol (Willis, 1985). Nociceptori su u vidu slobodnih nervnih završetaka, ne ispoljavaju spontanu aktivnost, ali za razliku od drugih receptora, podležu senzitivizaciji. Transmisijom bola se označava proces prenosa generisanih akcionih potencijala iz nociceptora u kičmenu moždinu i mozak (Warren i sar., 2002).

Percepcija bola je neprijatan osećaj u određenom delu tela prouzročen pretežno negativnim emocijama (Merskey i Bugduk, 1994). Nociceptivne draži prenete neospinalnim putem preko ventroposterolateralnih i ventroposteromedijalnih talamičkih jedara završavaju se u kontralateralnom primarnom somatosenzornom korteksu, gde se nadražaj somatotopski mapira, te se određuje mesto, intenzitet i kvalitet bola.

Nociceptivne draži prenete spinoretikularnim, spinomezencefalnim i spinohipotalami kim putem završavaju se u limbi kom sistemu, insularnom i frontalnom korteksu i posreduju u nastanku afektivnog doživljaja bola (Wallace, 1992). Modulacijom bola označavamo descendntnu kontrolu nociceptivne transmisije koja se ostvaruje inhibitornim dejstvom descendntnih puteva iz somatosenzorne, frontalne i limbi ke kore, kao i iz periventrikularnih jedara hipotalamusa, periakveduktalne sive mase i *nuclei raphe* na neurone zadnjih rogova ki mene moždine. Patofiziološka klasifikacija definiše postojanje nociceptivnog i neuropatskog bola (Warren i sar., 2002; Wallace, 1992). Nociceptivni bol je uzrokovan aktivacijom perifernih A i C-nociceptivnih receptora pod dejstvom štetnih draži (povreda, bolest, inflamacija) i predstavlja normalni biološki odgovor, signal narušenog telesnog, anatomskog ili funkcionalnog integriteta. Lokalni mehanizmi u nastanku nociceptivnog bola podrazumevaju hiperekscitabilnost nociceptora pri svakom dejstvu mehani ke, termi ke, hemijske ili neke druge štetne draži, što odgovara perifernoj senzitivizaciji uzrokovanj pojaanom ekspresijom jonskih kanala za natrijum u perifernim završecima nociceptora.

U odnosu na dužinu trajanja, bol može biti akutan i hroni an.

## **I.2. Opioidni analgetici**

Opioidni analgetici su lekovi koji se koriste u terapiji: jakih akutnih bolova (npr. opekotine, trauma, infarkt miokarda, hirurške intervencije i druge bolne procedure), umerenih do jakih bolova malignog porekla, umerenih do jakih hroni nih nemalignih bolova organskog porekla, jakih neuropatskih bolova. Opioidni analgetici se koriste neposredno pre ili za vreme anestezije jer smanjuju potrebe za drugim lekovima tokom anestezije, a mogu se koristiti i u velikim dozama kao samostalni anestetici za kardiovaskularne operacije. Tako e, koriste se za otklanjanje postoperativnog bola (Vu kovi , 2012).

Predstavnik grupe jakih opioidnih analgetika je morfin. Morfin je 1806. godine izolovan kao najvažniji aktivni sastojak opijuma. Psihotropni efekti samog opijuma pominjani su još u starom veku, kada se verovatno koristio u ritualne svrhe i kao analgetik



(Lehmann, 1997). Mada se morfin može dobiti i sintetskim putem u laboratoriji, on se i dalje dominantno proizvodi iz opijuma, zasecanjem nezrelih kora maka, jer čini 10% od njegove ukupne mase. U svom molekulu morfin ima dve hidroksilne grupe i njihovom supstitucijom dobijaju se različiti polusintetski derivati morfina.

Fentanil je sintetski opioidni analgetik sa brzim početkom i kratkim trajanjem dejstva. On je agonist  $\mu$ -opioidnog receptora. Analgetičko dejstvo fentanila se najviše u delom ostvaruje stimulacijom supraspinalnih opioidnih receptora (Miaskowski i sar., 2005). Koristi se u anesteziji u preoperativnoj proceduri, u terapiji probojnog bola. Fentanil je oko 100 puta potentniji od morfina: 100 mikrograma fentanila je aproksimativno ekvivalentno sa 10 mg morfina (Vučković i sar., 2009).

### I.2.1. Opioidni receptori

Dejstvo jakih opioidnih analgetika zasniva se na njihovoj sposobnosti da se vežu za opioidni receptor, da ga aktiviraju i pokrenu niz reakcija koje dovode do farmakološkog efekta tj. analgezije. Opioidni receptori ( $\mu$ , kappa, delta) su membranski receptori vezani za G-protein. Po IUPHAR klasifikaciji postoje tri vrste opioidnih receptora i to MOP, DOP i KOP (Dietis i sar., 2011).

Prema farmakološkom podtipu, opioidni receptori su podeljeni na  $\mu$  ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$  i  $\mu_3$ ), delta ( $\delta_1$  i  $\delta_2$ ) i kapa ( $\kappa_1a$ ,  $\kappa_1b$ ,  $\kappa_2a$ ,  $\kappa_2b$  i  $\kappa_3$ ). Podela opioidnih receptora, kao i njihova distribucija i funkcija prikazana je u tabeli 1. Pre nekoliko decenija su rađene studije vezivanja i farmakološke studije podtipova opioidnih receptora. Međutim, kako eliminacija jednog jedinog gena koji kodira  $\mu$ -opioidne receptore dovodi do prestanka funkcije  $\mu$ -receptora (kako analgezije, tako i depresije disanja), dalje podklasifikovanje primarnih tipova opioidnih receptora nema smisla (Dietis i sar., 2011). Dalja ispitivanja eliminacije gena kod miševa ukazuju na to da su različiti efekti agonista  $\mu$ -opioidnih receptora posredovani posebnim intracelularnim signalnim putevima (Davis, 2012). Standardni agonisti i antagonisti aktiviraju ili inaktiviraju celokupnu mrežu prenošenja signala receptora. Međutim, „pristrasni” ligandi selektivno aktiviraju neke signale, izbegavaju i, ili inaktiviraju i druge signale posredovane istim receptorom (Rives i sar., 2012; Rivero i sar., 2012; Nozaki i sar., 2012; Pradhan i sar., 2012). Na primer, morfin preaktivira puteve posredovane beta-arestinom 2 *in vivo*, dok fentanil i metadon mogu da aktiviraju prenošenje signala posredovano i beta-arestinom 1 i beta-arestinom 2 (Groer i sar., 2011).

Tabela 1. Podela, distribucija i funkcija opioidnih receptora

Farmakološki podtip	Broj gena	IUPHAR klasifikacija	Rasprostranjenost	Mogući diskriminatorni ligand	Drugi relevantni ligandi	Funkcija/efekt
$\mu_1$	jedan	MOP	Mozak, ki mena moždina, periferija	Naloksonazine (antagonist)	Morfin (agonist), TRIMU-5 (antagonist), b-FNA (antagonist), Dihidromorfin (agonist), Nalokson (antagonist), Nalorfin (antagonist), Kodein (agonist), Oksikodon (agonist)	Analgezija
$\mu_2$		MOP	Mozak, ki mena moždina, periferija	TRIMU-5 (agonist), M6G (agonist)	Morfin (agonist), nalokson (antagonist), Dihidromorfin (agonist), b-FNA (antagonist), M6G (agonist), heroin (agonist), Naloksonazin (antagonist)	Analgezija, GI trakt, respiratorna depresija, svrab
$\mu_3$		MOP	Imune elije, amigdala, periferne neuralne, CV endotelne elije	Nesenzitivnost opioidnog peptida	Morfin (agonist), nalokson (antagonist), dihidromorfin (agonist), b-FNA (antagonist), M6G (agonist)	Različite funkcije koje uključuju oslobađanje NO
$\sigma_1$	jedan	DOP	Mozak, periferija	DPDPE (agonist), BNTX (antagonist), DALCE (antagonist)	Enkefalin (agonist), deltorfin-D (agonist), naltrekson (antagonist)	Analgezija, kardioprotekcija

$\sigma_2$		DOP	Mozak i ki ma	Deltorfin-II (agonist), DSLET (agonist) 5-NTII (antagonist), Naltriben (antagonist)	Enkefalin (agonist), deltorfin-D (agonist), naltrekson (antagonist), deltorfin-II (agonist)	Analgezija, kardioprotekcija, termoregulacija
$\kappa_1a$	jedan	KOP	Mozak ( <i>nucleus accumbens</i> , <i>neocortex</i> , <i>cerebellum</i> )	Dinofin A (agonist), U50,488H (agonist)	nor-BNI (antagonist), U69,593 (agonist)	Analgezija, hranjenje
$\kappa_1b$		KOP		Dinorfin B (agonist), a-neoendorfin (agonist)		
$\kappa_2a$		KOP	Mozak (hipokampus, talamus, moždano stablo)		nor-BNI (antagonist), bremazocin (agonist)	Analgezija, diureza, neuroendokrina funkcija
$\kappa_2b$		KOP		Leu-enkefalin (antagonist), oksikodon (agonist)	Nalorfin (agonist), nor-BNI (antagonist)	
$\kappa_3$		KOP	Mozak	NalBzOH		Spinalna analgezija, periferni efekti

Preuzeto iz: Dietis i sar., 2011

Opioidni analgetici se vezuju za presinapti ke opioidne receptore na centralnim nastavcima primarnih aferentnih neurona i smanjuju osloba anje neurotransmitera u sinapsama u zadnjim rogovima ki mene moždina (Schumacher i sar., 2005). Sa druge strane, svojim dejstvom na postsinapti ke receptore na neuronima zadnjih rogova ki mene moždine, inhibišu postsinapti ki neuron i transmisiju bolnog nadražaja. Osim u ki menoj moždini, opioidni receptori nalaze se i na supraspinalnim mestima, u oblastima mozga koje u estvuju u procesu transmisije i modulacije bolnog nadražaja (periakveduktalna siva masa, *locus coeruleus*, *nucleus raphe magnus*) (Stannard i Booth, 2004). Vezivanje opioida za

ove receptore pojačava aktivnost u descendnim inhibitorynim putevima mozga. Opisani su i periferni opioidni receptori koji se nalaze van centralnog nervnog sistema i koji se aktiviraju u području inflamacije. Vezivanje opioida za ove receptore inhibira proces transdukcije bolnog nadražaja.

### **I.2.2. Neželjena dejstva opioidnih analgetika**

Najveći broj opioidnih analgetika, koji je danas u klinici primenjen, relativno je selektivan za  $\mu$  opioidne receptore (agonisti) i ispoljava farmakološki profil sličan morfinu. To su najjači analgetici uopšte. Za razliku od neopiodnih analgetika, kao i slabih opioidnih analgetika, jaki opioidni analgetici nemaju gornju granicu efikasnosti tj. mogu da otklone i najjače bolove. Njihova efikasnost limitirana je samo pojavom neželjenih dejstava, pre svega depresijom disanja. Agonisti-antagonisti (agonisti  $\kappa$  - antagonisti  $\mu$ ) manje su efikasni u odnosu na  $\mu$  agoniste. U analgetičkim dozama mogu da izazovu jaku sedaciju, psihomimetske efekte (npr. halucinacije, noćne more i anksioznost), pokazuju nešto manju sklonost ka razvoju tolerancije i zavisnosti od  $\mu$  agonista i izazivaju depresiju disanja (Vučković, 2012).

Opioidni analgetici ispoljavaju veliki broj neželjenih efekata. Najčešća neželjena dejstva su mučnina i povraćanje, opstipacija, suvoća usta, spazam žučnih puteva; veće doze mogu da izazovu rigiditet mišića, hipotenziju, kao i depresiju disanja. Ostala, raredija neželjena dejstva su bradikardija, tahikardija, palpitacije, edemi, posturalna hipotenzija, halucinacije, vertigo, euforija, disforija, zavisnost, vrtoglavica, konfuzija, pospanost, poremećaj spavanja, glavobolja, seksualna disfunkcija, otežano mokrenje, retencija urina, spazam uretera, mioza, poremećaj vida, znojenje, crvenilo kože, ospica, urtikarija i svrab (Vučković, 2012).

Upravo zbog velikog broja neželjenih dejstava, sve je češća kombinacija opioida sa drugim lekovima, npr. sa NMDA antagonistima, gde kombinujemo manje doze svakog od pojedinačno uzetog leka i time povećavamo efikasnost i smanjujemo neželjena dejstva.

### **I.2.3. Uticaj opioida na telesnu temperaturu**

Endogeni opioidni peptidi i opioidni lekovi uti u na mnoge fiziološke procese, uklju uju i analgeziju, neuroendokrinu funkciju, unos hrane i regulaciju telesne temperature.  $\mu$ -opioidi imaju ulogu i u kontroli procesa neuroinflamacije (Benamar i sar., 2007). Lipopolisaharidi i endogeni pirogeni (osim IL-1beta i prostaglandina), preko opioidnog sistema, mogu da izazovu groznicu (Fraga i sar., 2008). Pokazalo se da su efekti opioidnih lekova na telesnu temperaturu složeni i da zavise od mnogih faktora (vrste, soja, starosti životinje; doze, puta primene leka; specifi nosti receptora kao i od temperature okoline) (Adler i Geller, 1989; Vu kovi i sar., 1998; Rawls i Benamar, 2011). Me utim, smatra se da su najzna ajniji, selektivnost jedinjenja prema opioidnom receptoru i primenjena doza. Kod pacova i miševa, manje doze centralno ili sistemski primenjenog morfina i drugih opioidnih analgetika izazivaju hipertermiju, a ve e doze dovode do hipotermije pri standardnoj temperaturi okoline (Chen i sar., 2005). Mada se pretpostavlja da svi agonisti  $\mu$ -opioidnih receptora izazivaju sli an efekt na telesnu temperaturu, neki podaci su opre ni. U ispitivanju Bakera i Meerta (2002), intraperitonealno (ip) primenjen morfin izazvao je hipertermiju kod miševa, dok ona nije bila prime ena prilikom primene fentanila, koji je daleko selektivniji od morfina za  $\mu$ -opioidne receptore. U nekim ispitivanjima na glodarima, fentanil je izazvao zna ajnu hipertermiju (Vu kovi i sar., 1998; Cao i Morison, 2005).

Do sada nije ura eno nijedno ispitivanje u kome je pore ena razlika izme u strukturno razli itih serija  $\mu$  agonista i njihovih efekta na telesnu temperaturu. Osim toga, niko nije direkno poredio hipertermi ki odgovor sa antinocicepcijom.

### **I.3. NMDA receptori**

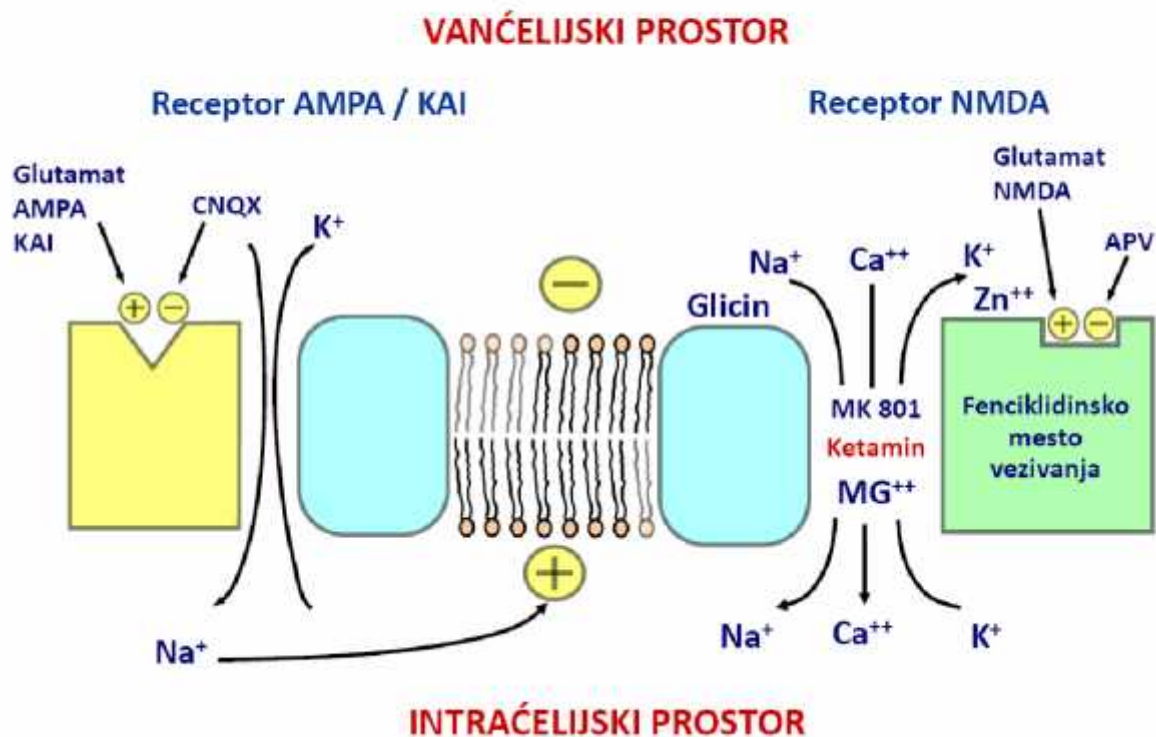
Jonotropni glutamatni receptori, kojih ima najmanje tri podtipa, farmakološki su izdvojeni na osnovu specifi nog vezivanja N-metil-D-aspartata (NMDA receptori), kainatne kiseline (kainatni receptori, KAI) i alfa-amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazola

(AMPA receptori). Oni spadaju u grupu voltažno zavisnih i voltažno nezavisnih receptora. Njima se reguliše protok jona kalcijuma, natrijuma i kalijuma. Kainatni i AMPA receptori ine grupu ne-NMDA receptora. Preko njih se ostvaruje brza ekscitatorna transmisija u sinapsama, koja je primarno vezana za voltažno-nezavisne kanale. Ovde se depolarizacija ostvaruje prvenstveno influksom jona natrijuma (Jelenkovi i sar., 2002).

Od svih jonotropnih receptora najbolje je izu en NMDA receptor, koji predstavlja deo NMDA receptorsko-kanalskog kompleksa. Aktivnost ovog kompleksa regulišu etiri vezna mesta, od kojih su neka smeštena u samom kanalu (Davidson i Carlton, 1998). U prostim moždanim sinapsama NMDA receptori obi no koegzistuju ili sa AMPA ili sa kainatnim receptorima. Na funkciju NMDA receptorskog kompleksa od svih jona najznačajniji uticaj imaju joni magnezijuma i cinka. U stanju mirovanja joni magnezijuma vrše fiziološku blokadu NMDA receptora. Da bi se oni odstranili time omogu ilo da NMDA receptori doprinesu elektri nom odgovoru elije, neophodna je depolarizacija postsinapti ke membrane, koja zavisi od AMPA/KA aktivacije i/ili drugih modulatornih postsinapti kih signala. Depolarizacija i aktivacija NMDA receptora dovode do relativno spororastu ih, dugotrajnih jonskih struja koje se primarno ostvaruju preko protoka jona kalcijuma (Michaelis, 1998).

Pored glutamata ili NMDA, aktivnost NMDA receptora kontrolišu i druga regulacijska mesta. Jedno od njih je vezno mesto za glicin koji se ponaša kao koagonist, dovode i do pove avanja frekvencije otvaranja kanala. Stoga bi lekovi koji blokiraju ovo mesto (nekompetitivni antagonisti NMDA receptora– kinurenska kiselina) mogli da smanje efekte NMDA agonista. U samom kanalu NMDA receptorskog kompleksa postoji tzv. fenciklidinsko mesto za koje se razli itim afinitetom vezuju jedinjenja koja ine grupu nekompetitivnih antagonista NMDA receptora. U njih spadaju fenciklidin (PCP), dizocilpin (MK801), ketamin i drugi. Fenciklidin i MK-801 imaju visoki afinitet za ovo vezno mesto, a memantin, dekstrorfan i dekstrometorfan nizak (Wei i Petrovaara, 1999) (Slika I.3).

# NMDA receptor



Slika I.3. NMDA receptor. U stanju mirovanja jonski kanal NMDA receptora blokira magnezijum. Usled depolarizacije elijske membrane dolazi do istiskivanja magnezijuma i ulaska jona natrijuma i kalcijuma u eliju.

AMPA- alfa-amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazol

KAI- kainatna kiselina

NMDA- N-metil-D-aspartat

CNQX- (6-ciano-7-nitrokvinoxaline-2,3-dion) - kompetitivni antagonist AMPA/kainatog receptora

APV- (2R)-amino-5-fosfonovaleri na kiselina; (2R)-amino-5-fosfonopentanoat)-selektivni kompetitivni antagonist NMDA receptora



### **I.3.1. Uloga NMDA receptora u nocicepciji**

Mnogi eksperimenti potvrdili su pretpostavku da stimulacija NMDA i ne-NMDA receptora dovodi do nastanka i održavanja bola. Mnogi od njih pokazuju da u tim procesima ključno mesto zauzimaju NMDA receptori u ganglionima zadnjih korenova kičmene moždine i u pojedinim delovima mozga, u kojima su oni veoma zastupljeni, kako pre-, tako i postsinaptički. Svojim ascendentnim i descendentnim aktivnostima ovi receptori modulišu prenošenje nociceptivnih stimulusa sa periferije (Wei i Petrovaara, 1999). Naime, nociceptivni impulsi koji se prenose u kičmenu moždinu nemijelinizovanim C vlaknima i mijelinizovanim A vlaknima dovode do oslobađanja glutamata u kičmenoj moždini i do pojave bola. Međutim, utvrđeno je da su u patogenezi bola od značaja i NMDA receptori lokalizovani na perifernim nervnim završecima. Tako su, na primer, Davidson i saradnici (1998) utvrdili da je prethodno davanje ketamina, memantina i deksmetorfana uspešno suzbijalo efekte intraplantarne primenjenog formalina. U drugom eksperimentu ustanovljeno je da agonisti NMDA, AMPA i kainatnih receptora aplikovani na kožu, izazivaju alodiniju i mehaničku hiperalgeziju (Davidson i Carlton, 1998). Dodatnu potvrdu za svoje pretpostavke isti autori dobili su primenom antagonista ovih receptora i posledičnim smanjenjem mehaničke hiperalgezije izazvane agonistima. Osim ovoga, stimulacija zubne pulpe dovodi do aktiviranja jonotropnih receptora na periferiji i time doprinosi oslobađanju vazoaktivnih peptida koji učestvuju u inflamaciji (Jackson i Hargreaves, 1999).

### **I.3.2. Ketamin i magnezijum u lečenju bola**

Eksperimentalna istraživanja nedvosmisleno su utvrdila da su jonotropni receptori od neprocenjivog značaja u patogenezi bola. Na osnovu ovih istraživanja, rađena su klinička ispitivanja analgetičkih efekata pojedinih antagonista NMDA receptorskog kompleksa. U brojnim studijama ispitivan je njihov efekat u terapiji bola različite etiologije: neuropatski (Maurset i sar., 1989) i ishemijski bol (Stannad i Porter, 1993). Ipak, pored toga što rezultati još nisu usaglašeni, pojedini nalazi ohrabruju i upućuju na potrebu daljih istraživanja u istom

smeru. Od velikog broja ponu enih antagonista jonotropnih receptora u klini kim ispitivanjima bola naj eš e se koriste ketamin, dekstrometorfan (antitusik sa svojstvima antagonista NMDA receptora), memantin i amantadin.

### **I.3.3. Ketamin**

Ketamin je antagonist NMDA receptora, pogodan za klini ku upotrebu. Vezuje se za fenciklidinsko mesto u kanalu, kada je kanal otvoren (Øye, 1998) ili se može vezati za membransko mesto preko koga smanjuje frekvencu otvaranja kanala (Orser i sar., 1997a). Ketamin je disocijativni anestetik koji ima analgeti ka dejstva u subanesteti kim dozama (Persson, 2010). Kako ispoljava mali rizik za nastanak kardiorespiratorne depresije, odli an je lek za terapiju bola kod trauma (Hirota i Lambert, 2011). Me utim, neželjena dejstva ketamina nastaju ve u terapijskim dozama i to su sedacija, poreme aj motorike, konfuzija, halucinacije i dr. Ketamin spre ava nastanak hiperalgezije i tolerancije izazvane opioidima i smanjuje potrebu za opioidima, a time i nastanak neželjenih dejstava (Laulin i sar., 2002; McCartney i sar., 2004; Bell i sar., 2006; Campos i sar., 2006; Holtman i sar., 2008; Carstensen and Møller, 2010; Hales i sar., 2011).

Farmakološki profil dejstava ketamina ne može se objasniti samo jednim mehanizmom. Analgeti ko, anesteti ko i simpatikomimetsko dejstvo se ostvaruje antagonizmom NMDA receptora. Isti je mehanizam za neuroprotektivno dejstvo. Ketamin poseduje analgeti ka svojstva koja su posledica njegovih interakcija sa kalcijumskim i natrijumskim kanalima, dopaminskim, ali i sa opioidnim receptorima, kao i sa ponovnim preuzimanjem noradrenalina i serotonina. Tako e ketamin uti e na holineri ku transmisiju. Uvo enje u anesteziju, kao i nastanak halucinacija mogu se pripisti inhibiciji centralne i periferne holineri ke transmisije. Ima i antiinflamatorna svojstva (Hirota i Lambert, 1996).

Simpatomimeti ka svojstva ostvaruje preko pove anja centralne i periferne monoaminergi ke transmisije. Ketamin ima ulogu i u neuromuskularnoj transmisiji (Adams, 1998). Ketamin ima efekt na voltažno zavisne transmembranske jonske kanale,

receptore vezane za G-protein, transmitere kao i NO-cGMP sistem u neuronima (Kress, 1997).

#### **I.3.4. Magnezijum**

Magnezijum je fiziološki nekompetitivni N-metil-*D*-aspartat (NMDA) antagonist koji blokira jonski kanal na dozno-zavisno na in (Na i sar., 2011). Nema mnogo dokaza da magnezijum, kada se primeni sam, ispoljava analgetsko dejstvo (Rondón i sar., 2010; Borazan i 2012; Yousef i Al-Deeb, 2013). Pokazano je da magnezijum može da poveća analgeziju izazvanu opioidima, opštim i lokalnim anestetima u različitim modelima bola (Gupta i sar., 2011; Nechifor i sar., 2011). Veliki broj studija ispitivao je efekte magnezijuma kao adjuvantnog analgetika za postoperativni bol i dobijeni su oprečni rezultati. Na osnovu pregleda rezultata 14 studija, zaključeno je da nema ubedljivih dokaza da magnezijum može smanjiti postoperativni bol (Lysakowski i sar., 2007). Brojna nova randomizirana kontrolisana klinička ispitivanja pokazala su da magnezijum ipak smanjuje postoperativni bol, kao i potrebu za analgeticima nakon operacije (Herroeder i sar., 2011; Nechifor i sar., 2011).

Postoji nekoliko teorija vezanih za mehanizam dejstva magnezijuma, kako u perifernim tkivima, tako i u centralnom nervnom sistemu (Murck, 2002; Siwek i sar., 2005; Soave i sar., 2009). Svoje efekte u centralnom nervnom sistemu ostvaruje posredstvom glutamatergičkog neurotransmiterskog sistema i to blokiranjem NMDA receptora, potenciranjem GABA-ergičke transmisije, a pri tome su ova dva neurotransmiterska sistema od izuzetnog značaja u regulaciji aktivnosti integrativnih funkcija CNS-a. Pokazano je da magnezijum blokira kalcijumove kanale vezane za NMDA receptore, pa se smatra da je to ključni mehanizam preko koga ostvaruje svoje centralne efekte (Siwek i sar., 2005; Decollogne i sar., 1997). Pokazano je da magnezijum smanjuje aktivnost ne samo NMDA receptora, već takođe redukuje aktivnost presinaptičkih i postsinaptičkih kalcijumskih kanala, modulira oslobađanje neurotransmitera. Ispoljava modulatorno dejstvo na natrijumske i kalijumske kanale, i tako može da utiče na membranski potencijal (Herroeder i sar., 2011).

U perifernim strukturama magnezijum utiče na  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -azu, ali i na funkciju kalcijum zavisne protein kinaze C (Murck, 2002). Magnezijum inhibira oslobađanje acetilholina (Ishizaki i sar., 1999). Magnezijum ima uticaj i na sve komponente osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda. Sistemska primena magnezijuma ispoljava miorelaksantni efekt, ima antiaritmjsko delovanje i pospešuje dilataciju koronarnih i perifernih krvnih sudova, a deluje i kao modulator dejstva kateholamina u centralnom i perifernom nervnom sistemu (Iannello i Belfiore, 2001).

Literaturni podaci ukazuju na to da ketamin i magnezijum mogu stupati u interakciju i to na aditivnu, supraaditivnu i antagonističku na inu izazivanju analgezije ili anestezije (Harrison i Simmonds, 1985; MacDonald i sar., 1991; Irifune i sar., 1992; Liu i sar., 2001; Orser i sar., 1997b; Queiroz-Castro i sar., 2006; DeRossi i sar., 2012).

### **I.3.5. Opioidi i antagonisti NMDA receptora u analgeziji**

Poznato je da N-metil-D-aspartat (NMDA) receptori imaju ulogu u akutnom antinociceptivnom efektu morfina. Pretretman ili koadministracija NMDA antagonista može povećati antinociceptivni efekt morfina u različitim modelima termalne nocicepcije kod životinja (Allen i Dykstra, 2003; Nemmani i sar., 2004; Fischer i sar., 2005; Grisel i sar., 2005). Takođe je poznato da NMDA antagonisti mogu povećati morfinom izazvanu analgeziju kod ljudi pod određenim uslovima (Javery et al., 1996; Bossard et al., 2002). Manje je poznato da NMDA antagonisti mogu povećati antinociceptivne efekte slabije efikasne opioida. Jedan od dokaza je i studija koja pokazuje da kompetitivni NMDA antagonist LY235959 može povećati antinociceptivnu aktivnost buprenorfina i butorfanola kod majmuna (Allen i sar., 2003). Na ovaj način bi možda mogli povećati kliničku efikasnost slabih opioida. Ovi podaci ukazuju i na to da NMDA receptorski sistem učestvuje u opioidnoj antinocicepciji, ali nije utvrđeno o kojoj interakciji se radi, da li je to prosta aditivnost ili neka druga vrsta interakcije (Fischer i Dykstra, 2006).

Poslednjih godina došlo je do značajnog napretka u razumevanju interakcije između ekscitatornih amino kiselina (EAK) i opioida. Došlo se do saznanja da glutamat koji se u kičmenoj moždini oslobodi pod dejstvom nociceptivnih stimulusa, smanjuje osetljivost

opioidnih receptora na dejstva opioidnih agonista (Bennett, 2000). Sugerirše se da se analgeti ki efekti NMDA antagonista jednim delom ostvaruju usled aktivacije endogenih opioida mozga (Forman, 1999). Pored ovoga, u *in vitro* uslovima ustanovljeno je da neki opioidni agonisti (metadon, ketobemidon, dekstropropoksifen) imaju izvesna, doduše slaba, svojstva antagonista NMDA receptora (Ebert i sar., 1998). Na mogu u povezanost opioida i EAK ukazuje i kolokalizacija receptora za EAK i opioidnih receptora na postsinapti koj membrani, kao, na primer, u neuronima periakveduktne sive mase (Commons i sar., 1999). Sve je više pokazatelja da se dobri analgeti ki efekti u bolu razli ite etiologije postižu istovremenom primenom antagonista NMDA receptora sa drugim lekovima, u prvom redu sa opioidima, pri emu doza opioida ostaje ista ili se, ak, smanjuje, ime se redukuju i neželjeni efekti analgetika (Adriaenssens i sar., 1999). Dokaza ima mnogo. U jednoj studiji kombinacija morfina i ketamina sa uspehom je suzbijala bol nakon operacije (Suzuki i sar., 1999). Drugo ispitivanje obuhvatilo je 140 bolesnika kod kojih su hirurški zahvati obavljani ambulantno. Utvr eno je da su analgeti ki efekti morfina potencirani malim dozama ketamina (Mercadante i sar., 1995). U le enju jednog bolesnika sa kancerskim neuropatskim bolom koji nije adekvatno reagovao na ogromne doze morfina (pet grama dnevno), koadministracijom opioida i ketamina postignuti su izvanredni analgeti ki efekti uz smanjenje potrebe za opioidima (Eisenberg i sar., 1998). Uspeh je nastao usled sinergisti kog efekta ketamina i opioida. Ako kombinacije opioida i ketamina i dalje budu dobijale sli ne potvrde, to bi moglo da zna i dobar napredak u terapiji bola. Pored ketamina, ispituje se i uticaj drugih antagonista NMDA receptorskog kompleksa u le enju bola.

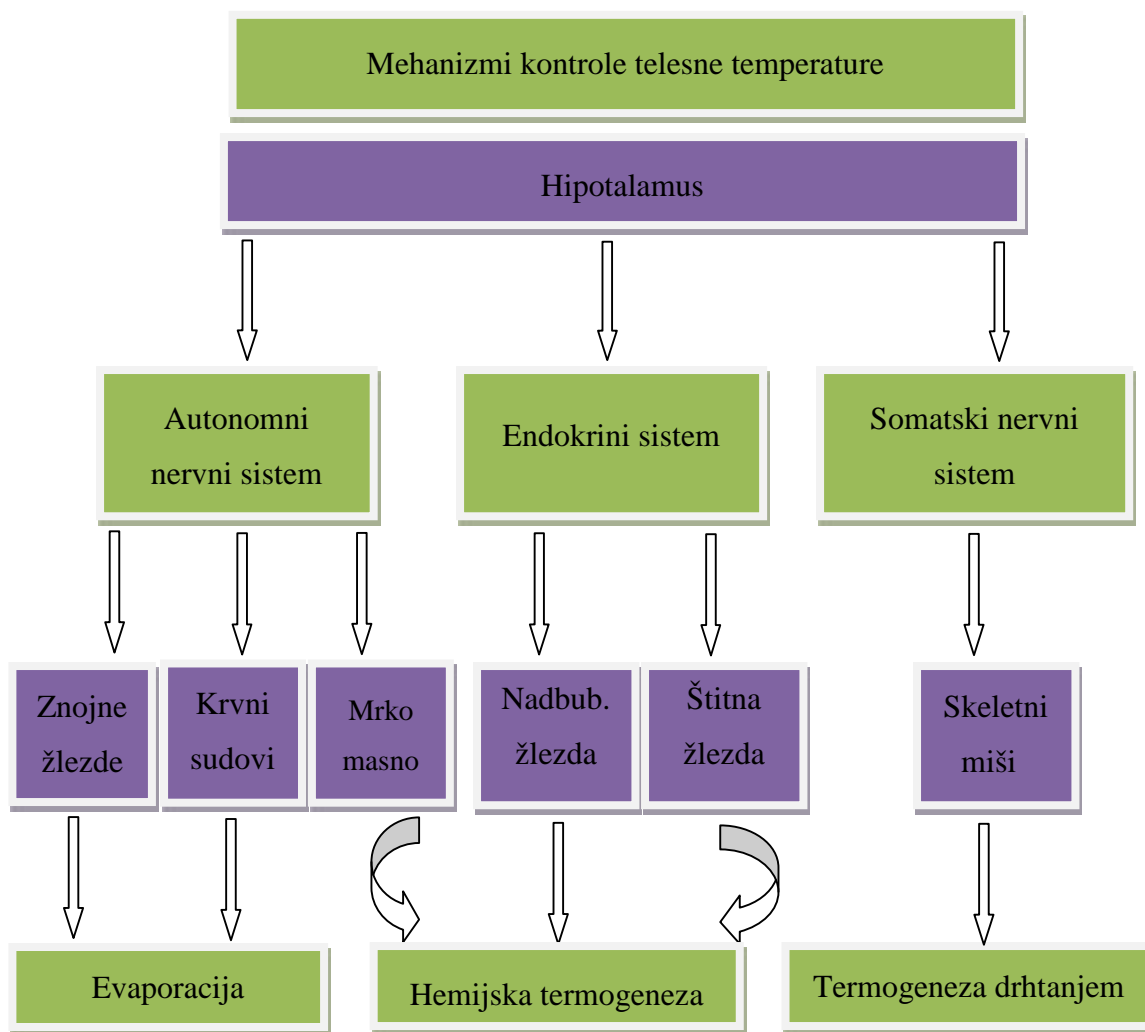
### **I.3.6. Uticaj NMDA receptora na telesnu temperaturu**

N-metil-*D*-aspartat (NMDA) receptori su ligand-zavisni jonski kanali koji regulišu fiziološke procese kao što su u enje i memorija, transmisija bola, ali imaju ulogu i u nastanku hroni nog bola, šizofrenije i neurodegenerativnih bolesti kao što su moždani udar i depresija. Pored toga, imaju ulogu u termoregulaciji (Kao i sar., 2007; Ogden i Traynelis, 2011; Murck, 2013).

Zna ajan broj studija ukazuje da antagonisti NMDA receptora mogu da izazovu hipotermiju ili pomažu održavanje hipotermije spre avaju i kompenzatorne termoregulacione mehanizme (Rawls i sar., 2002; Nisijima i sar., 2012). NMDA receptori su povezani sa termosenzitivnim neuronima u hipotalamusu i sa endogenim glutamatergi kim sistemom koji toni ki modulira telesnu temperaturu preko ovih receptora (Kao i sar., 2007). Glutamat ima važnu ulogu i u hipertermiji izazvanoj morfinom (Rawls i sar., 2003 ). Ketamin je antagonist NMDA receptora. Vezuje se za fenciklidinsko mesto u kanalu, kada je kanal otvoren (Oye, 1998; Quibell i sar., 2011). Tako e se može vezati za membransko mesto preko koga smanjuje frekvencu otvaranja kanala (Orser i sar., 1997a). Magnezijum je nekompetitivni antagonist NMDA receptora koji blokira jonski kanal (Fawcet i sar., 1999; Herroeder i sar., 2011). I ketamin i magnezijum se koriste u anesteziji i analgeziji, ali i u smanjenju drhtavice nakon anestezije (Hirota i Lambert, 2011; Nechifor, 2011). Postoje podaci o uticaju ketamina na telesnu temperaturu (Fahim i sar., 1973; Pitsikas i Boultadakis, 2009), dok dejstvo magnezijuma na telesnu temperaturu nije ispitivano. U literaturnim podacima postoje zna ajna neslaganja u vezi interakcije izme u ketamina i magnezijuma u dejstvu na bol; sinergizam, aditivnost i antagonizam (Liu i sar., 2001; Orser i sar., 1997b; O'Flaherti i Lin, 2003; Stessel i sar., 2013), ali nema podataka o interakciji izme u ovih lekova i njihovog efekta na telesnu temperaturu.

#### I.4. Hipotalami ka regulacija telesne temperature

Termoregulacija kod ektotermnih i endotermnih životinja i čoveka je uglavnom pod kontrolom preoptičkog područja u prednjem delu hipotalamusa. Takva homeostatska kontrola je odvojena od osećaja temperature. Mehanizmi kontrole telesne temperature prikazani su na slici I.4.



Slika I.4. Mehanizmi kontrole telesne temperature

## **I.5. Uticaj različitih sistema u regulaciji telesne temperature**

### **I.5.1. Uticaj adrenergičkog sistema u regulaciji telesne temperature**

Centralna kontrola telesne temperature se dešava u hipotalamusu i neki amini kao što su adrenalin, noradrenalin i serotonin su uključeni u tu regulaciju.

Poznato je da noradrenalin ima ulogu u kontroli telesne temperature kod pacova. Još su Feldberg i Lotti (1967) pokazali da noradrenalin može izazvati i hipertermiju i hipotermiju u zavisnosti od doze. Dejstvom na presinaptičke receptore, može dovesti do povećanja oslobađanja noradrenalina (Langer, 1974). Takođe je poznato da prilikom delovanja  $\alpha_2$  agonista dolazi do inhibicije oslobađanja neurotransmitera acetilholina. Johimbin je antagonist  $\alpha_2$  receptora i lek koji povećava koncentraciju serotonina i smanjuje noradrenalin u mozgu (Freedmann i Giarman, 1962).

### **I.5.2. Uticaj serotonergičkog sistema u regulaciji telesne temperature**

Serotonergički neuroni se nalaze širom CNS-a i utiču na brojne moždane funkcije. Posebno važnu, ali kontradiktornu ulogu imaju u kontroli respiracije i termoregulacije (Hodges i sar., 2008). Jasno je definisana uloga i rasprostranjenost 5-HT neurona u regulaciji telesne temperature, naročito u uslovima smanjene telesne temperature. Odbrana organizma od hladnih spoljašnjih uslova jeste produkcija toplote (u obliku drhtavice i termogeneze). Svaki od ovih mehanizama je regulisan na različitim delovima CNS-a i pod uticajem je 5-HT (Morrison, 2004, Boulant 2006, Dimicco i Zeretsky, 2007). Neki od serotonergičkih neurona se projektuju u intermediolateralne ćelijske kolone hipotalamusa (Cano i sar., 2003), i dolazi do povećanja njihove aktivnosti kao odgovor na spoljašnje (Martin-Cora i sar., 2000) i na rashlađivanje hipotalamusa (Nason i Mason, 2006). Sistemska ili parahiramidalna aplikacija 8-hidroksi-2-di-N-propilamino tetralina, agoniste 5-HT<sub>1A</sub>receptora utiče na temperaturu i izaziva drhtavicu (Hoffman i sar., 2007) i menjaleptinom izazvanu aktivaciju mrkog masnog tkiva (BAT) (Morrison, 2004).



Serotonergički sistem je uključen u regulaciju telesne temperature. Potvrđeno je kod pacova da 5-hidroksitriptamin dovodi do sniženja telesne temperature (Fahim i sar., 1973). Posebno je značajna uloga ovog sistema u stresom izazvanoj hipertermiji (Vinkers i sar., 2010). Postoji interakcija između subjedinice GABA<sub>A</sub> receptora i 5-HT<sub>1A</sub> receptora u stresom izazvanoj hipertermiji. Benzodiazepini npr. deluju na serotonergički sistem preko  $\alpha_3$  subjedinice GABA<sub>A</sub> receptora (Vinkers i sar., 2010).

### **I.5.3. Uloga gabaergičkog sistema u regulaciji telesne temperature**

Pokazano je da GABA u rastu i dozama dovodi do dozno-zavisnog sniženja telesne temperature pri konstantnoj temperaturi okoline (Ishiwata i sar., 2005). Vinkers i saradnici (2010) su došli do zaključka da receptorska subjedinica  $\alpha_1$  GABA<sub>A</sub> receptora ima ulogu u hipotermiji, a da  $\alpha_{2/3}$  subjedinica ovih receptora ima ulogu u redukciji stresom izazvane hipertermije.

Hipotermija koju izaziva GABA može nastati zbog oslobađanja serotonina, aktivacijom bikukulin-neosetljivih GABA receptora koji se nalaze na centralnim serotonergičkim neuronima (Dimicco i Zaretsky, 2007). Smatra se da GABA-ergički sistem utiče na preoptički/anteriorni hipotalamus PO/AH. Može se pretpostaviti da je GABA<sub>A</sub>-serotonin interakcija jako bitna za termoregulaciju i da postoji u preoptičkoj regiji ili u dorzomedijalnom hipotalamusu (Dimicco i Zaretsky, 2007) ili da projekcije dorzalnih i medijalnih vlakana različitno utiču na bazalnu i stresom izazvanu telesnu temperaturu. Pokazano je da 5-HT inhibira oslobađanje GABA-e presinaptički u termoregulatornoj hipotalamičkoj medijalnoj preoptičkoj regiji, a ovaj efekt može biti blokiran antagonistom 5-HT<sub>1A</sub> receptora (Lee i sar., 2008).

### **I.5.4. Uloga NO u regulaciji telesne temperature**

NO ima širok dijapazon različitih funkcija u organizmu. Jedna od funkcija je i uticaj na regulaciju telesne temperature, groznice i hipotermije. L-arginin kao prekursor NO ne utiče na telesnu temperaturu pacova kada se primeni sam (Zarrindast i sar., 2002). Neki autori smatraju da NO ima antipiretička svojstva (Moncada i sar., 1991), a neki su pokazali

sa NO ima ulogu u hipotermiji (Steiner i sar., 1991; Almeida i Branco, 2001). Pokazano je i da NO ima ulogu u samoj groznici (Lin i Lin, 1996). Treba napomenuti da se sve ove studije razlikuju po sintezi NO, vrste životinje koja je korišćena u eksperimentima, na inu davanja pirogene supstance i dr. L-arginin povećava i produžuje hladnoćom izazvano stvaranje endotelijalna NOS, inducibilnu NOS i termogenetsku ekspresiju molekula, vaskularnost, hiperplaziju i remodelovanje mitohondrija u hladnim uslovima, dok L-NAME ima suprotne efekte. NO je jedan od glavnih regulatora termogeneze mrkog masnog tkiva (BAT) termogenetskog operativnog programa na nivou gena, proteina i tkiva (Petrović i sar., 2010.).

### **I.5.5. Uloga opioidergičkog sistema u regulaciji telesne temperature**

Opioidi imaju efekt na telesnu temperaturu. Njihov efekt zavisi od vrste životinje, starosti, doze, puta primene, spoljašnje temperature. Kod odraslih pacova morfin izaziva hipertermiju u malim dozama, a hipotermiju u visokim dozama. Sputanost esto utiče na opioidnu hipertermiju i povećava hipertermični raspon (Adler i Geller, 1989). Visoka spoljašnja temperatura povećava hipertermiju, dok niska povećava hipotermiju (Handler i sar., 1994). Opioidni receptori  $\mu$  i  $\kappa$  su uključeni u regulaciju telesne temperature. Naime obe vrste receptora se nalaze u preoptičkom delu hipotalamusa (Handler i sar., 1992). U hipotalamusu pacova  $\mu$  agonisti blokiraju odgovor temperaturno osetljivih neurona preoptičkog/anteriornog hipotalamusa. Pretpostavlja se da se hipertermični odgovor opioida dešava preko  $\mu$  receptora, a hipotermija dešava preko  $\kappa$  receptora (Colman i sar., 2002). Jedna od studija je pokazala da  $\mu_1$  receptori nisu uključeni u morfinsku hipertermiju (Pieppoen i sar., 1997).

### **I.5.6. Uloga ATP senzitivnih kalijumskih kanala u regulaciji telesne temperature**

$K_{ATP}$  senzitivni kanali imaju ulogu u brojnim funkcijama u organizmu. Jedna od uloga je i u regulaciji telesne temperature. Glibenklamid, kao blokator  $K_{ATP}$  senzitivnih kanala, primenjen u kombinaciji sa fiziološkim rastvorom ne utiče na rektalnu temperaturu pacova u poređenju sa kontrolnom grupom. Pokazano je i da glibenklamid dat

intracerebroventrikularno antagonizuje hipertermiju izazvanu supkutano datim morfinom na dozno-zavistan na in. Na taj na in je pokazano da  $K_{ATP}$  kanali imaju važnu ulogu kao modulatori hipertermnog efekta mi agonista (Narita i sar., 1992).

## II CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati efekte analoga morfina i fentanila na akutnu termičku nocicepciju (ATN)/telesnu temperaturu radi utvrđivanja odnosa između hemijske strukture i antinociceptivne/hipertermne aktivnosti i uporediti relativne jačine dve grupe analoga u izazivanju hipertermije u odnosu na antinocicepciju.
2. Ispitati efekte ketamina, magnezijuma i kombinacije ketamin-magnezijum na telesnu temperaturu pacova i ATN i utvrditi tip interakcije (antagonizam, aditivnost, sinergizam).
3. Ispitati efekte ketamina, magnezijuma i kombinacije ketamin-magnezijum na hipertermiju i ATN izazvanu morfinom.
4. Ispitati mehanizam dejstva ketamina i kombinacije ketamin-magnezijum na telesnu temperaturu pacova koristeći antagonist  $GABA_A$  receptora (bikukulin), antagonist adrenergičkih  $\alpha_2$  receptora (johimbin), neselektivni antagonist serotonergičkih (5-HT) receptora (metizergid), antagonist ATP-zavisnih kalijumskih kanala (glibenklamid), neselektivni antagonist sintaze azotnog oksida (L-NAME), prekursor sinteze azotnog oksida (L-arginin) i neselektivni antagonist opioidnih receptora (nalokson).
5. Ispitati efekt morfina i kombinacije ketamin-magnezijum-morfin na motornu koordinaciju pacova.

## III MATERIJAL I METODE

### III.1. Eksperimentalne životinje

Pre početka eksperimenata, dobijena je dozvola za rad sa životinjama. Eksperimenti su odobreni od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, i u skladu su sa Zakonom o dobrobiti životinja u Republici Srbiji (dozvola broj 5057/2) i vodičem Internacionalnog udruženja za proučavanje bola (IASP).

Eksperimenti su urađeni na mužjacima pacova soja Wistar albino, mase 200-250 grama (Vivarijum Vojnomedicinske akademije u Beogradu). Pacovi su bili smešteni u transparentnim kavezima od pleksiglasa (42,5 x 27 x 19 cm) obloženim šuškom. Hrana (specijalni briketi za ishranu eksperimentalnih životinja) i voda bili su dostupni 24h, bez ograničenja osim tokom trajanja eksperimenta. Svaka životinja je korišćena samo jednom. Nakon eksperimenta, životinje su žrtvovane akutnom intraperitonealnom primenom velike doze anestetika (tiopenton-natrijum).

### III.2. Supstance korišćene u eksperimentima:

- fentanil-citrat (Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgija)
- (±)-cis-3-metil fentanil oksalat (Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija)
- (±)-cis-3-butil-fentanil-oksalat (Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija)
- (±)-cis-3-karbometoksi-fentanil-oksalat (Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija)
- (±)-trans-3-karbometoksi-fentanil-oksalat (Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija)
- morfin hidrohlorid (Alkaloid Skoplje, Makedonija)
- oksikodon hidrohlorid (poklon Univerziteta u Debrecinu, Mađarska)

- tebakon hidrohlorid (poklon Univerziteta u Debrecinu, Maarska)
- 6,14-etenomorfinan-7-metanol, 4,5-epoksi-6-fluoro-3-hidroksi-, , ,17-trimetil-, (5,7) (poklon Univerziteta u Debrecinu, Maarska)
- ketamin (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Nemačka)
- magnezijum sulfat (Zorka, Šabac, Srbija)
- bikukulin (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Mo., SAD)
- johimbin hidrohlorid (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Mo., SAD)
- metizergid maleat (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Mo., SAD)
- glibenklamid (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Mo., SAD)
- L-NAME (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Mo., SAD)
- L-arginin (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Mo., SAD)
- nalokson hidrohlorid (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Mo., SAD).

#### Primena leka

Fentanil-citrat (Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgija) i ( $\pm$ )-cis-3-metil fentanil oksalat, ( $\pm$ )-cis-3-butil-fentanil-oksalat i ( $\pm$ )-cis i ( $\pm$ )-trans-3-karbometoksi-fentanil-oksalat (Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija) (Mišević et al., 1998; Ivanović et al., 2004) su rastvarani u fiziološkom rastvoru i ubrizgavani intraperitonealno u ukupnoj zapremini od 2 ml/kg. Analozii fentanila su ispitivani kao racemske smeše. Morfin (Alkaloid Skoplje, Makedonija), oksikodon (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Mo., SAD), tebakon (isto je 98,56%; poklon Univerziteta u Debrecinu, Maarska) i (6,14-etenomorfinan-7-metanol, 4,5-epoksi-6-fluoro-3-hidroksi-, , ,17-trimetil-, (5,7)) (isto je 98,65%; poklon Univerziteta u Debrecinu, Maarska) (Berenyi et al., 1995), u obliku soli hidrohlorida, su rastvarani u fiziološkom rastvoru i ubrizgavani intraperitonealno u konačnoj zapremini od 2 ml/kg. Doze lekova su računane u odnosu na slobodnu bazu. Nalokson-hidrohlorid (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Mo., SAD) je takođe rastvaran u fiziološkom rastvoru i ubrizgavan supkutano (sc, 2 mg/kg) u leziva 15 min pre ip ubrizgavanja ispitivanog jedinjenja u istoj zapremini. U kontrolnoj grupi pacova je ip primenjen fiziološki rastvor (0,9% m/V rastvor natrijum hlorida u

redestilovanoj sterilisanoj vodi) u ukupnoj zapremini od 2 ml/kg, kako bi se ispitalo da li fiziološki rastvor ima bilo kakav uticaj na nocicepciju ili na telesnu temperaturu pacova.

Ketamin (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Nema ka) i magnezijum sulfat (Zorka Šabac, Srbija) su rastvarani u 0,9% NaCl i ubrizgani intraperitonealno (ketamin) ili supkutano (magnezijum sulfat) u ukupnoj zapremini od 2 ml/kg. Da bi se izvršilo testiranje da li ubrizgavanje 0,9 % NaCl ima bilo kakav efekt na telesnu temperaturu, ista zapremina 0,9 % NaCl je ubrizgana kontrolnoj grupi pacova.

Svi antagonisti (johimbin, metizergid, bikukulin, L-arginin, L-NAME, nalokson, glibenklamid) su rastvarani u fiziološkom rastvoru u ukupnoj zapremini od 2 ml/kg, osim glibenklamida koji je rastvaran u alkoholu.

### **III.3. Eksperimentalni protokol (1-5)**

#### *1. Adaptacija životinja na eksperimentalnu proceduru*

Svi eksperimenti su izvođeni u isto vreme (od 8-15h), kako bi se izbegle cirkadijalne varijacije u bihejvioralnim testovima. Eksperimenti su rađeni pri konstantnim spoljnim uslovima temperatura  $21 \pm 1$  °C; vlažnost  $55 \pm 5$  %; ciklusom svetlo-tama na 12h.

Tri uzastopna dana pre samog eksperimenta, životinje su se navikavale na eksperimentalnu proceduru tj. da ulaze u držače za pacove, gde su boravile pola sata dnevno.

Životinje su se na dan eksperimenta unosile u laboratoriju jedan sat pre merenja antinocicepcije/temperature da bi se adaptirale na uslove okoline. Životinje nisu bile sputane, sem tokom merenja kada su boravile u hemcilindrima držača za pacove od pleksiglasa (19 x 6 x 5 cm) u trajanju od 15 sekundi. Eksperimentalne grupe su imale 6-8 životinja koje su se koristile samo jednom. Za svaku vrstu eksperimenta postojala je kontrolna grupa koja je u isto vreme dobijala fiziološki rastvor (0,9% m/V rastvor natrijum hlorida u redestilovanoj sterilisanoj vodi) ili alkohol kad je primenjivan glibenklamid.

#### *2. Eksperimentalna procedura*

Nakon navikavanja na laboratorijske uslove, merila su se dva kontrolna vremena povlačenja repa iz tople vode u razmaku od pola sata. U eksperimentima u kojima se ispituje telesna temperatura merenja su se vršila nekoliko puta u razmaku od pola sata, sve dok temperatura ne bude stabilna (u periodu oko 2h). Dva poslednja merenja (kada se dobiju slične vrednosti, jer se telesna temperatura stabilizovala) predstavljale su kontrolne vrednosti telesne temperature.

Nakon toga životinje su dobijale lek i/ili rastvarač intraperitonealno ili supkutano i pristupalo se merenju dejstva leka na nocicepciju ili telesnu temperaturu.

3. *Antinocicepcija* je ispitivana metodom potapanja repa pacova u toplu vodu.

4. *Promene u telesnoj temperaturi* pacova merene su termometrom.

5. *Dejstvo na motornu aktivnost* pacova registrovano je rotarod testom.

### **III.4. Metode**

#### **III.4.1. Test potapanja repa u toplu vodu (eng. tail-immersion test)**

Antinociceptivna aktivnost određuje se pomoću testa potapanja repa u toplu vodu. Termički bolni stimulus je voda zagrejana na  $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (vodeno kupatilo Memmert GmbH + Co.KG, Germany). Pacovi se stavljaju u predviđenu držanje tako da rep slobodno visi van držanja. Rep (5 cm po ev od vrha) se potapa u toplu vodu. Meri se dužina latentnog perioda od trenutka potapanja do naglog trzaja repa iz vode, pomoću digitalne štoperice sa preciznošću od 0,1 s. Postoji i vremensko ograničenje izlaganja repa toplotnom stimulusu od 10 sekundi, da bi se izbeglo oštećenje tkiva. Nakon dva kontrolna merenja daje se lek i/ili rastvarač i nastavlja se merenje dejstva leka posle 30, 60, 90, 120, 150, 180 i 210 minuta. Rezultati se izražavaju u sekundama.



### **III.4.2. Merenje telesne temperature**

Temperatura je merena termometrom (ALMEMO, Holzkirchen, Nemačka). Sonda termometra postavlja se u dužini od 5 cm u debelo crevo pacova. U cilju smanjenja mehaničke traume, sonda je bila obložena belim vazelinom pre svakog merenja. Temperatura je merena 30, 60, 90, 120, 150, 180 i 210 min, nakon ubrizgavanja supstanci. Životinje su boravile u laboratoriji oko 60 minuta pre prvog merenja temperature da bi se aklimatizovale. Bile su slobodne sve vreme, osim za vreme merenja telesne temperature. Tokom merenja pacovi su smešteni u držače od pleksiglasa u kojima su boravili oko 15 sekundi i odmah potom vraćani nazad u kaveze. U eksperimentalnoj grupi je bilo 6-8 pacova. Svaka životinja je korišćena samo jednom. Temperatura pacova je merena nekoliko puta i kada je primećeno da se temperatura stabilizuje za otprilike 2 sata, ubrizgavani su lekovi i/ili 0,9 % NaCl intraperitonealno ili subkutano (Savić i Vujović i sar., 2013).

### **III.4.3. Rotarod test**

Da bi utvrdili da li ispitivane supstance remete motornu koordinaciju, koristili su rotarod aparat za pacove (UgoBasile, Italija). Aparat se sastoji od rotirajućeg vretena prečnika 5 cm, podeljenog na pet odeljaka širine 8 cm.

Tokom tri uzastopna dana pre eksperimenta, životinje su trenirane 5 minuta na rotarod cilindru pri brzini 10 obrtaja u minuti. Merilo se vreme koje pacovi provedu na cilindru od momenta postavljanja do pada životinje. Maksimalna dužina vožnje rotarod aparata ("cut-off") bila je tri minuta. Samo oni pacovi koji nisu pali sa cilindra tokom 3 minuta vožnje na dan eksperimenta su uključeni u dalji eksperiment.

Ispitivano je dejstvo morfina (2,6 mg/kg) kao i dejstvo kombinacije morfin (2,6 mg/kg)-ketamin (5mg/kg)-magnezijum sulfat (5mg/kg) na motornu koordinaciju pacova. Pacovima su dati morfin i ketamin intraperitonealno, a nakon 15 minuta magnezijum sulfat

supkutano (slika III.4.3.). Kontrolna grupa životinja je dobijala fiziološki rastvor. Nakon ubrizgavanja supstanci, pacovi su postavljeni na cilindar koji se okreće 3 minuta sa ubrzanjem 2,5 do 25 obrtaja u minuti (Lai i sar., 2007). Merenja su vršena 30, 60, 90, 120 i 150 min od intraperitonealne primene leka/fiziološkog rastvora (po metodi Lai i sar., 2007) (III.slika 4.3.).

Vreme	0 min	15 min	0-150 min
	↑	↑	↑
Merenja pre davanja leka	ip inj.	sc inj.	Merenja nakon davanja leka
	MR	NaCl	
	NaCl	NaCl	
	MR+KT	MG	

Slika III.4.3. Eksperimentalni protokol za rotarod test

### III.5. Analiza rezultata

#### III.5.1. Analiza dejstva analoga morfina i fentanila na antinocicepciju i telesnu temperaturu

Prvi deo rezultata odnosi se na efekte novosintetisanih derivata morfina i fentanila na antinocicepciju i telesnu temperaturu kod pacova. Svi opioidni analgetici su dati intraperitonealno. Merene su vrednosti antinociceptivnog/hipertermnog efekta 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta nakon davanja leka.

Kako bi se direktno poredila različitih jedinjenja i različitih efekti, korišćen je kvantalni odgovor za svaku životinju (prisustvo ili odsustvo odgovarajućeg efekta leka). Maksimalni odgovor dobijen u toku merenja korišćen je za procenu svakog efekta i svake doze. Zatim je rađena statistička obrada podataka, korišćenjem kompjuterskog programa Tallarida i

Murray (1986). Prvo je određen procenat životinja kod kojih je zabeležena reakcija, zatim je procenat preveden u probite i unet na grafikon u odnosu na logaritamsku vrednost doze. Korišćena je procedura Litchfielda i Wilcoxonova kako bi se izračunala srednja efektivna doza, tj.  $AD_{50}$  (srednja efektivna antinociceptivna doza) ili  $HD_{50}$  (srednja efektivna hipertermička doza). Pored toga, kada su uneti podaci za drugu kvantitativnu krivu odnosa doze i odgovora, istom procedurom je izračunat odnos jačina (u granicama poverenja od 95% (95% CL)) za odgovarajuće krive. Na taj način su izračunate relativne jačine jedinjenja fentanila i morfina za antinociceptivne i hipertermičke efekte. Relativne jačine su smatrane statistički značajnim kada granica poverenja od 95% nije prelazila 1,0. Tako je za svaki lek određen odnos jačine između  $HD_{50}$  i  $AD_{50}$ , označen kao terapijski indeks (TI). Ako granica poverenja od 95% za TI nije obuhvatala 1,0, onda je razlika između  $HD_{50}$  i  $AD_{50}$  bila značajna (Tomić i sar., 2010).

Za određivanje vremena dostizanja maksimalne vrednosti, kao i za utvrđivanje trajanja efekta, korišćeni su izvorni podaci (temperatura u °C i latencija reakcije povlačenja repa u sekundama). Statistička značajnost (jednosmerna ANOVA analiza, praćena Tukey-ovim HSD testom) ustanovljena je poređenjem sa kontrolama, tretiranim fiziološkim rastvorom.

### **III.5.2. Analiza efekta morfina, ketamina i magnezijum sulfata na antinocicepciju**

Za ispitivanje efekta morfina, ketamina i magnezijum sulfata na antinocicepciju korišćen je sledeći eksperimentalni protokol:

Vreme		-5 min	0 min	15 min	0-210 min
	↑	↑	↑	↑	↑
	Merenja pre davanja leka	Inj.	Inj.	Inj.	Merenja nakon davanja leka
<b>a</b>			MR	NaCl	
			NaCl	MG	
			MR	MG	
			NaCl	NaCl	
<b>b</b>			KT	NaCl	
			MR+KT	NaCl	
<b>c</b>			KT	MG	
			MG	KT	
			MR+KT	MG	
<b>d</b>			MG	MR+KT	
		NL	MR+NaCl	NaCl	
		NL	MR+KT	MG	

Slika III.5.2. Eksperimentalni protokol. Efekt morfina (MR), magnezijum sulfata (MG), i njihove kombinacije (*a*), ketamina i kombinacije morfin-ketamin (*b*), kombinacije ketamin-magnezijum sulfat sa/bez morfina (*c*) i efekti naloksona (NL) na efekte morfina, i kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat (*d*) u testu povlačenja repa iz tople vode. Životinje u kontrolnoj grupi su primale 0,9% NaCl (NaCl) umesto testiranih supstanci.

U cilju da ispitamo da li magnezijum sulfat potencira antinociceptivno dejstvo ketamina i kombinacije morfin-ketamin prvo smo ispitivali koja je to najmanja doza ketamina i magnezijum sulfata koja potencira antinociceptivni efekt morfina. Nakon toga smo kombinovali lekove i ispitivali kombinaciju tri leka morfin-ketamin-magnezijum sulfat.

U ovom delu su ura ene tri serije eksperimenata. Prvo je ispitivan efekt morfina, magnezijum sulfata i njihove kombinacije (III.5.2 a). Nakon toga smo ispitivali uticaj ketamina kao i kombinaciju morfin-ketamin. Tre a grupa eksperimenata se odnosi na kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat (ketamin je dat pre magnezijum sulfata), kao i kombinaciju magnezijum sulfat-ketamin (ketamin je dat posle magnezijum sulfata). Ova kombinacija je nakon toga kombinovana sa morfinom (III.5.2 c). Na kraju je ispitivan efekt naloksona na kombinaciju morfin-ketamin-magnezijum sulfat u testu potapanja repa u toplu vodu (III.5.2 d).

Lekovi su dati intraperitonealno(ketamin i morfin) ili subkutano (magnezijum i nalokson).

#### **III.5.2.1. Analiza dužine trajanja antinociceptivnog dejstva lekova kao i kombinacije lekova u testu potapanja repa pacova u vodu**

Trajanje efekta je definisano kao vreme u prvoj i poslednjoj ta ki u kojoj postoji statisti ki zna ajna razlika izme u grupa koje su primale lek i kontrolne grupe (0,9% NaCl).

#### **III.5.3. Analiza efekta morfina, ketamina i magnezijum sulfata na telesnu temperaturu**

Za ispitivanje kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat na telesnu temperaturu ura ene su tri serije eksperimenata. Prvo smo ispitivali efekte morfina, magnezijum sulfata i njihove kombinacije (III.5.3. a). Nakon toga smo ispitivali uticaj ketamina i kombinacije ketamin-magnezijum sulfat (III.5.3. b). Tre a grupa eksperimenata je imala za cilj da ispita efekt ketamina sa/ bez magnezijum sulfatom na morfinsku hipertermiju (III.5.3. c), kao i antagonizam naloksonom (III.5.3. d).

Vreme		-5 min	0 min	15 min	0-210 min
	↑	↑	↑↑	↑	↑
	Merenja pre davanja leka	sc inj.	ip inj.	sc inj.	Merenja nakon davanja leka
<b>a</b>			MR NaCl MR NaCl	NaCl MG MG NaCl	
<b>b</b>			KT KT NaCl	NaCl MG NaCl	
<b>c</b>			MR+NaCl MR+KT MR+KT NaCl+NaCl	NaCl NaCl MG NaCl	
<b>d</b>		NL NL NL	MR+NaCl MR+KT MR+KT	NaCl NaCl MG	

III.5.3. Eksperimentalni protokol ispitivanja efekta morfina (MR), magnezijum sulfata (MG), i njihove kombinacije (a), ketamina (KT) i kombinacije ketamin-magnezijum sulfat (b) kombinacija morfin-ketamin i morfin-ketamin-magnezijum sulfat (c) i efekt naloksona

(NL) na efekte morfina, morfin-ketamin i morfin-ketamin-magnezijum sulfat (*d*) na telesnu temperaturu kod pacova. Životinje u kontrolnoj grupi su primale 0,9% NaCl (NaCl) umesto testiranih supstanci. Ip, intraperitonealno. Sc, supkutano. Inj., injekcija

### **III.5.3.1. Analiza interakcija ketamina i magnezijuma na telesnu temperaturu pacova**

Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška srednje vrednosti (engl. "SEM") telesne temperature za svako izmereno vreme. Vrednosti telesne temperature su statistički analizirane korišćenjem jednosmerne analize varijanse (jednosmerna ANOVA) i Tukey HSD *post hoc* testa. Da bi testirali interakcije između lekova, izražena je veličina temperaturnog raspona kao srednja vrednost  $\pm$  SEM maksimalne promene u telesnoj temperaturi ( $^{\circ}\text{C}$ ) u odnosu na kontrolu (0,9 % NaCl), merena u bilo kom trenutku (Rawls i sar., 2007). Zatim su nacrtane krive odnosa doze i efekta i upoređene testom za paralelizam i testom relativne jačine (Tallarida i Murray, 1986). Odnos jačina se smatra statistički značajnim kada se granica poverenja od 95 % (CL) nije prelazila 1,0 ( $p < 0,05$ ). U svim testovima postoji statistički značajna razlika kada je  $p < 0,05$ .

### **III.5.3.2. Analiza interakcije između lekova u slučaju kada je jedan lek nedovoljno efikasan**

Srednja efektivna doza ED<sub>50</sub> (sa granicom pouzdanosti u iznosu od 95 %) za ketamin (koji predstavlja aktivni agens) je izražena na osnovu probit krive odnosa doze i efekta. Podaci su izraženi kvantitativno kao broj životinja kod kojih je zabeležena hipotermija u odnosu na ukupan broj životinja koje su primale isti lek. Hipotermija je definisana kao temperatura manja za 4 standardne devijacije od srednje kontrolne vrednosti, tj. vrednosti dobijene pre primene leka kod 6-8 pacova (Savić Vujović i sar., 2013; Vučković i sar., 1998).

Ketamin (aktivni agens) je kombinovan sa magnezijum sulfatom (neaktivno jedinjenje) u fiksnom masenom odnosu doza 1:1. Interakcija između komponenti je sinergistička ukoliko postoji značajno pomeranje ulevo krive odnosa doze i efekta za ketamin u prisustvu

magnezijum sulfata u odnosu na krivu odnosa doze i efekta za ketamin. Ako se krive preklapaju, postoji aditivna interakcija (Tallarida i sar., 2003, Tallarida, 2007).

Sledeći korak je bio ispitivanje kombinacije fiksne doze ketamina i to srednje efektivne doze ketamina ( $ED_{50}$ ) sa 3 različite doze magnezijum-sulfata u masenom odnosu doza 1:0,5; 1:1 i 1:3 (Tallarida i sar., 2003, Tallarida, 2007). Ako je efekt testirane doze ketamina ( $ED_{50}$ ) u kombinaciji sa magnezijum sulfatom veći u poređenju sa efektom samog ketamina i postoji statistički značajna razlika, možemo reći da je interakcija između lekova sinergistička.

Zatim je ketamin (aktivni agens) dat u rastućim dozama sa fiksnom dozom magnezijum sulfata (0,5:1; 1:1 i 2:1 maseni odnos doza leka). Ako postoji značajno pomeranje ulevo krive odnosa doze i efekta vrednosti za ketamin u prisustvu magnezijum sulfata u odnosu na krivu odnosa doze i efekta za ketamin, interakcija između komponenti je sinergistička.

U cilju jačanja tumačenja interakcije lekova i njihovog uticaja na telesnu temperaturu, kao i da bi ispitali efekte ova dva NMDA antagonista na hipertemiju izazvanu morfinom, kombinovana je niska doza magnezijum sulfata (5 mg/kg, ip) sa različitim dozama ketamina i ispitivan je njihov efekt na bazalnu telesnu temperaturu i na morfinsku hipertemiju.

#### **III.5.4. Analiza dejstva antagonista na ketamin i na kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat**

Da bi ispitali mehanizam dejstva ketamina, kao i kombinacije ketamin-magnezijum sulfat na telesnu temperaturu, koristili smo sledeće antagoniste:

- bikukulin, antagonist gabergetičkih  $GABA_A$  receptora;
- johimbin, antagonist adrenergetičkih  $\alpha_2$  receptora;
- metizergid, neselektivni antagonist serotonergičkih (5-HT) receptora;
- glibenklamid, antagonist ATP-zavisnih kalijumskih kanala;
- L-NAME, neselektivni antagonist sintaze azotnog oksida;
- L-arginin, prekursor sinteze azotnog oksida;
- nalokson, neselektivni antagonist opioidnih receptora.



Svi antagonisti su dati supkutano 5 minuta pre ketamina/kombinacije ketamin-magnezijum sulfat.

Za određivanje vremena dostizanja maksimalne vrednosti, kao i za utvrđivanje trajanja efekta, korišteni su izvorni podaci (temperatura u °C). Trajanje efekta je definisano kao vreme u prvoj i poslednjoj tački u kojoj postoji statistički značajna razlika između grupa koje su primale lek i kontrolne grupe (0,9% NaCl). Za statističku analizu podataka korišćena je jednosmerna analiza varijanse (jednosmerna ANOVA) i Tukey HSD *post hoc* test. Upoređivane su kombinacija antagonist-ketamin (10) sa ketaminom (10 mg/kg), kao i kombinacija antagonist-ketamin (5)-magnezijum sulfat (5) sa kombinacijom ketamin (5)-magnezijum sulfat (5).

### **III.6. Statistička analiza**

Statistička značajnost razlike u registrovanim parametrima između eksperimentalnih grupa, procenjena je uz pomoć jednostruke ANOVA i Tukey HSD *post hoc* testa. U rotarod testu, razlike između grupa su verifikovane Kruskal-Wallis testom izakoga sledi, Mann-Whitney U test. Podaci su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Koristio se i kompjuterski program Pharmacologic Calculation System (Tallarida i Murray, 1986).

## IV REZULTATI

### IV.1. Uticaj derivata morfina i fentanila na antinocicepciju i telesnu temperaturu kod pacova

#### IV.1.1. Derivati fentanila: ja ina u izazivanju antinocicepcije i hipertermije

Fentanil (F; 0,0073-0,21 mg/kg; ip) i analozi fentanila: ( $\pm$ )-cis-3-metil fentanil (CM; 0,00065-0,022 mg/kg; ip), ( $\pm$ )-cis-3-karbometoksi fentanil (C; 0,016-0,48 mg/kg; ip), ( $\pm$ )-trans-3-karbometoksi fentanil (T; 0,08-2,18 mg/kg; ip) i ( $\pm$ )-cis-3-butil fentanil (B; 0,14-3,24 mg/kg) su doveli do dozno-zavisnog pove anja antinocicepcije i hipertermije (Slika IV.1.A.B). Za svaki ispitan i efekt, nagibi probit kriva za F, CM, C, T i B nisu bili zna ajno razli iti ( $p > 0,05$ , test paralelizma, Tabela IV.1.1, slika IV.1)

Srednje efektivne doze za antinocicepciju ( $AD_{50}$ ) i hipertermiju ( $HD_{50}$ ) i relativne ja ine derivata fentanila su predstavljene u Tabeli IV.1.1.

Me u analozima fentanila, redosled relativnih ja ina u izazivanju antinocicepcije bio je: CM [11,27 (6,23-20,40)] > F (1) > C [0,35 (0,17-0,72)] T [0,11 (0,07-0,17)] B [0,06 (0,01-0,45)].

Sli no ovome, redosled relativnih ja ina u izazivanju hipertermije bio je: CM [8,43 (3,94-18,07)] > F (1) > C [0,46 (0,09-2,14)] T [0,11 (0,05-0,25)] B [0,08 (0,02-0,34)].

Doze jedinjenja fentanila koje izazivaju hipertermni odgovor su bile zna ajno ve e ( $p < 0,05$ ) od antinociceptivnih doza. Odnosi izme u srednjih efektivnih doza za hipertermiju i srednjih antinociceptivnih doza ( $HD_{50}/AD_{50} = TI$ ) kretali su se od 6,53 (3,54-12,06) do 11,76 (5,74-24,10). Terapijski indeksi statisti ki se nisu razlikovali ( $p > 0,05$ ) izme u analoga (Tabela IV.1.1).

Tabela IV.1.1. Srednje efektivne antinociceptivne i hipertermne doze (AD<sub>50</sub> i HD<sub>50</sub>), koeficijent korelacije (r), nagib probit krive, relativna ja ina, vreme dostizanja maksimalnog efekta, dužina trajanja efekta i terapijski indeksi za derivate fentanila kod pacova.

Efekt (raspon doza)	AD <sub>50</sub> i HD <sub>50</sub> (95% CL)	r	Nagib probit krive (95% CL)	Relativna ja ina (95% CL)	Maks. efekt (min)	Trajanje AD <sub>50</sub> ili HD <sub>50</sub> (min)	Terapijski indeks HD <sub>50</sub> / ED <sub>50</sub> (95% CL)
<b>Fentanil</b>							
Antinocicep. (0,007-0,016)	0,011 (0,008-0,015)	0,782	4,54 (-41,43-50,52)	1	10	50	8,80* (4,62-16,78)
Hiperterm. (0,052-0,21)	0,094 (0,005-0,168)	0,988	3,34 (-3,17-9,86)	1	30	90	
<b>(±)-cis-3-Metil fentanil</b>							
Antinocicep. (0,00065-0,00205)	0,0009 (0,0006-0,0016)	1	3,43 (2,34-4,52)	11,27* (6,23-20,40)	10	90	11,76* (5,74-24,10)
Hiperterm. (0,0055-0,022)	0,011 (0,007-0,018)	0,999	3,43 (1,78-5,09)	8,43* (3,94-18,07)	60	180	
<b>(±)-cis-3-Carbometoksi fentanil</b>							
Antinocicep. (0,016-0,410)	0,031 (0,016-0,059)	1	2,43 (2,17-2,71)	0,35* (0,17-0,72)	10	30	6,72* (2,69-16,79)
Hiperterm. (0,12-0,48)	0,206 (0,108-0,392)	0,997	2,72 (0,02-5,43)	0,46 (0,09-2,14)	10	60	
<b>(±)-trans-3-Carbometoksi fentanil</b>							
Antinocicep. (0,08-0,169)	0,098 (0,071-0,137)	0,989	5,13 (-4,76-15,01)	0,11* (0,07-0,17)	10	20	8,79* (4,35-17,74)
Hiperterm. (0,55-2,18)	0,866 (0,466- 1,608)	0,957	2,96 (-8,38-14,29)	0,11* (0,05-0,25)	10	60	

<b>(±)-cis-3-Butil fentanil</b>							
Antinocicep. (0,14-0,40)	0,190 (0,143-0,254)	0,992	5,71 (-3,52-14,94)	0,06* (0,01-0,45)	20	50	6,53* (3,54-12,06)
Hiperterm. (0,81-3,24)	1,244 (0,725-2,136)	0,979	3,03 (-4,95-11,01)	0,08* (0,02-0,34)	30	90	

AD<sub>50</sub>=srednja efektivna doza (ED<sub>50</sub>) u izazivanju antinocicepcije. HD<sub>50</sub> = srednja efektivna doza (ED<sub>50</sub>) u izazivanju hipertermije.

Srednje efektivne doze za svaki efekt i svako jedinjenje, ra unato je koriš enjem 3 doze. Za svaku dozu koriš eno je po šest pacova.

(Litchfield & Wilcoxon I test).

\* Relativna ja ina i odnos HD<sub>50</sub> / ED<sub>50</sub> je statisti ki zna ajan kada 95% CL nije ve i od 1,0 (p < 0,05, Litchfield & Wilcoxon II test).

#### **IV.1.2. Derivati morfina: ja ina u izazivanju antinocicepcije i hipertermije**

Morfin (M; 1,053-3,165 mg/kg) i jedinjenja morfina: oksikodon (O; 0,258-0,601 mg/kg), tebakon (T; 0,4-1,084 mg/kg) i 6,14-etenomorfinan-7-metanol, 4,5-epoksi-6-fluoro-3-hidroksi-, , ,17-trimetil-, (5 ,7 ) (E; 0,037-0,049 mg/kg) doveli su do dozno-zavisnog pove anja antinocicepcije i hipertermije (Slika IV.2.). Za svaki ispitivani efekt, nagibi probit kriva za M, O, T i E nisu bili zna ajno razli iti ( $p > 0,05$ , test paralelizma, Tabela IV.1.2, slika IV.2.).

Srednje efektivne doze za antinocicepciju (AD<sub>50</sub>) i hipertermiju (HD<sub>50</sub>) i relativne ja ine derivata morfina su predstavljene u Tabeli IV.1.2.

Me u analozima morfina, redosled relativne analgeti ke ja ine bio je: E [56 (40,54-78,09)] > O [5 (2,81-9,32)] T [2,6 (1,76-3,96)] > M [1]. Sli no ovome, redosled relativne hipertermi ke ja ine bio je: E [37 (18,79-71,40)] > O [3 (1,47-6,18)] T [2,3 (1,05-5,19)] > M [1].

Me u derivatima morfina, doze koje izazivaju hipertermni odgovor nisu bile statisti ki zna ajno razli ite ( $p > 0,05$ ) od antinociceptivnih doza, osim za morfin [HD<sub>50</sub> /AD<sub>50</sub> = 0,49 (0,24-0,99);  $p < 0,05$ ]. Terapijski indeksi (HD<sub>50</sub> /AD<sub>50</sub>) su se kretali od 0,49 (0,24-0,99) do 0,83 (0,45-1,52) i nisu se statisti ki razlikovali izme u jedinjenja (Tabela IV.1.2).

Tabela IV.1.2.Srednje efektivne antinociceptivne i hipertermne doze ( $AD_{50}$  i  $HD_{50}$ ), koeficijent korelacije ( $r$ ), nagib probit krive, relativna ja ina, vreme dostizanja maksimalnog efekta, dužina trajanja efekta i terapijski indeksi za derivate fentanila kod pacova.

Efekt (raspon doza)	$AD_{50}$ i $HD_{50}$ (95% CL)	$r$	Nagib probit krive (95% CL)	Relativna ja ina (95% CL)	Maks. efekt (min)	Trajanje $AD_{50}$ ili $HD_{50}$ (min)	Terapijski indeks $HD_{50} / ED_{50}$ (95% CL)
<b>Morfin</b>							
Antinocicep. (1,053-3,165)	2,59 (1,89-3,55)	0,997	5,84 (0,41-11,27)	1	60	120	0,49* (0,24-0,99)
Hiperterm. (1,053-3,165)	1,27 (0,67-2,39)	0,787	2,35 (-21,09-25,81)	1	60	180	
<b>Oxikodon</b>							
Antinocicep. (0,258-0,601)	0,51 (0,30-0,84)	0,956	3,62 (-10,55-17,77)	5* (2,81-9,32)	10	60	0,83 (0,45-1,52)
Hiperterm. (0,258-0,601)	0,42 (0,30-0,59)	0,888	5,51 (-30,78-41,82)	3* (1,47-6,18)	30	90	
<b>Tebakon</b>							
Antinocicep. (0,4-1,084)	0,98 (0,76-1,27)	0,996	7,12 (-1,15-15,40)	2,6* (1,76-3,96)	30	60	0,55* (0,32-0,96)
Hiperterm. (0,4-1,084)	0,54 (0,33-0,89)	0,923	3,74 (-15,99-23,47)	2,3* (1,05-5,19)	30	120	
<b>6,14-Etenomorfinan-7-metanol, 4,5-epoksi-6-fluoro-3-hidroksi-<math>\gamma,\gamma</math>,17-trimetil-, (5<math>\gamma</math>,7<math>\gamma</math>)</b>							
Antinocicep. (0,037-0,049)	0,046 (0,042-0,051)	0,988	19,75 (-19,98-59,48)	56* (40,54-78,09)	10	60	0,75* (0,60-0,95)
Hiperterm. (0,037-0,049)	0,035 (0,028-0,043)	0,985	12,58 (-14,93-40,09)	37* (18,79-71,40)	30	90	

AD<sub>50</sub>=srednja efektivna doza (ED<sub>50</sub>) u izazivanju antinocicepcije. HD<sub>50</sub> = srednja efektivna doza (ED<sub>50</sub>) u izazivanju hipertermije. Srednje efektivne doze za svaki efekt i svako jedinjenje, računato je korišćenjem 3 doze. Za svaku dozu korišćeno je po šest pacova. (Litchfield & Wilcoxon I test).

\* Relativna jačina i odnos HD<sub>50</sub> / ED<sub>50</sub> je statistički značajan kada 95% CL nije veći od 1,0 (p < 0,05, Litchfield & Wilcoxon II test).

### **IV.1.3. Veličina dejstva fentanila i morfina na telesnu temperaturu**

Veličina hipertermnog odgovora bila je slična izmeću dve serije derivata. Srednje efektivne doze za hipertermiju (HD<sub>50</sub>) za F (0,094 mg/kg), CM (0,011 mg/kg), C (0,206 mg/kg), T (0,866 mg/kg) i B (1,244 mg/kg) izazvale su porast telesne temperature u odnosu na početne kontrolne vrednosti za  $1,19 \pm 0,16$ ,  $0,94 \pm 0,29$ ,  $1,10 \pm 0,25$ ,  $1,14 \pm 0,21$  i  $1,1 \pm 0,07$  °C, respektivno (nije prikazano). Srednje efektivne doze (HD<sub>50</sub>) za M (1,27 mg/kg), O (0,42 mg/kg), T (0,54 mg/kg) i E (0,035 mg/kg) povećale su telesnu temperaturu za  $1,14 \pm 0,09$ ,  $1,33 \pm 0,07$ ,  $1,24 \pm 0,06$  i  $0,91 \pm 0,08$  °C, respektivno (nije prikazano).

### **IV.1.4. Vreme postizanja maksimalnih antinociceptivnih i hipertermnih efekta derivata fentanila i morfina i dužina trajanja**

Kod obe grupe jedinjenja vreme dostizanja maksimalnog antinociceptivnog efekta bilo je kraće od vremena dostizanja maksimalnog hipertermnog efekta, a antinocicepcija je trajala kraće od hipertermije (Tabela IV.1.1). Takođe, meću derivatima fentanila efekti su poinjali brže i trajali kraće u poređenju sa derivatima morfina (Tabela IV.1.1). Hipertermija je trajala slično antinocicepciji u okviru svake serije derivata.

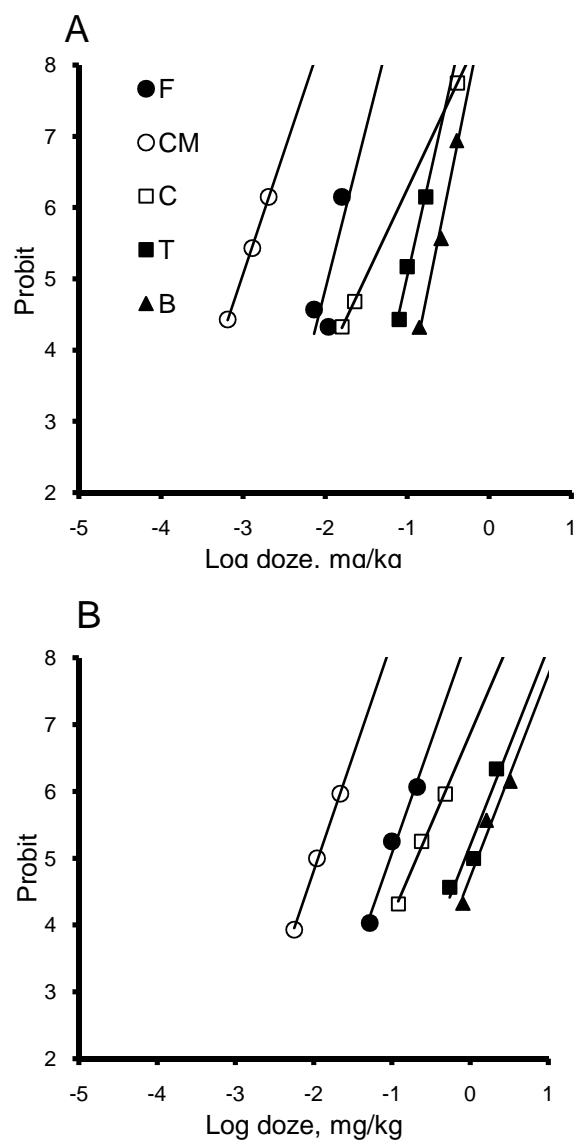
### **IV.1.5. Efekt naloksona na antinociceptivne i hipertermne efekte derivata fentanila i morfina**

Nalokson-hidrohlorid (2 mg/kg; sc) dat 15 min pre intraperitonealne injekcije opioida, poništavao je efekte svih ispitivanih supstanci (nije prikazano).

U grupama koje su dobijale analoge fentanila i morfina srednja vrednost po etne telesne temperature bila je  $38,24 \pm 0,05$  ( $n = 98$ ) i  $38,20 \pm 0,04$  ( $n = 72$ ), respektivno. Srednja vrednost po etne telesne temperature u kontrolnoj grupi (životinjama je dat fiziološki rastvor) bila je  $38,21 \pm 0,07$  °C ( $n = 24$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u po etnoj telesnoj temperaturi između u eksperimentalnih grupa, kao ni između u eksperimentalnih grupa i kontrola ( $p > 0,05$ ).

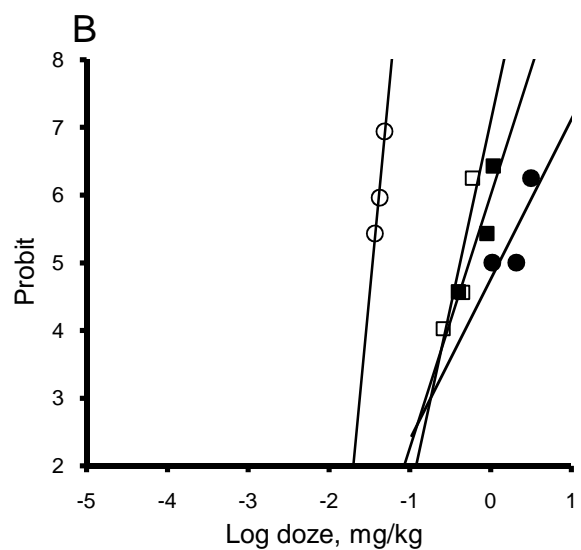
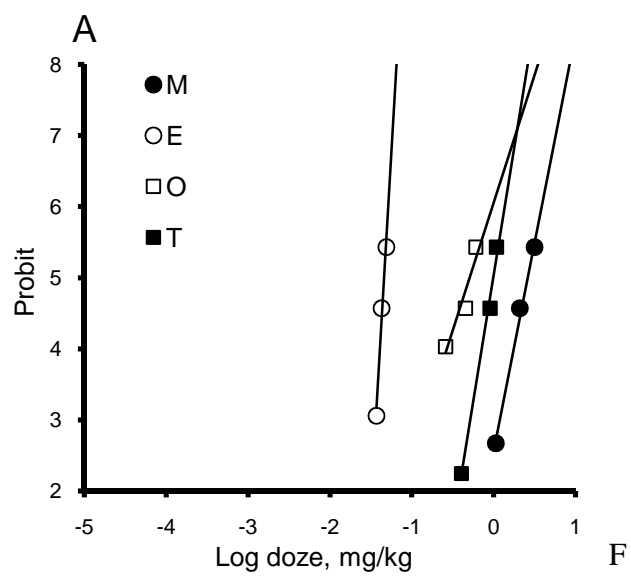
Srednje po etno latentno vreme u grupama koje su dobijale analoge fentanila i morfina, bilo je  $1,48 \pm 0,02$  s ( $n = 90$ ) i  $1,49 \pm 0,02$  s ( $n = 72$ ) respektivno. Srednja po etna vrednost u kontrolnoj grupi bila je  $1,50 \pm 0,08$  s ( $n = 20$ ). Po etna latentna vremena u testu povlačenja repa nisu se značajno razlikovala ( $p > 0,05$ ) između u eksperimentalnih grupa, kao ni između u eksperimentalnih grupa i kontrola.

U kontrolnim grupama koje su dobijale fiziološki rastvor, ipinjekcija fiziološkog rastvora (0,2 ml/kg) nije imala efekt ni na telesnu temperaturu, niti na latenciju kod potapanja repa ( $p > 0,05$ ).



Slika IV.1. Probit krive odnosa doze i efekta za antinocicepciju (A) i temperaturu (B) za fentanil (F), ( $\pm$ )-cis-3-metil fentanil (CM), ( $\pm$ )-cis-3-karbometoksi fentanil (C), ( $\pm$ )-trans-3-karbometoksi-fentanil (T) i ( $\pm$ )-cis-3-butyl-fentanil (B). Svaka ta ka predstavlja rezultat dobijen na 6-8 životinja.



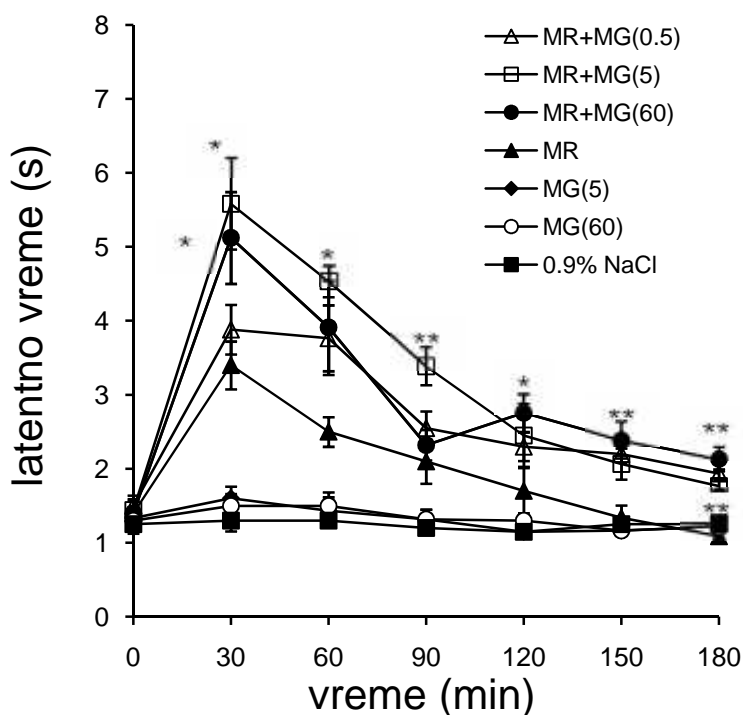


Slika IV.2. Probit krive odnosa doze i efekta za antinocicepciju (A) i temperaturu (B) za morfin (M), oksikodon (O), tabakon (T), 6,14-etenomorfinan-7-metanol, 4,5-epoksi-6-fluoro-3-hidroksi-, , ,17-trimetil-, (5 ,7 ) (E). Svaka ta ka predstavlja rezultat dobijen na 6-8 životinja.

## IV.2. Antinociceptivni efekt magnezijum sulfata, ketamina, morfina i njihovih kombinacija

### IV.2.1. Efekt magnezijuma sulfata na antinocicepciju izazvanu morfinom

Magnezijum sulfat (5 i 60 mg/kg, s.c.) nema antinociceptivni efekt u testu potapanja repa u toplu vodu. Magnezijum sulfat potencira efekt morfina. Doze magnezijum sulfata 5 i 60 mg/kg (s.c.) potenciraju antinocicepciju izazvanu morfinom (2,6 mg/kg, i.p.) (Slika IV.2.1.). Doza 0,5 mg/kg magnezijum sulfata nije imala efekt na morfinску analgeziju. Maksimalni efekt samog morfina, kao i kombinacija morfin-magnezijum sulfat javlja se 30 minuta nakon davanja leka i traje 90 (MR+MG5) i 180 minuta (MR+MG60). Ne postoji razlika izme u testiranih grupa ( $p>0,05$ ) u pogledu bazalnih latentnih vremena.

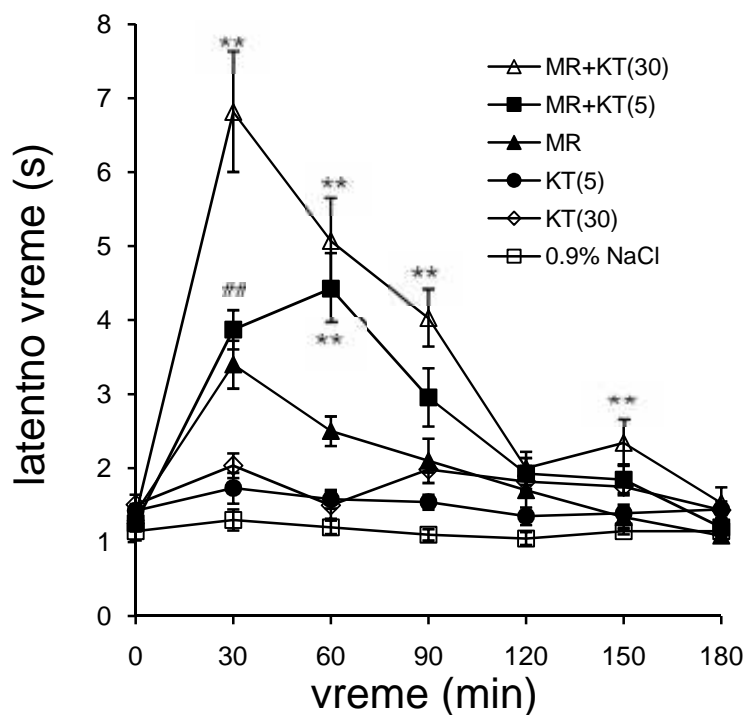


Slika IV.2.1. Vremenski tok antinociceptivnog dejstva morfina, magnezijum sulfata i kombinacije morfin-magnezijum sulfat. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM

antinociceptivnog dejstva izraženog u sekundama na 6-8 životinja. Statisti ka zna ajnost je dobijena u pore enju sa morfinom (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

#### IV.2.2. Efekt ketamina na antinocicepciju izazvanu morfinom

U testu potapanja repa u toplu vodu, ketamin (5 i 30 mg/kg, i.p.), potencira antinocicepciju izazvanu morfinom (2,6 mg/kg, i.p.) (Slika IV.2.2.). Ketamin (5 i 30 mg/kg, i.p.) primenjen sam nema antinociceptivno dejstvo. Maksimalni efekt morfina kao i kombinacije morfin-ketamin, nastaje nakon 30-60 minuta nakon davanja leka i traje 90 minuta (morfin), 120 minuta (morfin-ketamin 5 mg/kg) i 150 minuta (morfin-ketamin 30 mg/kg) (Slika IV.2.2.). Pacovi su se kretali u krug i klatili glavu kada im je dat ketamin u dozi od 30 mg/kg. Ne postoji razlika izme u testiranih grupa u pogledu bazalnih latentnih vremena ( $p > 0,05$ ).



Slika IV.2.2. Vremenski tok antinociceptivnog dejstva morfina, ketamina i kombinacije morfin-ketamin. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM antinociceptivnog dejstva izraženog u sekundama na 6-8 životinja. Statisti ka zna ajnost je dobijena u pore enju sa morfinom (\*\* $p < 0,01$ ). Postoji i statisti ka zna ajnost izme u kombinacija sa razli itom dozom ketamina, morfin-ketamin (5 mg/kg) i morfin-ketamin (30 mg/kg) (<sup>##</sup> $p < 0,01$ ).

### **IV.2.3. Sinergizam izme u ketamina i magnezijum sulfata u testu potapanja repa u toplu vodu**

Ispitivane su kombinacije razli itih doza ketamina (2,5; 5; 10 mg/kg) i magnezijum sulfata (2,5; 5; 10 mg/kg) u razli itim odnosima (0,5:1, 1:1 i 2:1). Sinergizam izme u ketamina i magnezijum sulfata u testu potapanja repa u toplu vodu, javlja se pri slede im dozama ketamin-magnezijum sulfata: 2,5 : 5, 5 : 5 i 10 : 5 mg/kg (Slika IV.2.3.A-C). Nije utvr ena dozna-zavisnost izme u ovih kombinacija. Sam ketamin (2,5, 5 i 10 mg/kg) i sam magnezijum sulfat (5 mg/kg) nisu imali efekt u izazivanju antinocicepcije.

*Kombinacija ketamin (2,5 mg/kg) i magnezijum sulfat (5 mg/kg) (0,5:1)*

Kombinacija ketamina (2,5 mg/kg) i magnezijum sulfata (5 mg/kg) dovodi do zna ajnog antinociceptivnog dejstva, bez obzira da li je ketamin (2,5 mg/kg) dat pre ili posle magenzijuma (5 mg/kg) (IV.2.3.A). Redosled davanja lekova, nema uticaj na veli inu efekta kombinacije. Efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat statisti ki je zna ajno ve i u odnosu na sam ketamin u 30, 60, 90, 120 min ( $p < 0,01$ ). Efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat je statisti ki zna ajno ve i u odnosu na sam magnezijum sulfat u 30, 60, 90 i 120 min ( $p < 0,01$ ).

Efekt kombinacije magnezijum sulfat-ketamin je zna ajno ve i u odnosu na ketamin u 30, 90 i 120 min ( $p < 0,05$ ), a u odnosu na magnezijum sulfat u 90 i 120 min (nije prikazano) ( $p < 0,05$ ).

*Kombinacija ketamin (5 mg/kg) i magnezijum sulfat (5 mg/kg) (1:1)*

Bez obzira da li je ketamin primenjen pre ili posle magnezijum sulfata, statisti ki zna ajna razlika u antinocicepciji je postignuta u pore enju sa samim ketaminom ili magnezijum

sulfatom (IV.2.3.B). Statisti ki zna ajno ve i antinociceptivni efekt se postiže kada se ketamin (5 mg/kg, i.p.) da pre magnezijum sulfata (5 mg/kg, s.c.) ( $p < 0,01$ ).

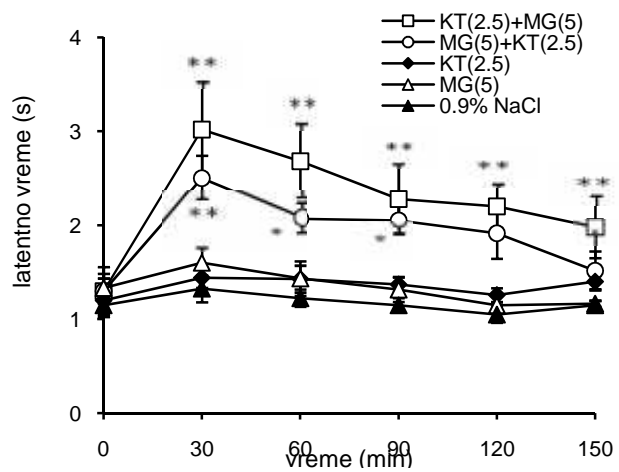
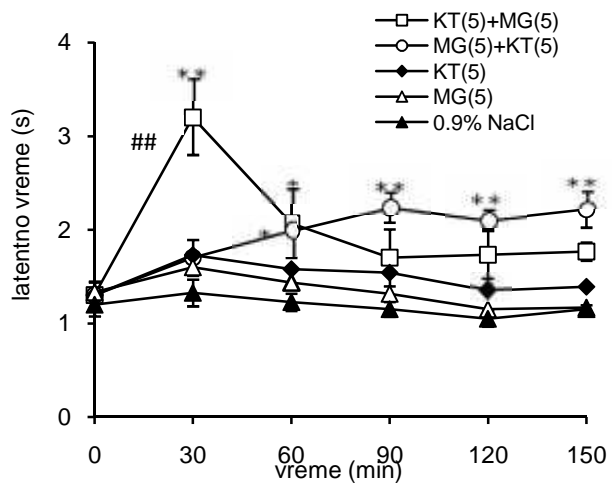
Efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat je statisti ki zna ajno ve i u odnosu na ketamin u 30 min ( $p < 0,01$ ). Efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat je statisti ki zna ajniji u odnosu na magnezijum sulfat u 30 i 150 min ( $p < 0,01$ ).

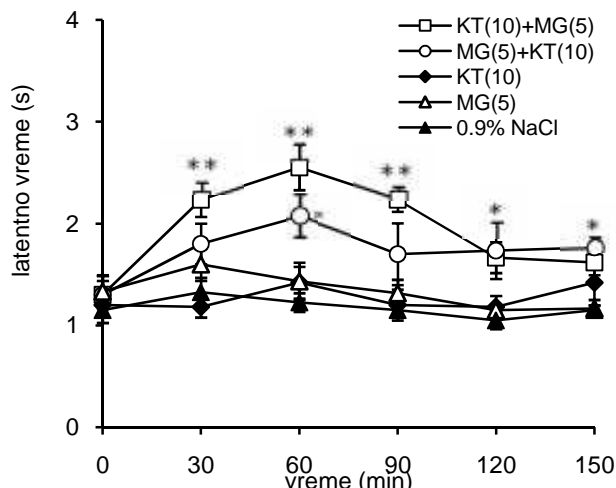
Efekt kombinacije magnezijum sulfat-ketamin je statisti ki zna ajno ve i u odnosu na ketamin u 90 ( $p < 0,05$ ), 120 i 150 min ( $p < 0,01$ ), a u odnosu na magnezijum sulfat u 90, 120 i 150 min ( $p < 0,01$ ).

*Kombinacija ketamin (10 mg/kg) i magnezijum sulfat (5 mg/kg) (2:1)*

Ne postoji razlika u maksimalnom antinociceptivnom efektu izme u kombinacija ketamin (10 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg) i magnezijum sulfat (5 mg/kg)-ketamin (10 mg/kg)(IV.2.3.C). Obe kombinacije izazivaju statisti ki zna ajno ve i efekt u pore enju sa ketaminom ili magnezijum sulfatom ( $p < 0,05$ ).

Efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat je statisti ki zna ajno ve i u odnosu na ketamin u 30, 60, 90 ( $p < 0,01$ ) i 120 min ( $p < 0,05$ ). Efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat je statisti ki zna ajno ve i u odnosu na magnezijum sulfat u 30, 60, 90 ( $p < 0,01$ ), 120 i 150 min ( $p < 0,05$ ). Efekt kombinacije magnezijum sulfat-ketamin je statisti ki zna ajno ve i u odnosu na ketamin u 60 i 90 min ( $p < 0,05$ ), a u odnosu na magnezijum sulfat u 60, 120 i 150 min ( $p < 0,05$ ).

**A****B**

**C**

Slika IV.2.3. A-C. Vremenski tok antinociceptivnog dejstva ketamina, magnezijum sulfata i kombinacije ketamin-magnezijum sulfat. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM antinociceptivnog dejstva izraženog u sekundama na 6-8 životinja. Statisti ka zna ajnost je dobijena pore enjem kombinacije ketamin-magnezijum sulfata sa 0,9%NaCl (\*\* $p<0,01$ , \* $p<0,05$ ). Postoji i statisti ka zna ajnost izme u kombinacija ketamin-magnezijum sulfat i magnezijum sulfat-ketamin ( $^{\#}p<0,01$ ).

#### **IV.2.4. Uticaj kombinacija ketamin-magnezijum sulfati magnezijum sulfat-ketamin na antinocicepciju izazvanu morfinom u testu potapanja repa u toplu vodu**

Antinociceptivno dejstvo morfina (2,6 mg/kg) kao i kombinacije morfin (2,6 mg/kg)-ketamin (5 mg/kg) može biti pove ano dodavanjem magnezijum sulfata 15 minuta nakon davanja morfina i ketamina ( $p<0,01$ ) (IV.2.4. A i B).

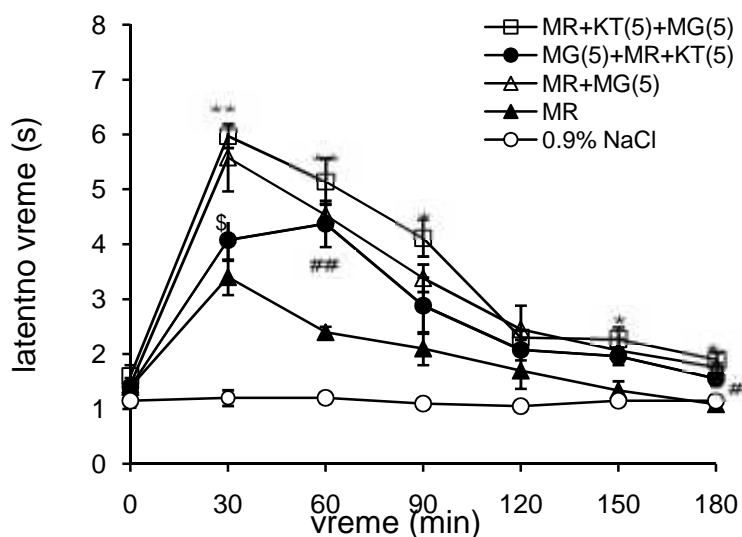
Kada se kombinaciji morfina (2,6 mg/kg) i ketamina (5 mg/kg, i.p.) doda magnezijum sulfat (5 mg/kg, s.c.) 15 minuta kasnije, dobija se antinociceptivni efekat koji je statisti ki zna ajno ve i u odnosu na efekat samog morfina ( $p<0,01$ ) ili u odnosu na kombinaciju morfin-ketamin ( $p<0,01$ ). Me utim, ne postoji statisti ki zna ajna razlika izme u ove kombinacije i kombinacije morfin-magnezijum sulfat (Slika IV.2.4. A-B). Antinocicepcija

izazvana kombinacijom morfin-ketamin-magnezijum sulfat je nešto ve a, ali ne i statisti ki zna ajno ve a od antinocicepcije izazvane kombinacijom morfin-magnezijum sulfat ( $p>0,05$ ) (Slika IV.2.4.A).

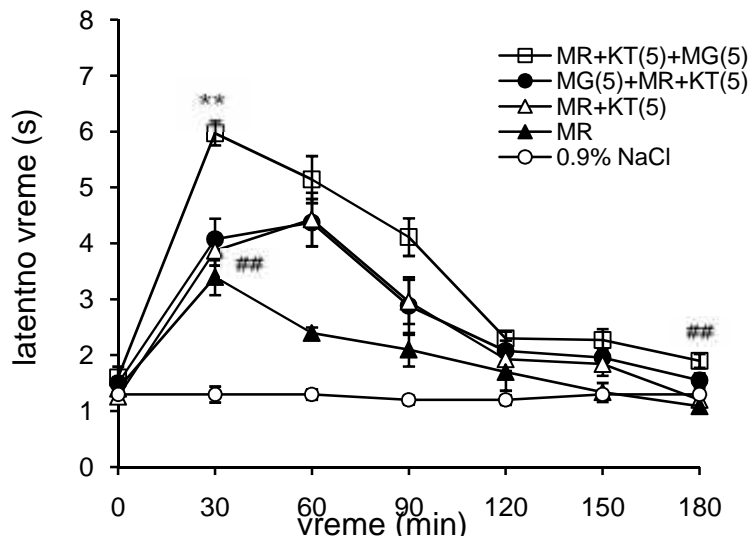
Magnezijum sulfat primenjen 15 minuta pre kombinacije morfin-ketamin nije statisti ki zna ajno pove ao antinocicepciju u pore enju sa kombinacijom morfin-ketamin ( $p>0,05$ ) (Slika IV.2.4.B).

Efekt kombinacije male doze morfina (2,6 mg/kg), ketamina (2,5 ili 5 mg/kg) i magnezijum sulfata (5 mg/kg) zavisi od redosleda davanja injekcija ketamina i magnezijum sulfata ( $p<0,01$ ) (Slika IV.2.4.C). Pore enjem maksimalne vrednosti antinocicepcije izme u kombinacija morfin-ketamin-magnezijum sulfat sa 2,5 i 5 mg/kg ketamina, nije utvr ena statisti ki zna ajna razlika ( $p>0,05$ ).

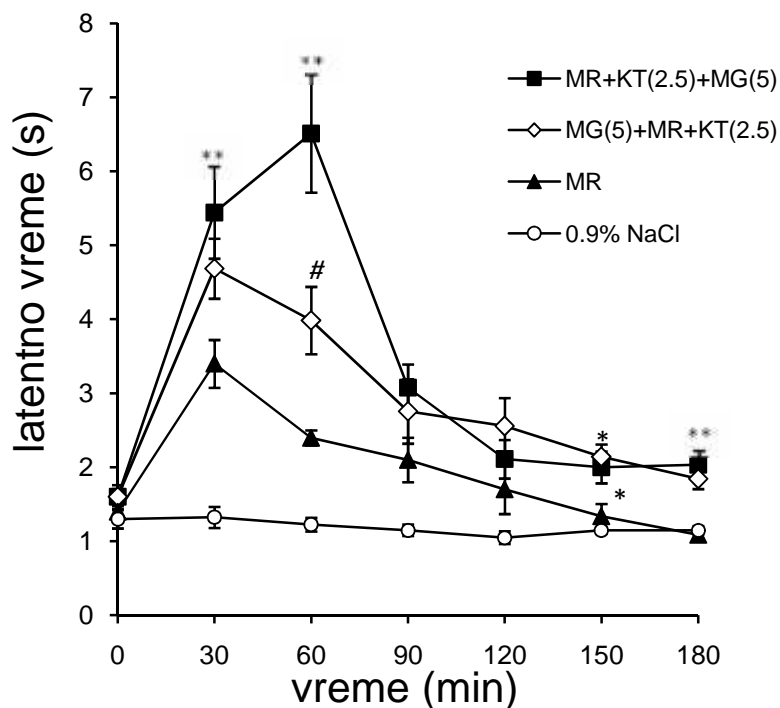
**A**





**B**

Slika IV.2.4. A-B. Vremenski tok antinociceptivnog dejstva kombinacije morfin (2,6 mg/kg)- ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg). Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM antinociceptivnog dejstva izraženog u sekundama na 6-8 životinja. Statisti ka zna ajnost je dobijena pore em: (A) kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat i morfina (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ), kao i pore enjem kombinacije magnezijum sulfat-morfin-ketamin i morfina ( $\#p < 0,05$ ,  $\#\#p < 0,01$ ) i kombinacije magnezijum sulfat-morfin-ketamin i morfin-magnezijum sulfat ( $\$p < 0,05$ ) (B) kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat i magnezijum sulfat-morfin-ketamin (\*\* $p < 0,01$ ), kao i morfin-ketamin-magnezijum sulfat i morfin-ketamin ( $\#\#p < 0,01$ ).

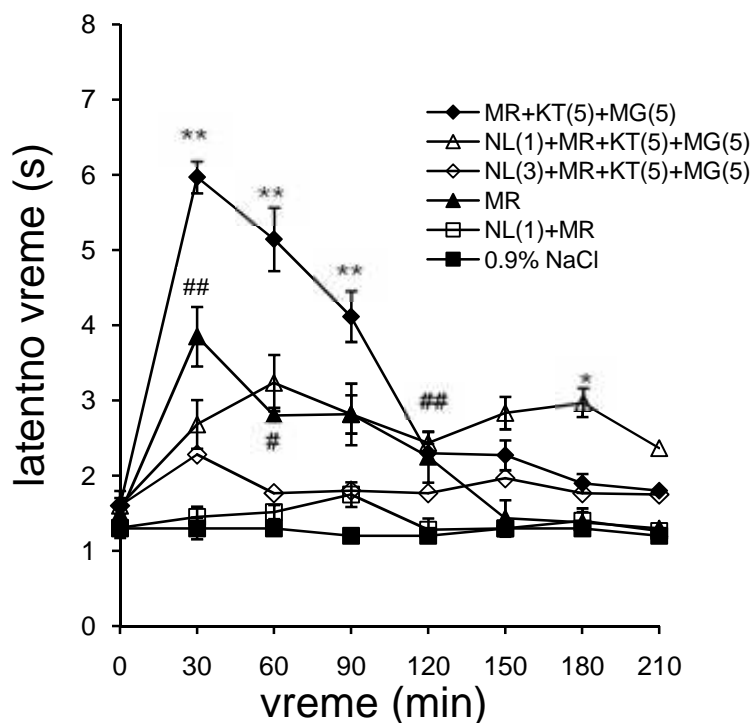


Slika IV.2.4.C. Vremenski tok antinociceptivnog dejstva kombinacije morfin (2,6 mg/kg)-ketamin (2,5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5mg/kg). Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM antinociceptivnog dejstva izraženog u sekundama na 6-8 životinja. Statisti ka zna ajnost je dobijena pore em kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat sa morfinom (\*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ). Postoji i statisti ka zna ajnost izme u kombinacija morfin-ketamin-magnezijum sulfat kada se magnezijum sulfat primeni pre i posle ketamina (# $p < 0,05$ ).

#### IV.2.5. Dejstvo naloksona na kombinaciju morfin-ketamin-magnezijum sulfat

Antinociceptivni efekt kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat antagonizovan je naloksonom. Nalokson u dozi od 1 mg/kg nije potpuno antagonizovao antinociceptivni

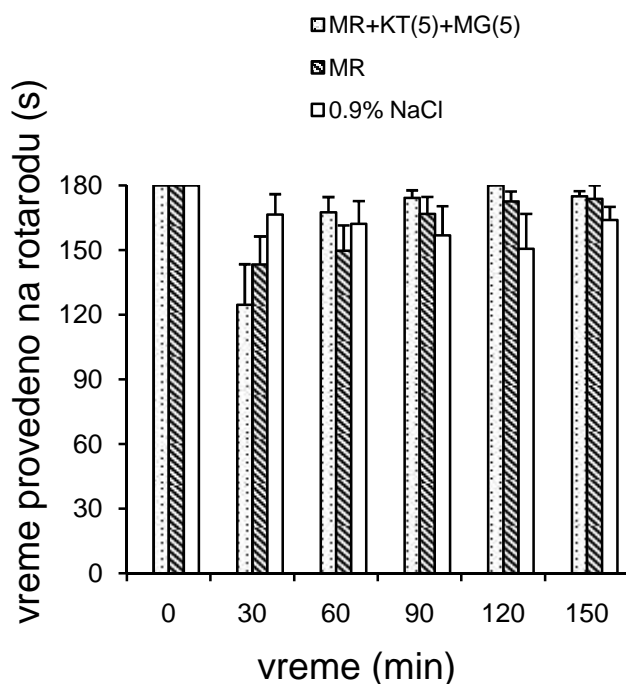
efekt kombinacije. Veće doze naloksona (3 mg/kg, s.c.) su bile potrebne da bi se antagonizovao efekt kombinacije ( $p < 0,01$ ) (Slika IV.2.5.)



Slika IV.2.5. Vremenski tok antagonističkog dejstva naloksona (1 i 3 mg/kg) na kombinaciju morfin (2,6 mg/kg)- ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5mg/kg). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM antinociceptivnog dejstva izraženog u sekundama na 6-8 životinja. Statistička značajnost je dobijena poređenjem kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat sa nalokson(3)-morfin-ketamin-magnezijum sulfat kombinacijom (\*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ), kao i između morfina i morfin-nalokson kombinacije (# $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ ).

#### IV.2.6. Dejstvo kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat na motornu spretnost pacova

Kombinacija male doze morfina (2,6 mg/kg), ketamina (5 mg/kg) i magnezijum sulfata (5 mg/kg) nije uticala na motornu spretnost pacova. Naime, vreme koje su pacovi (kojima je data ova kombinacija) proveli na rotarodu, nije se statisti ki zna ajno razlikovalo od kontrolne grupe životinja (IV.2.6). Vreme posmatranja bilo je 150 minuta.

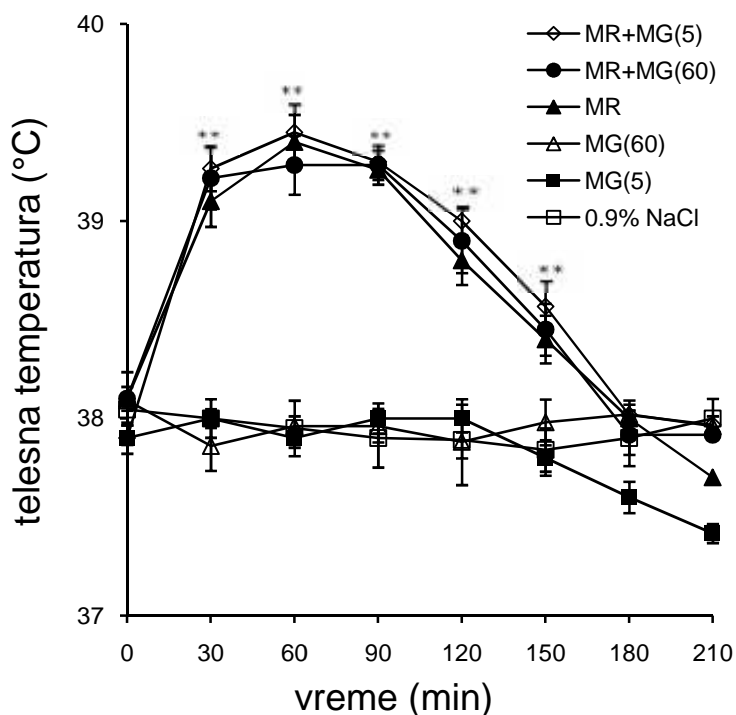


Slika IV.2.6. Efekt kombinacije morfin (2,6 mg/kg)- ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg) na motornu koordinaciju, koriš enjem rotarod testa. Stubi i predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM vremena koji pacovi provedu na rotarodu izraženog u sekundama na 8 životinja. Ne postoji statisti ka zna ajnost izme u grupa koje su ispitivane.

### IV.3. Efekt magnezijum sulfata, ketamina, morfina i njihovih kombinacija na telesnu temperaturu pacova

#### IV.3.1. Efekt magnezijum sulfata na bazalnu temperaturu i na morfinску hipertermiju

Morfin (2,6 mg/kg, ip) značajno povećava telesnu temperaturu pacova (Slika IV.3.1). Efekt nastaje u 30 minuta, maksimalnu vrednost postiže u 60 minuta, a hipertermija traje 150 minuta nakon intraperitonealne injekcije morfina. Hipertermija izazvana morfinom je praćena „rebound“ hipotermijom (Slika IV. 3.4.1). Magnezijum sulfat (5 i 60 mg/kg, sc), ne utiče na bazalnu temperaturu. Takođe, magnezijum ne utiče na hipertermiju izazvanu morfinom.

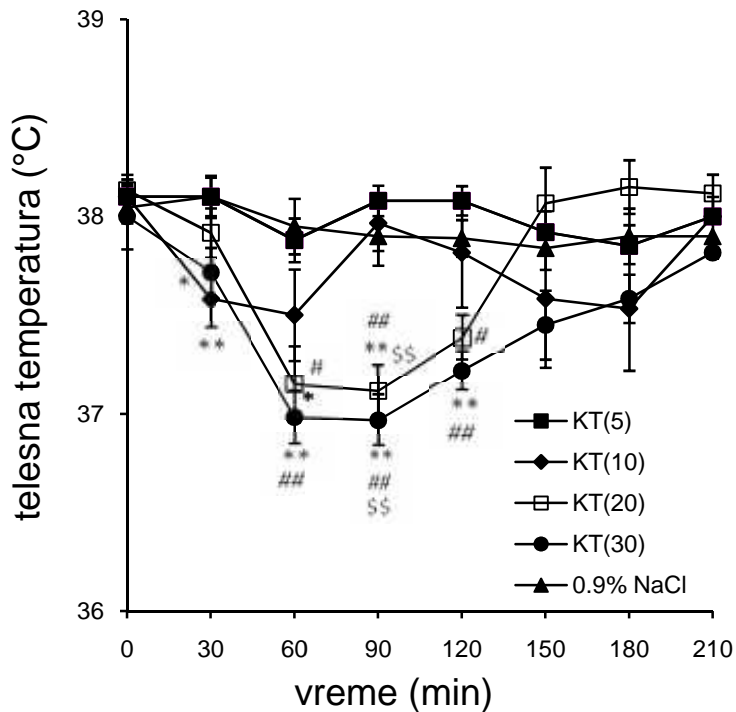


Slika IV.3.1. Vremenski tok efekta morfina (MR, 2,6 mg/kg, ip), magnezijum sulfata (MG, 5 i 60 mg/kg, sc) i njihove kombinacije na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka

predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Postoji statistički značajna razlika između morfina i 0,9% NaCl (\*\* $p < 0.01$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### **IV.3.2. Efekt ketamina na bazalnu temperaturu**

Ketamin (5-30 mg/kg, ip) je dat u četiri doze. Sa povećanjem doze, dolazi do povećanja hipotermije. Ketamin smanjuje telesnu temperaturu na dozo-zavisno na in (Slika IV.3.2). Ketamin u dozi 5 mg/kg nije uticao na telesnu temperaturu pacova ( $p > 0,05$ ), dok su doze 10, 20 i 30 mg/kg (ip) značajno smanjile telesnu temperaturu u poređenju sa 0,9% NaCl, kao i u poređenju sa najnižom dozom ketamina (5 mg/kg) ( $p < 0,01$ ). U poređenju sa 0,9% NaCl, doze od 10, 20 i 30 mg/kg ketamina maksimalno snižavaju telesnu temperaturu za 0,5, 0,8 i 1,0 $^{\circ}\text{C}$ . Maksimalni efekt ketamina javlja se u 60-90 minuta, a trajanje hipotermnog efekta je 120 minuta. Srednja efektivna vrednost ketamina ( $\text{ED}_{50}$ ) je 10,5 (4,9-22,53) mg/kg, izračunata je na osnovu probit krive odnosa doze i efekta (nije prikazano).



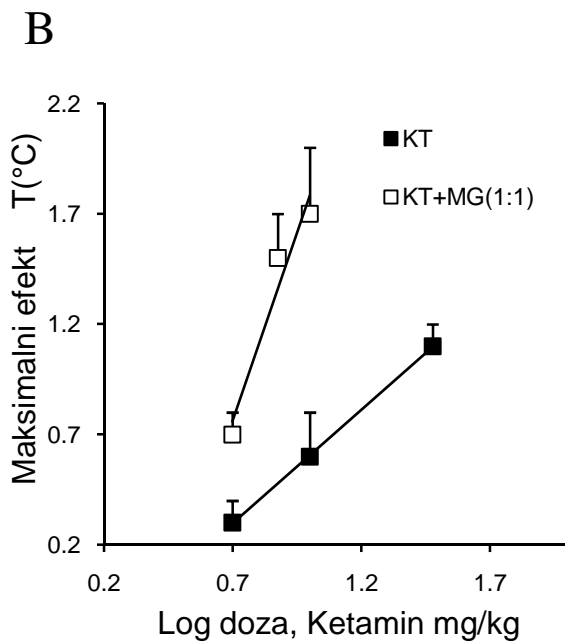
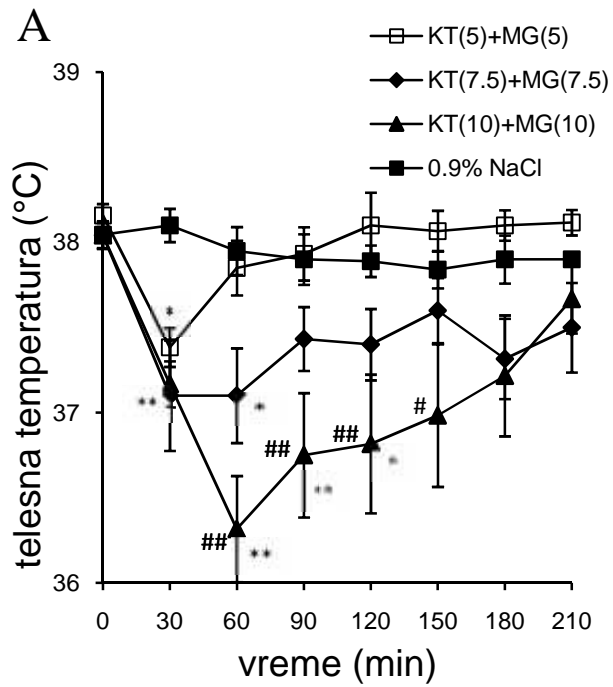
Slika IV.3.2. Vremenski tok efekta ketamina (KT, 5, 10, 20 i 30 mg/kg, ip) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Postoji statisti ki zna ajna razlika izme u ketamina i 0,9% NaCl (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ), izme u KT(5) i KT(20)/KT(30) (# $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ ), i izme u KT(10) i KT(20)/KT(30) (\$\$ $p < 0,01$ )(One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

### **IV.3.3. Efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat na telesnu temperaturu pacova**

#### **IV.3.3.1. Ketamin-magnezijum sulfat u masenom odnosu doza 1:1 (rastu e doze obe komponente u dozama 5, 7,5 i 10 mg/kg)**

Ispitivana je kombinacija ketamina i magnezijum sulfata u masenom odnosu doza 1:1. Kombinacija ovih lekova u masenom odnosu doza 1:1, pokazuje doznu-zavisnost u snižavanju telesne temperature. Slika IV.3.3.1.A. prikazuje vremenski tok dejstva kombinacije ketamin-magnezijum sulfat na telesnu temperaturu pacova. Slika IV.3.3.1.B. predstavlja krivu odnosa doze i efekta tj. maksimalnu promenu telesne temperature usled dejstva kombinacije ketamin-magnezijum (u masenom odnosu doza 1:1). Doze od 5, 7,5 i 10 mg/kg obe komponente smanjile su telesnu temperaturu za 0,7, 0,9 i 1,7°C (Slika IV.3.3.1.A.). Kriva odnosa doze i efekta ketamina u prisustvu magnezijuma pomerena je ulevo, u odnosu na sam ketamin. Postoji značajno, neparalelno pomeranje krive kombinacije ketamin-magnezijum ulevo u poređenju sa krivom odnosa doze i efekta za ketamin (5, 10, 20 i 30 mg/kg) ( $p < 0,05$ , test paralelizma) ( $p < 0,05$ , test za ispitivanje relativne jačine). Ovi rezultati ukazuju da magnezijum sulfat potencira hipotermiju izazvanu ketaminom (Slika IV.3.3.1.B). Krive odnosa doze i efekta su divergentne i potenciranje efekta ketamina se jasno vidi u dozi od 5 mg/kg i više, ukazuju i na potenciranje efekta ketamina u prisustvu magnezijum sulfata od 5,3 (3,2-58,2) puta (Slika IV.3.3.1.B.).





Slika IV.3.3.1. A) Vremenski tok efekta kombinacije ketamin-magnezijum sulfat u masenom masenom odnosu doza 1:1 (rastu e doze 5, 7,5 i 10 mg/kg obe komponente) na

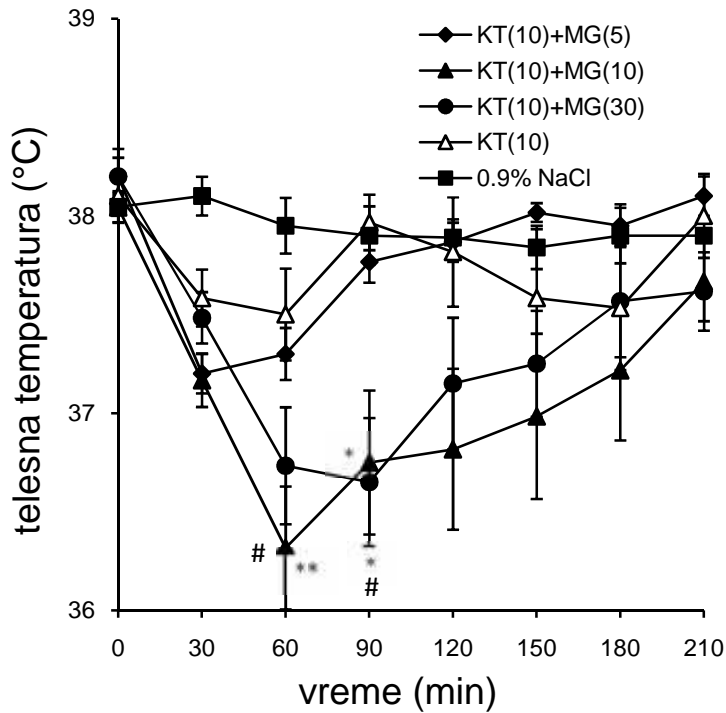
telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Postoji statisti ki zna ajna razlika izme u kombinacija ketamin-magnezijum i 0,9% NaCl ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ), i izme u KT(5)+MG(5) i KT(10)+MG(10) ( $\#p < 0,05$ ,  $\#\#p < 0,01$ )(One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

B) Krive odnosa doze i efekta za ketamin (KT, 5, 10, 20 i 30 mg/kg; ip) i kombinaciju ketamina (5, 7,5 i 10 mg/kg; ip) i magnezijum sulfata (MG, 5, 7,5 i 10 mg/kg; sc) u odnosu (1:1) na telesnu temperaturu kod pacova. Podaci su izraženi kao srednja vrednost maksimalne promene telesne temperature ( $T$   $^{\circ}\text{C}$ ) u odnosu na kontrolu (0,9% NaCl). Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) dobijenu na 6-8 pacova.

#### **IV.3.3.2. Ketamin-magnezijum sulfat u odnosu doza 1: 0,5, 1:1 i 1:3 (fiksna doza ketamina 10 mg/kg sa rastu im dozama magnezijum sulfata 5, 10 i 30 mg/kg)**

U ovom delu eksperimenata, kombinovali smo fiksnu dozu ketamina i to srednju efektivnu dozu, ED50 (10 mg/kg, ip) sa tri razli ite doze magnezijum sulfata (5, 10 i 30 mg/kg, ip). Pokazali smo da magnezijum sulfat u dozi od 10 i 30 mg/kg ( $p < 0,05$ ) statisti ki zna ajno pove ava hipotermni efekt ketamina za 1,2 i 0,8  $^{\circ}\text{C}$ . Ovi rezultati ukazuju da se sinergisti ka reakcija izme u ketamina i magnezijum sulfata pojavljuje u proporciji 1:1 i 1:3 (Slika IV.3.3.2). Izgleda da daljim pove anjem doze magnezijum sulfata ne dolazi da daljeg pove anja hipotermije. U nižoj proporciji 1:0,5, magnezijum sulfat nije statisti ki zna ajno uticao na ketamin (10 mg/kg), i ovaj rezultat nam ukazuje na prag efekta. U ovim eksperimentima, koriš en je fiksni odnos dve supstance, kako se radi u rigoroznim statisti kim analizama za dokazivanje sinergizma (Tallarida i sar., 2003). Ovim eksperimentima je pokazano da kombinacija ketamin-magnezijum sulfat u odnosu 1:1 i kad je maseni udeo magnezijum sulfata ve i, ispoljava sinergizam u dejstvu na telesnu temperaturu kod pacova. Pokazano je da postoji sinergizam na osnovu statisti ki ve eg efekta ketamina (10 mg/kg) u kombinaciji sa magnezijum sulfatom u pore enju sa istom

dozom ketamina kada se primeni sam.

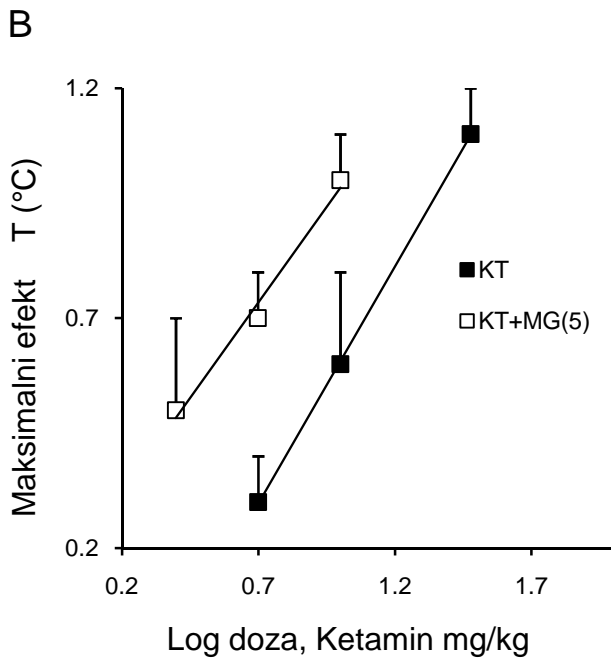
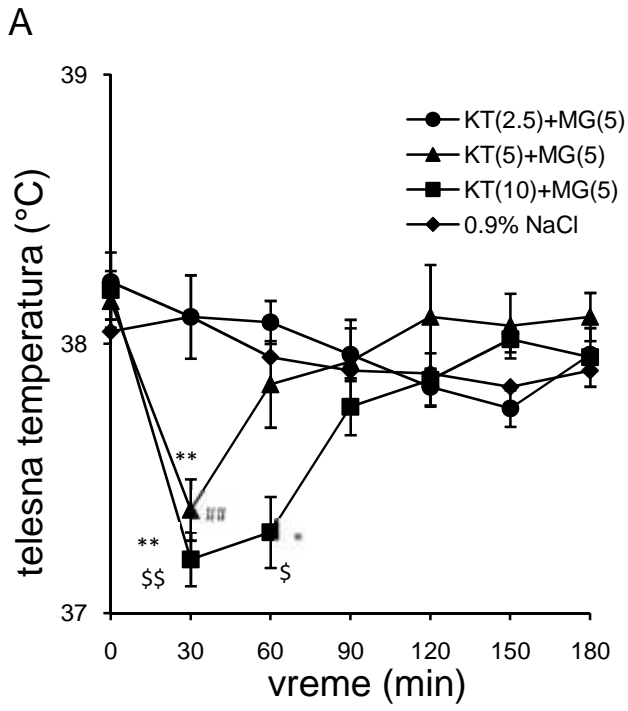


Slika IV.3.3.2. Vremenski tok efekta kombinacije ketamin-magnezijum sulfat u masenom odnosu doza 1: 0,5, 1:1 i 1:3 (fiksna doza ketamina 10 mg/kg sa rastu im dozama magnezijum sulfata 5, 10 i 30 mg/kg) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}$ C) na 6–8 pacova. Postoji statisti ki zna ajna razlika izme u kombinacija ketamin-magnezijum i 0,9% (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ), i izme u KT(10)+MG(5) i KT(10)+MG(10)/KT(10)+MG(30) (# $p < 0,01$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### **IV.3.3.3. Ketamin-magnezijum sulfat u masenom odnosu doza 0,5:1, 1:1 i 2:1 (rastu e doze ketamina 2,5, 5 i 10 mg/kg sa fiksnom dozom magnezijum sulfata 5 mg/kg)**

Ketamin (2,5, 5 i 10 mg/kg, ip), kome je dodat magnezijum sulfat (5 mg/kg, sc), smanjuje telesnu temperaturu na dozno-zavistan na in (Slika IV.3.3.3.A.). Doza od 2,5 mg/kg ketamina sa magnezijum sulfatom, nije dala statisti ki zna ajno razli it efekt u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p>0,05$ ). Me utim, ketamin (5 i 10 mg/kg), kome je dodat magnezijum sulfat smanjuje telesnu temperaturu za  $0,7^{\circ}\text{C}$  i  $0,9^{\circ}\text{C}$  ( $p<0,05$ ) (Slika IV.3.3.3.A.). Maksimalni efekt kombinacije postiže se u 30 minutu. Efekti ketamina u dozama od 5 i 10 mg/kg, u kombinaciji sa magnezijum sulfatom traju 30 odnosno 60 minuta jedno za drugim.

Krive odnosa doze i efekta za ketamin (5, 10, 20 i 30 mg/kg, ip) i ketamin (2,5, 5 i 10 mg/kg, ip) u kombinaciji sa fiksnom dozom magnezijum sulfata (5 mg/kg, sc) su nacrtane i upore ene (Slika IV.3.3.3.B.). Kriva odnosa doze i efekta za ketamin u prisustvu magnezijuma je pomerena ulevo u odnosu na krivu ketamina ( $p<0,05$  test relativne ja ine). Ovo ukazuje na potenciranje eekta ketamina u prisustvu magnezijum sulfata u snižavanju telesne temperature kod pacova. Odnos ja ina je 2,5 (CL 2,1-3,0), što ukazuje da se radi o sinergisti koj reakciji. Nagibi krivih se statisti ki ne razlikuju, što je utvr eno testom paralelizma ( $p>0,05$ , test paralelizma).



Slika IV.3.3.3. A) Vremenski tok efekta kombinacije ketamin-magnezijum sulfat u masenom odnosu doza 0,5:1, 1:1 i 2:1 (rastu e doze ketamina 2,5, 5 i 10 mg/kg sa fiksnom dozom magnezijum sulfata 5 mg/kg) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Postoji statisti ki zna ajna razlika izme u kombinacija ketamin-magnezijum i 0,9% NaCl ( $^{*}p < 0,05$ ,  $^{**}p < 0,01$ ), i izme u KT(2,5)+MG(5) i KT(5)+MG(5) ( $^{\#\#}p < 0,01$ ), i izme u KT(2,5)+MG(5) i KT(10)+MG(5) ( $^{\$}p < 0,05$ ,  $^{\$\$}p < 0,01$ )(One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

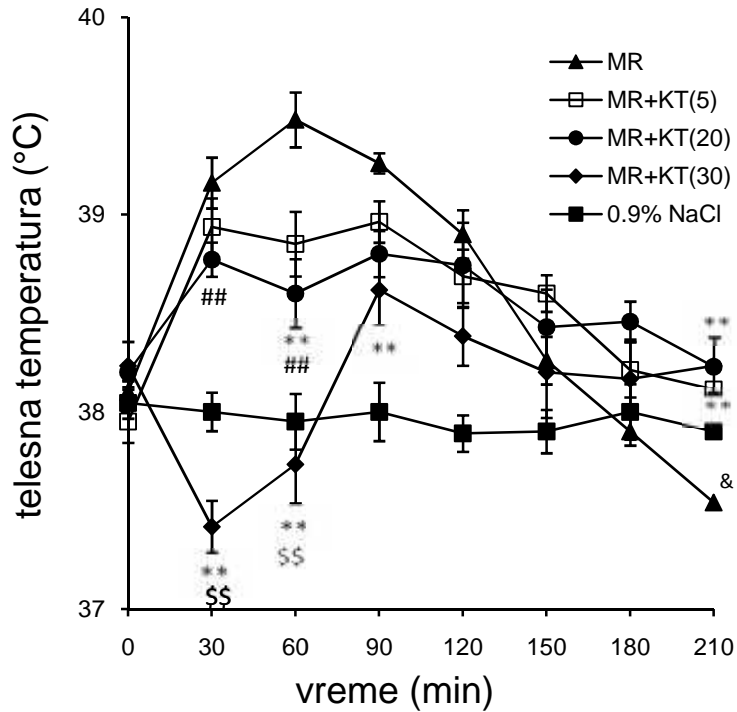
B) Krive odnosa doze i efekta za ketamin (KT, 5, 10, 20 i 30 mg/kg; ip) i kombinaciju ketamina (2,5, 5 i 10 mg/kg; ip) i magnezijum sulfata (MG, 5 mg/kg; sc) na telesnu temperaturu kod pacova. Podaci su izraženi kao srednja vrednost promene maksimalne temperature ( $T^{\circ}\text{C}$ ) u odnosu na kontrolu (0,9% NaCl). Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM  $T^{\circ}\text{C}$  dobijenu na 6-8 pacova.

#### **IV.3.4. Efekti ketamina i magnezijum sulfata na morfinsku hipertermiju**

##### **IV.3.4.1. Efekti ketamina na morfinsku hipertermiju**

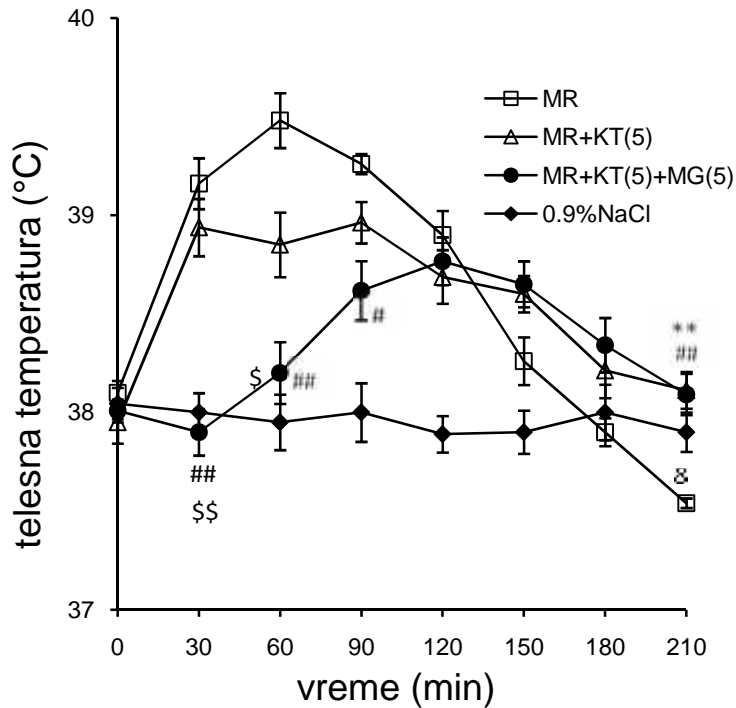
Kod pacova ketamin (5, 20 i 30 mg/kg, ip) smanjuje morfinsku hipertermiju na dozno-zavistan na in (Slika IV.3.4.1.A). Doze od 5, 20 i 30 mg/kg smanjuju morfinsku hipertermiju za 0,6, 0,9 i 1,8 $^{\circ}\text{C}$ . Maksimalni efekt kombinacije ketamin (20 mg/kg)-morfin javlja se u 60 minutu nakon davanja morfina. Kombinacija ketamin (30 mg/kg)-morfin pretvara morfinsku hipertermiju u hipotermiju. Ova kombinacija postiže maksimalni efekt u 30 minutu i traje 90 minuta. Ketamin, kao i kombinacija ketamin-magnezijum prevenira hipotermiju koja prati morfinsku hipertermiju kod pacova (Slika IV.3.4.1.A i IV.3.4.1.B).

A



Slika IV.3.4.1.A. Vremenski tok efekta ketamina (KT, 5, 20 i 30 mg/kg, ip) na morfinom (MR, 2.6 mg/kg, ip) izazvanu hipertermiju kod pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}$ C) na 6–8 pacova. Postoji statisti ki zna ajna razlika izme u MR i MR+KT (\*\* $p < 0,01$ ), izme u MR+KT(20) i MR+KT(30) (## $p < 0,01$ ), i izme u MR+KT(5) i MR+KT(30) (\$\$ $p < 0,01$ )(One-Way ANOVA, Tukey’s HSD test). &(p<0,05) ozna ava “rebound” hipotermiju koja se javlja prilikom davanja morfina.

B



Slika IV.3.4.1.B. Vremenski tok efekta kombinacije ketamin-magnezijum sulfat na morfinsku hipertermiju kod pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Postoji statistički značajna razlika između MR i MR+KT(5) (\*\* $p < 0,01$ ), MR i MR+KT(5)+MG(5) (# $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ ) i između MR+KT(5) i MR+KT(5)+MG(5) (\$ $p < 0,05$ , \$\$ $p < 0,01$ ) (One-Way ANOVA Tukey's HSD test). &(p<0,05) označava "rebound" hipotermiju koja se javlja prilikom davanja morfina.



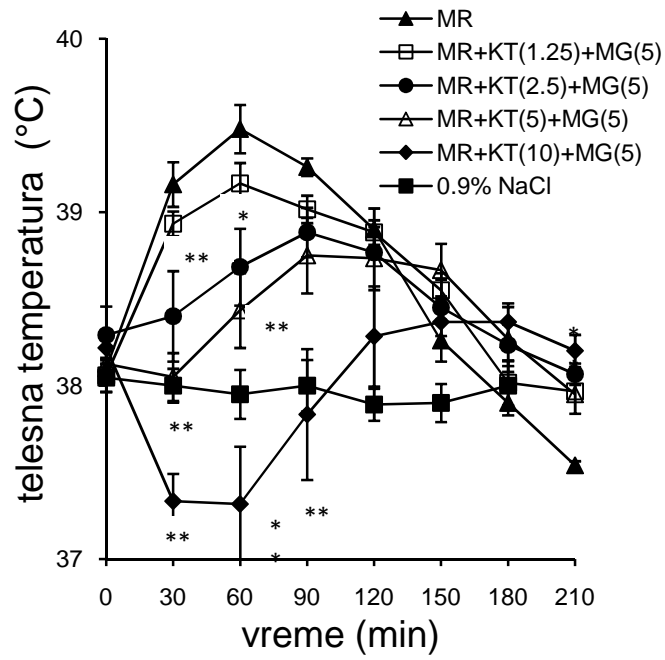
#### **IV.3.4.2. Efekti kombinacije ketamin-magnezijum sulfat u masenim odnosima doza 0,25:1, 0,5:1, 1:1 i 2:1 (rastu e doze ketamina 1,25, 2,5, 5 i 10 mg/kg sa fiksnom dozom magnezijum sulfata 5 mg/kg) na morfinsku hipertermiju**

Magnezijum sulfat (5 mg/kg, sc) u kombinaciji sa ketaminom (5 mg/kg, ip) smanjuje morfinsku hipertermiju za 1°C ( $p < 0,01$ ) (Slika IV.3.4.1.B).

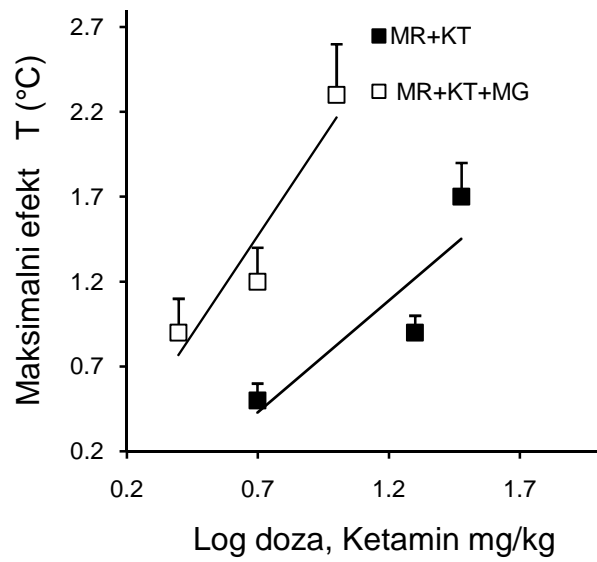
Ketamin u dozama 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg i 10 mg/kg dat u kombinaciji sa fiksnom dozom magnezijum sulfata (5 mg/kg, sc) smanjuje hipertermni efekt morfina na dozno-zavistan na in (Slika IV.3.4.2.A.). Kombinacija najveće doze ketamina (10 mg/kg, ip) sa magnezijum sulfatom (5 mg/kg, sc) menja morfinsku hipertermiju u hipotermiju, a efekt traje 90 minuta.

Na slici IV.3.4.2.B. predstavljena je kriva odnosa doze i efekta kombinacije ketamina (1,25, 2,5, 5 i 10 mg/kg, ip) i fiksne doze magnezijuma (5 mg/kg) u prisustvu morfina, kao i kriva ketamin (5, 10 i 30 mg/kg)-morfin. Statističkom obradom podataka pokazano je značajno pomeranje krive kombinacije morfin-ketamin-magnezijum ulevo u odnosu na krivu morfin-ketamin. Ovo ukazuje da postoji potenciranje efekta ketamina u prisustvu magnezijuma na morfinsku hipertermiju. Odnos jačina je 5,3 (CL 2,5-13,1) ( $p < 0,05$ , test za ispitivanje relativne jačine). Nagibi krivih statistički se ne razlikuju ( $p > 0,05$ , test paralelizma).

A



B

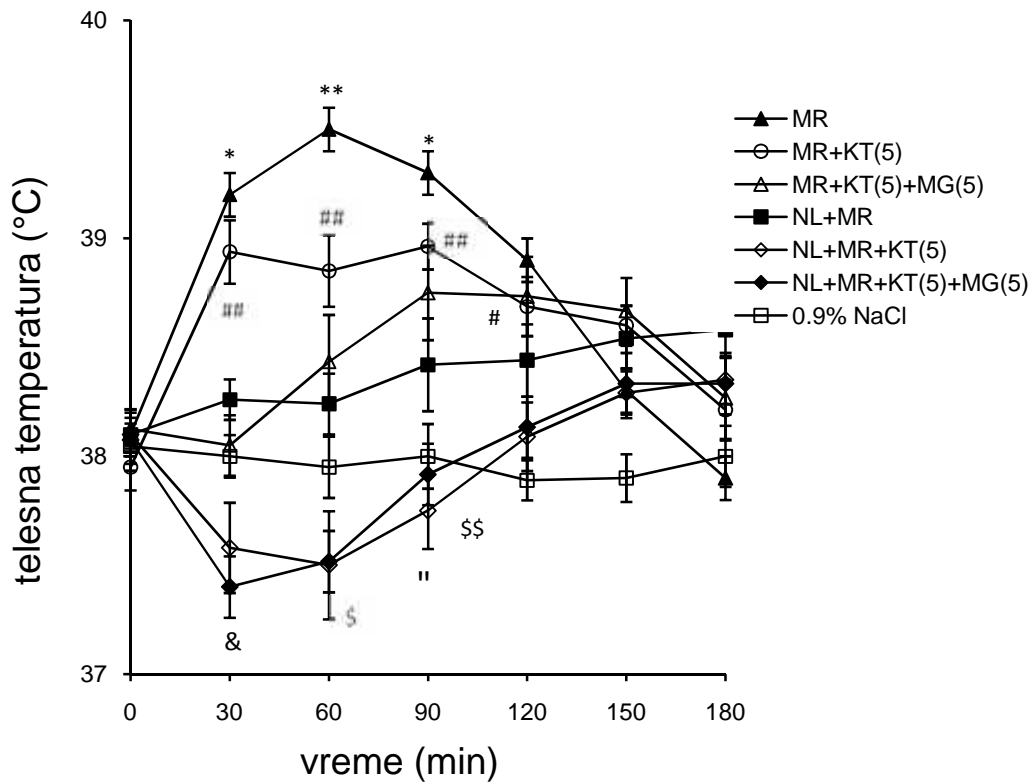


Slika IV.3.4.2. A) Vremenski tok efekta ketamin-magnezijum sulfat u odnosima doza 0,25:1, 0,5:1, 1:1 i 2:1 (rastu e doze ketamina 1,25, 2,5, 5 i 10 mg/kg sa fiksnom dozom magnezijum sulfata 5 mg/kg) na morfinom (MR, 2,6 mg/kg, ip)-izazvanu hipertermiju kod pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Postoji statisti ki zna ajna razlika izme u kombinacija morfin-ketamin-magnezijum i morfina (\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ ). Postoji statisti ki zna ajna razlika i izme u samih kombinacija MR+KT(1,25)+MG(5) i MR+KT(2,5, 5 i 10)+MG(5), i izme u MR+KT(2,5)+MG(5) i MR+KT(10)+MG(5) (nije prikazano). &(p<0,05) ozna va “rebound” hipotermiju koja se javlja prilikom davanja morfina.

B) Krive odnosa doze i efekta za morfin-ketamin (MR+KT) i morfin-ketamin–magnezijum sulfat kombinacija (MR+KT+MG) na telesnu temperaturu kod pacova. Podaci su izraženi kao srednja vrednost promene maksimalne temperature ( $T$   $^{\circ}\text{C}$ ) u odnosu na kontrolu (0,9% NaCl). Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) dobijenu na 6-8 pacova.

#### **IV.3.5. Nalokson antagonizuje dejstvo morfina i kombinacije morfin-ketamin i morfin-ketamin-magnezijum sulfat na telesnu temperaturu kod pacova**

Nalokson hidrohlorid (1 mg/kg, sc), neselektivni antagonist opioidnih receptora, smanjuje efekt morfina (2,6 mg/kg, ip), kao i kombinacije morfin-ketamin i morfin-ketamin-magnezijum sulfat za 1,3, 1,4 i 0,9 $^{\circ}\text{C}$  ( $p<0,01$ ) (Slika IV.3.5). Sam nalokson ne uti e na bazalnu temperaturu, a i u kombinaciji sa ketaminom (5 mg/kg, ip) ne dovodi do promene telesne temperature (nije prikazano). Ipak, u prisustvu ketamina u dozi 5 mg/kg, koja sama ne uti e na telesnu temperaturu, nalokson zna ajno više smanjuje ( $p<0,05$ ) morfinsku hipertermiju.



Slika IV.3.5. Vremenski tok efekta naloksona na kombinaciju morfin-ketamin-magnezijum sulfat na telesnu temperaturu kod pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Postoji statistički značajna razlika između MR i NL+MR (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ) između MR+KT(5) i NL+MR+KT(5) (# $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ ), između MR+KT(5)+MG i NL+MR+KT(5)+MG (\$ $p < 0,05$ , \$\$ $p < 0,01$ ), između NL+MR i NL+MR+KT(5) (& $p < 0,05$ ), između NL+MR i NL+MR+KT(5)+MG(5) (“ $p < 0,05$ ).

#### **IV.4. Mehanizam hipotermnog dejstva kombinacije ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg), rezultati**

Ketamin (5 mg/kg) u kombinaciji sa magnezijum sulfatom (5 mg/kg) dovodi do značajnog sniženja telesne temperature u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p < 0,05$ ). Maksimalno sniženje telesne temperature koju izaziva kombinacija ketamin(5)-magnezijum sulfat(5) iznosi 0,7 °C.

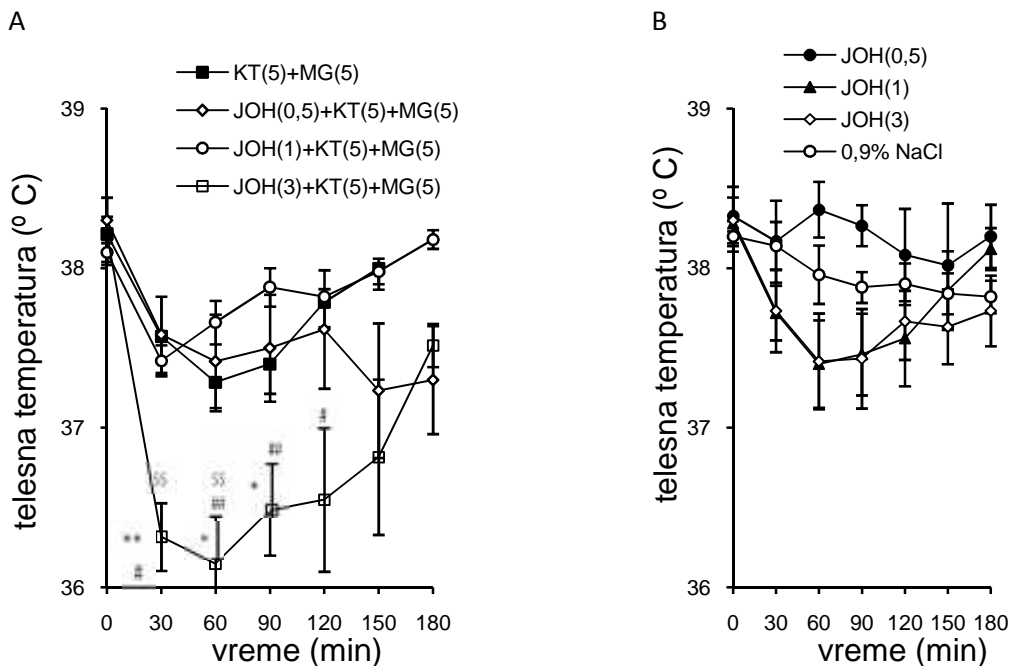
Cilj ovog dela istraživanja bio je ispitivanje mehanizma hipotermnog dejstva kombinacije ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg). Koristili smo antagonist adrenergičkih  $\alpha_2$  receptora (johimbina), neselektivni antagonist serotonergičkih (5-HT) receptora (metizergid), antagonist GABA<sub>A</sub> receptora (bikukulin), prekursor sinteze azotnog oksida (L-arginin), neselektivni antagonist sintaze azotnog oksida (L-NAME), neselektivni antagonist opioidnih receptora (nalokson) i antagonist ATP-zavisnih kalijumskih kanala (glibenklamid).

##### **IV.4.1. Dejstvo johimbina na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)**

Johimbina (0,5, 1 i 3 mg/kg) ne utiče na telesnu temperaturu u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p > 0,05$ ) (slika IV.4.1.B). Doze 0,5 i 1 mg/kg johimbina ne utiču na hipotermiju izazvanu kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat, dok u dozi od 3 mg/kg johimbina produbljuje hipotermiju ove kombinacije.

Kombinacija ketamin-magnezijum maksimalno snižava telesnu temperaturu za 0,7°C. Doze johimbina od 0,5, 1 i 3 mg/kg, zajedno sa kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat snižavaju telesnu temperaturu za 0,6, 0,7 i 1,8°C u pore enju sa 0,9% NaCl. U dozi od 3 mg/kg johimbina snižava hipotermiju izazvanu kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat maksimalno za 0,9°C (u pore enju sa samom kombinacijom). Postoji statistički značajna razlika između kombinacija johimbina (1)-ketamin (5)-magnezijum sulfat (5) i johimbina (3)-ketamin (5)-magnezijum sulfat (5) ( $^{##}p < 0,01$ ,  $^{\#}p < 0,05$ ), kao i razlika između kombinacija

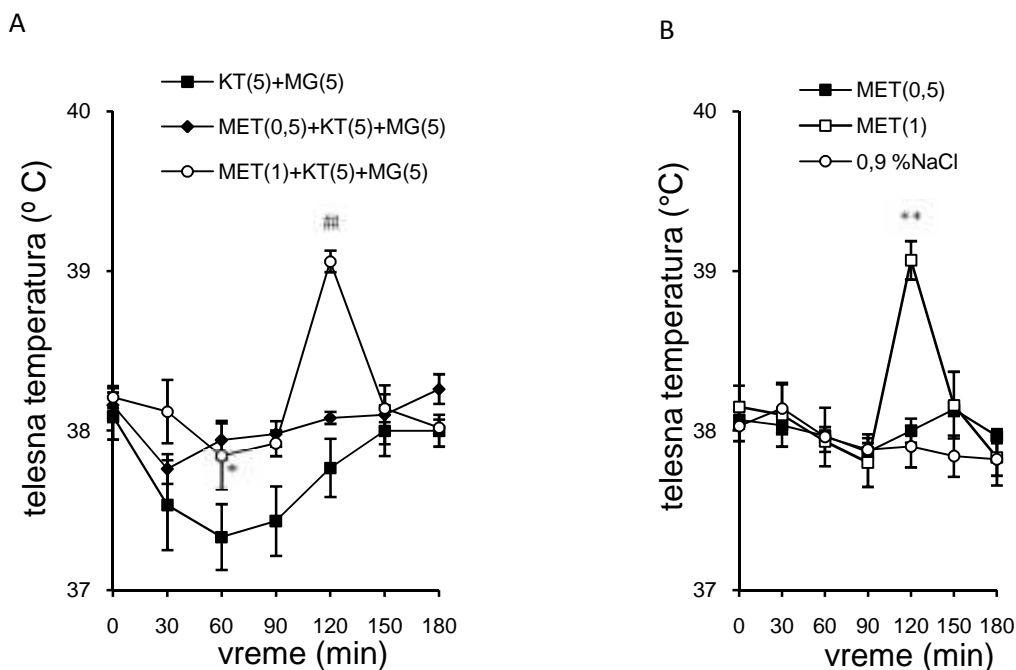
johimbina (0,5)-ketamina (5)-magnezijum sulfat (5) i johimbina (3)-ketamina (5)-magnezijum sulfat (5) (<sup>\$\$</sup>p<0,01, <sup>\$</sup>p<0,05) (slika IV.4.1.A).



IV.4.1. Vremenski tok efekta: A) kombinacije ketamina (KT, 5 mg/kg, ip), magnezijum sulfata (5 mg/kg), johimbina (JOH, 0,5,1 i 3 mg/kg, sc) i B) johimbina (JOH, 0,5,1 i 3 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa (°C) na 6–8 pacova. Statisti ka zna ajnost postoji izme u kombinacija: KT(5)-MG(5) i JOH(3)-KT(5)-MG(5) (<sup>\*\*</sup>p<0,01, <sup>\*</sup>p<0,05); JOH(1)-KT(5)-MG(5) i JOH(3)-KT(5)-MG(5) (<sup>##</sup>p<0,01, <sup>#</sup>p<0,05); JOH(0,5)-KT(5)-MG(5) i JOH(3)-KT(5)-MG(5) (<sup>\$\$</sup>p<0,01, <sup>\$</sup>p<0,05) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### IV.4.2. Dejstvo metizergida na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)

Metizergid (0,5 i 1 mg/kg, sc) primenjen sam ne uti e na bazalnu telesnu temperaturu ( $p>0,05$ ) u pore enju sa 0,9% NaCl, osim u 120 minutu kada u dozi od 1 mg/kg dovodi do hipertermije (slika IV.4.2.B). U dozi od 0,5 mg/kg metizergid antagonizuje efekat kombinacije ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg) na telesnu temperaturu u 60 minutu ( $p<0,05$ ). Efekat se pojavljuje u 60 minutu i istovremeno tada postiže maksimum dejstva. U dozi od 1 mg/kg metizergid redukuje hipotermiju izazvanu kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat, ali nije pokazana statisti ka zna ajnost, sem u 120 minutu kada kombinacija metizergid-ketamin-magnezijum sulfat dovodi do hipertermije (slika IV.4.2.A). U pore enju sa 0,9% NaCl, doze od 0,5 i 1 mg/kg metizergida u kombinaciji sa ketamin-magnezijum sulfatom maksimalno snižavaju telesnu temperaturu za 0,6 °C (slika IV.4.2.A). U pore enju sa kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat, doze od 0,5 i 1 mg/kg metizergida redukuju hipotermni efekat ove kombinacije maksimalno za 0,6 °C.

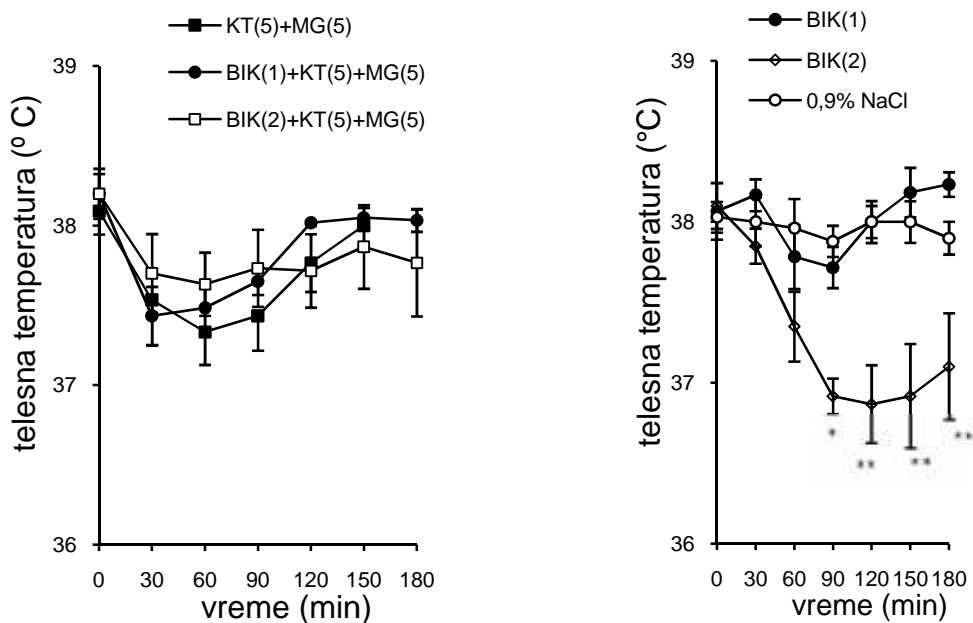


Slika IV.4.2. Vremenski tok efekta: A) ketamina (KT, 5 mg/kg, ip), magnezijum sulfata (5 mg/kg), metizergida (MET, 0,5 i 1 mg/kg, sc) i B) metizergida (MET, 0,5 i 1 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Statisti ka zna ajnost postoji izme u KT(5)-MG(5) i MET(0,5)-KT(5)-MG(5) ( $*p<0,05$ ); KT(5)-MG(5) i MET(1)-KT(5)-MG(5) ( $^{##}p<0,01$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### **IV.4.3. Dejstvo bikukulina na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)**

Bikukulin (1 mg/kg, sc) primenjen sam ne uti e na bazalnu temperaturu pacova ( $p>0,05$ ). Bikukulin u dozi od 2 mg/kg dovodi do hipotermije u 90 minutu koja traje od 90-180 minuta u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p<0,05$ ) (slika IV.4.3.B). Maksimalno sniženje bazalne temperature do koje dovodi bikukulin (2 mg/kg) je  $1,1^{\circ}\text{C}$  u odnosu na 0,9% NaCl ( $p<0,05$ ). Bikukulin (1 i 2 mg/kg) u kombinaciji sa ketaminom (5 mg/kg) i magnezijum sulfatom (5 mg/kg) statisti ki se ne razlikuje zna ajno u odnosu na kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat ( $p>0,05$ ) (slika IV.4.3.A).

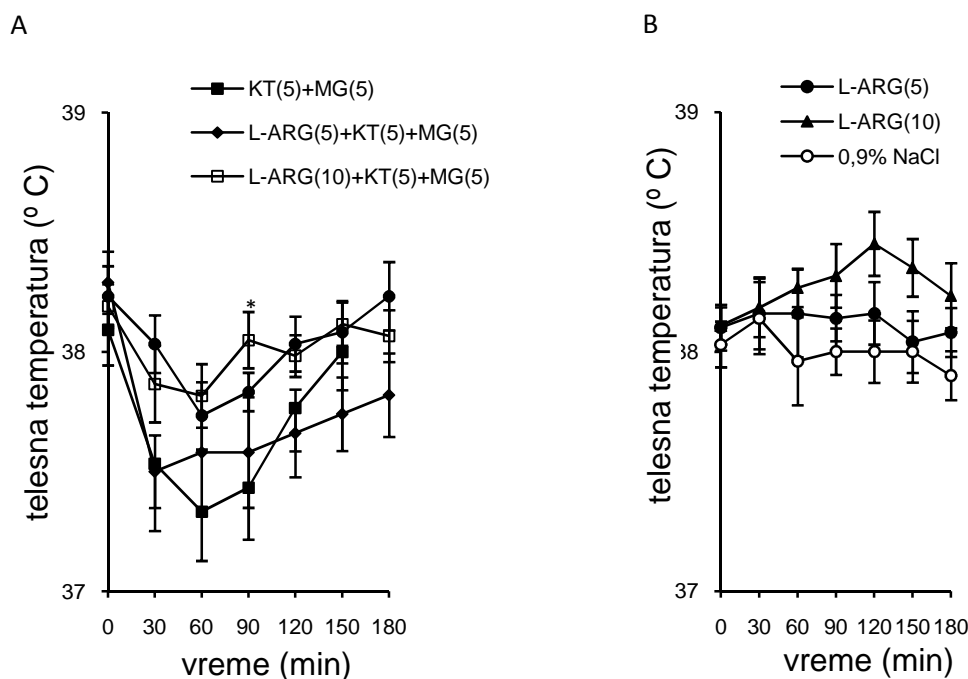




Slika IV.4.3. Vremenski tok efekta: A) ketamina (KT, 5 mg/kg, ip), magnezijum sulfata (5 mg/kg), bikukulina (BIK, 1 i 2 mg/kg, sc) i B) bikukulina (BIK, 1 i 2 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}$ C) na 6–8 pacova. Statisti ka zna ajnost postoji izme u BIK(2) i 0,9% NaCl (\*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### IV.4.4. Dejstvo L-arginina na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)

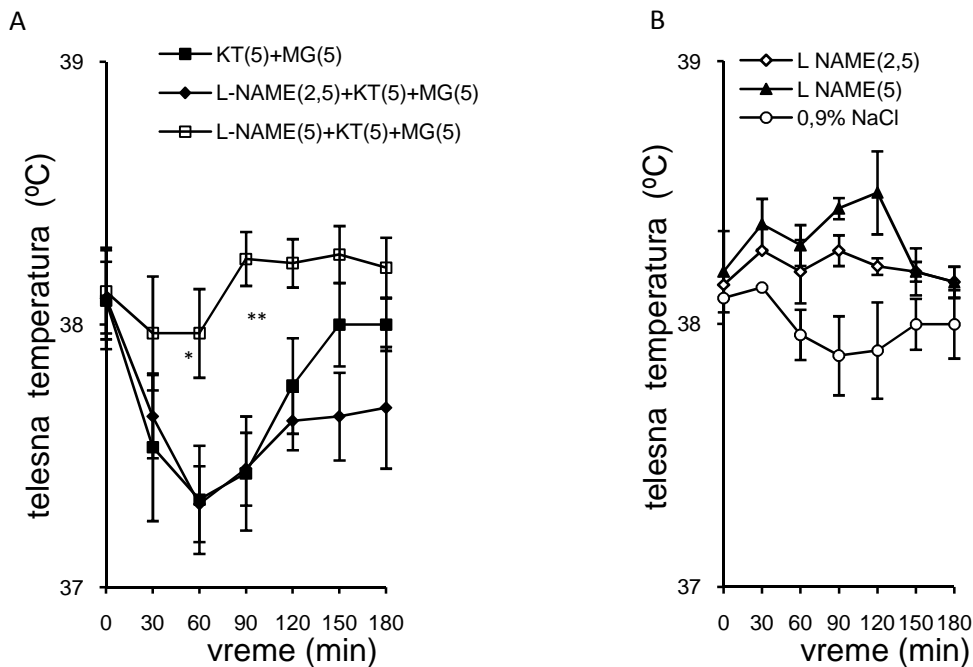
L-arginin (5 i 10 mg/kg, sc) primenjen sam ne uti e na bazalnu telesnu temperaturu u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p>0,05$ ) (slika IV.4.4.B). Doza od 5 mg/kg L-arginina ne uti e na kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat ( $p>0,05$ ). Doza od 10 mg/kg L-arginina antagonizuje efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat u 90 minutu ( $p<0,05$ ) (slika IV.4.4.A). U pore enju sa 0,9% NaCl, doze od 5 i 10 mg/kg L-arginina u kombinaciji sa ketamin-magnezijum sulfatom pokazuju maksimalno sniženje telesne temperature za 0,6 i 0,3 °C. U pore enju sa kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat, doze od 5 i 10 mg/kg L-arginina redukuju hipotermni efekt ove kombinacije maksimalno za 0,3 i 0,7°C.



Slika IV.4.4. Vremenski tok efekta: A) ketamina (KT, 5 mg/kg, ip), magnezijum sulfata (5 mg/kg), L arginina (L-ARG, 5 i 10 mg/kg, sc) i B) L arginina (L-ARG, 5 i 10 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Statisti ka zna ajnost postoji izme u KT(5)-MG(5) i L-ARG(10)-KT(5)-MG(5) ( $*p<0,05$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### **IV.4.5. Dejstvo L-NAME na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)**

L-NAME (2,5 i 5 mg/kg) ne uti e na telesnu temperaturu u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p>0,05$ ) (slika IV.4.5.B). L-NAME u dozi od 2,5 mg/kg ne uti e na kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat ( $p>0,05$ ). U dozi od 5 mg/kg, L-NAME antagonizuje efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat u 60 ( $p<0,05$ ) i 90 minutu ( $p<0,01$ ) (slika IV.4.5.A). U pore enju sa 0,9% NaCl, doze od 2,5 i 5 mg/kg L-NAME u kombinaciji sa ketamin-magnezijum sulfatom pokazuju maksimalno sniženje telesne temperature za 0,7 i 0,1  $^{\circ}\text{C}$ . U pore enju sa kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat, doze od 2,5 i 5 mg/kg L-NAME, redukuju hipotermni efekt ove kombinacije maksimalno za 0,2 i 0,9 $^{\circ}\text{C}$ .

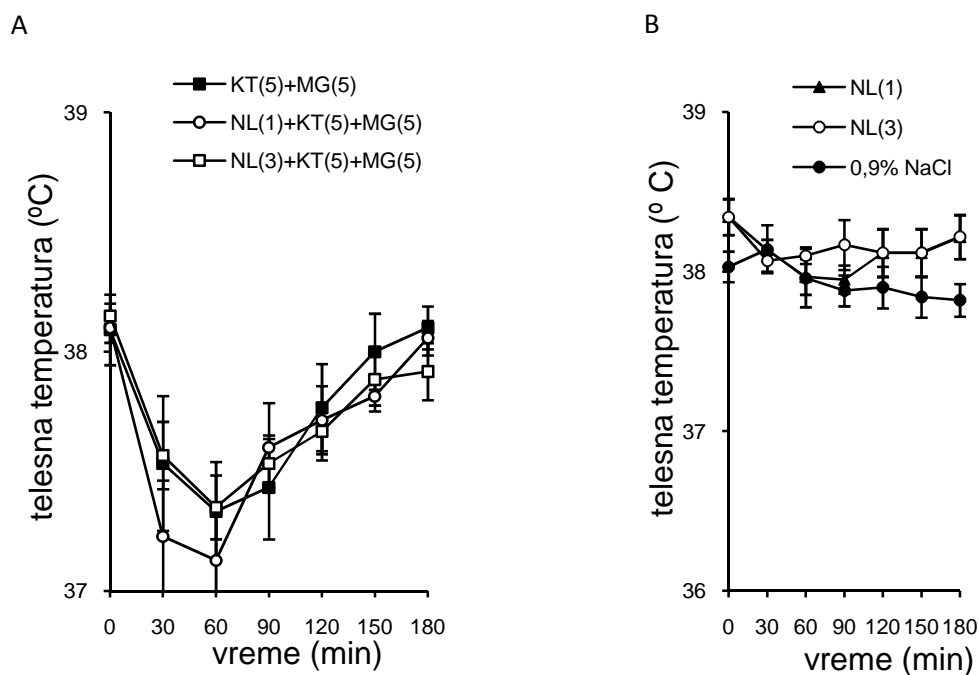


Slika IV.4.5. Vremenski tok efekta: A) ketamina (KT, 5 mg/kg, ip), magnezijum sulfata (MG, 5 mg/kg) i L-NAME (L-NAME, 2,5 i 5 mg/kg, sc) i B) L-NAME (L-NAME, 2,5 i 5 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}$ C) na 6–8 pacova. Statisti ka zna ajnost postoji izme u L-NAME(5)-KT(5)-MG(5) i KT(5)-MG(5) (\*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### IV.4.6. Dejstvo naloksona na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)

Nalokson (1 i 3 mg/kg) ne uti e na bazalnu telesnu temperaturu u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p > 0,05$ ) (slika IV.4.6.B). Ne postoji statisti ki zna ajna razlika izme u kombinacija nalokson-ketamin-magnezijum sulfat u odnosu na kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat ( $p > 0,05$ ) (slika IV.4.6.A). U pore enju sa 0,9% NaCl, doze od 1 i 3 mg/kg naloksona u kombinaciji sa ketamin-magnezijum sulfatom pokazuju maksimalno sniženje telesne temperature za 0,9 i 0,6  $^{\circ}$ C. U pore enju sa kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat,

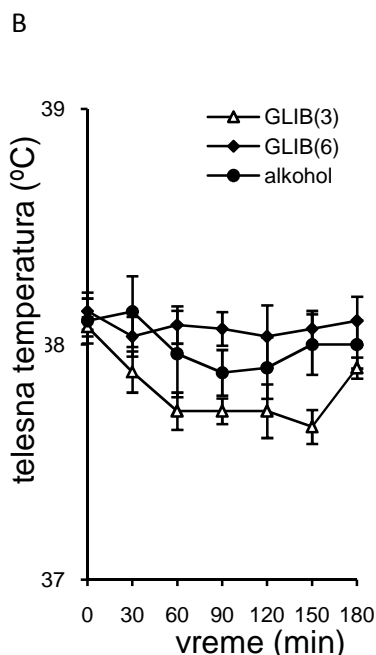
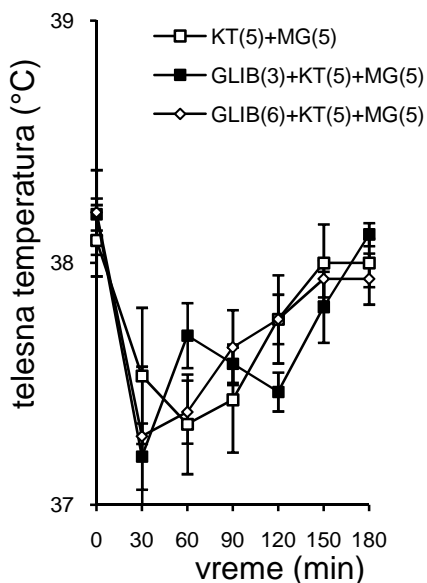
nalokson u dozi od 1 mg/kg produbljuje hipotermiju kombinacije maksimalno za 0,2°C, dok u dozi od 3 mg/kg redukuje hipotermni efekt ove kombinacije maksimalno za 0,2 °C ( $p>0,05$ ).



Slika IV.4.6. Vremenski tok efekta: A) ketamina (KT, 5 mg/kg, ip), magnezijum sulfata (5 mg/kg) i naloksona (NL, 1 i 3 mg/kg, sc) i B) naloksona (NL, 1 i 3 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa (°C) na 6–8 pacova. Ne postoji statisti ka zna ajnost izme u kombinacija NL-KT-MG u odnosu na kombinaciju KT-MG (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### IV.4.7. Dejstvo glibenklamida na kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)

Glibenklamid (3 i 6 mg/kg) ne utiče na bazalnu telesnu temperaturu u poređenju sa 0,9% NaCl ( $p>0,05$ ) (slika IV.4.7.B). Ne postoji statistički značajna razlika između kombinacija glibenklamid-ketamin-magnezijum sulfat u odnosu na kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat ( $p>0,05$ ) (slika IV.4.7.A). U poređenju sa 0,9% NaCl, doze od 3 i 6 mg/kg glibenklamida u kombinaciji sa ketamin-magnezijum sulfatom pokazuju maksimalno sniženje telesne temperature za 0,9 i 0,8 °C. U poređenju sa kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat, doze od 3 i 6 mg/kg glibenklamida redukuju hipotermni efekt ove kombinacije maksimalno za 0,3 °C.



Slika IV.4.7. Vremenski tok efekta: A) ketamina (KT, 5 mg/kg, ip), magnezijum sulfata (5 mg/kg), glibenklamida (GLIB, 3 i 6 mg/kg, sc) i B) glibenklamida (GLIB, 3 i 6 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Ne postoji statisti ka zna ajnost izme u kombinacija GLIB-KT-MG u odnosu na kombinaciju KT-MG (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

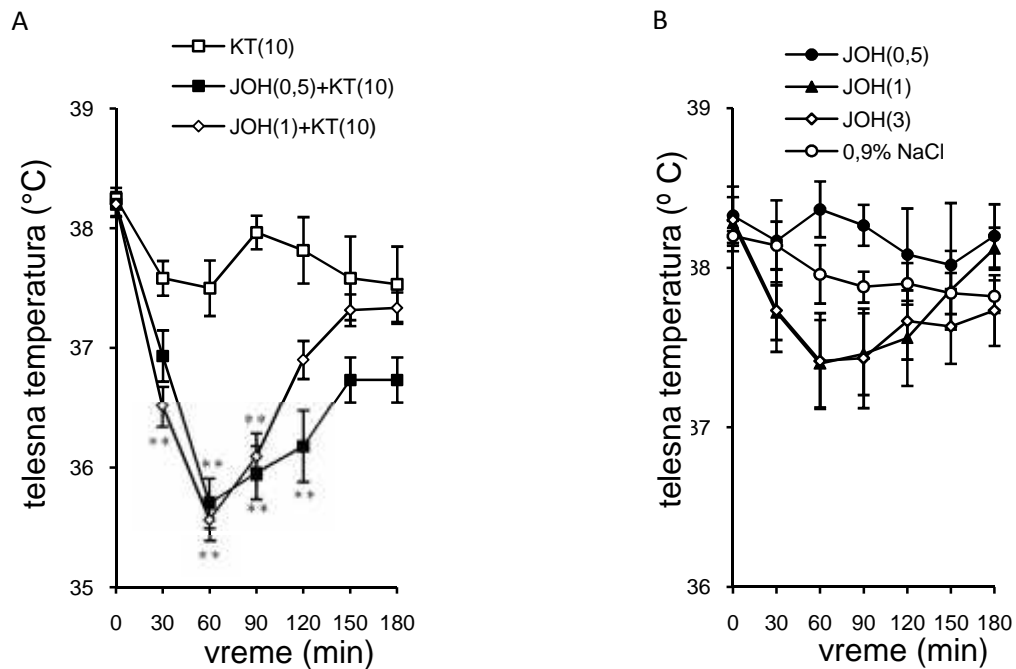
#### **IV.5. Mehanizam hipotermnog dejstva ketamina (10 mg/kg)**

Intraperitonealna injekcija ketamina (5-30 mg/kg) kod pacova dovodi do dozno zavisnog sniženja telesne temperature kod pacova (Vuckovi i sar., 2014.). Ketamin u dozi od 10 mg/kg dovodi do zna ajnog sniženja telesne temperature u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p < 0,05$ ). Maksimalno sniženje telesne temperature iznosi  $0,6^{\circ}\text{C}$ .

Cilj ovog dela istraživanja bio je ispitivanje mehanizma hipotermnog dejstva ketamina. Koristili smo antagonist adrenergi kih  $\alpha_2$  receptora (johimbin), neselektivni antagonist serotonergih (5-HT) receptora (metizergid), antagonist  $\text{GABA}_A$  receptora (bikukulin), prekursor sinteze azotnog oksida (L-arginin), neselektivni antagonist sintaze azotnog oksida (L-NAME), neselektivni antagonist opioidnih receptora (nalokson) i antagonist ATP-zavisnih kalijumskih kanala (glibenklamid).

##### **IV.5.1. Dejstvo johimbina na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg)**

Johimbin (0,5 i 1 mg/kg, sc) ne uti e na bazalnu telesnu temperaturu u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p > 0,05$ ) (slika IV.5.1.B). Johimbin (0,5 i 1 mg/kg, sc) potencira hipotermiju izazvanu ketaminom (10 mg/kg) ( $p < 0,01$ ) (slika IV.5.1.A). Efekt se pojavljuje u 30 minutu, postiže maksimum u 60 minutu i traje 120 min nakon date intraperitonealne injekcije ketamina ( $p < 0,01$ ). U pore enju sa 0,9% NaCl, doze 0,5 i 1 mg/kg johimbina u kombinaciji sa ketaminom (10 mg/kg) maksimalno snižavaju telesnu temperaturu pacova za  $2,4$  i  $2,5^{\circ}\text{C}$ , jedno za drugim. U pore enju sa ketaminom (10 mg/kg), johimbin maksimalno snižava telesnu temperaturu pacova za  $2^{\circ}\text{C}$ .



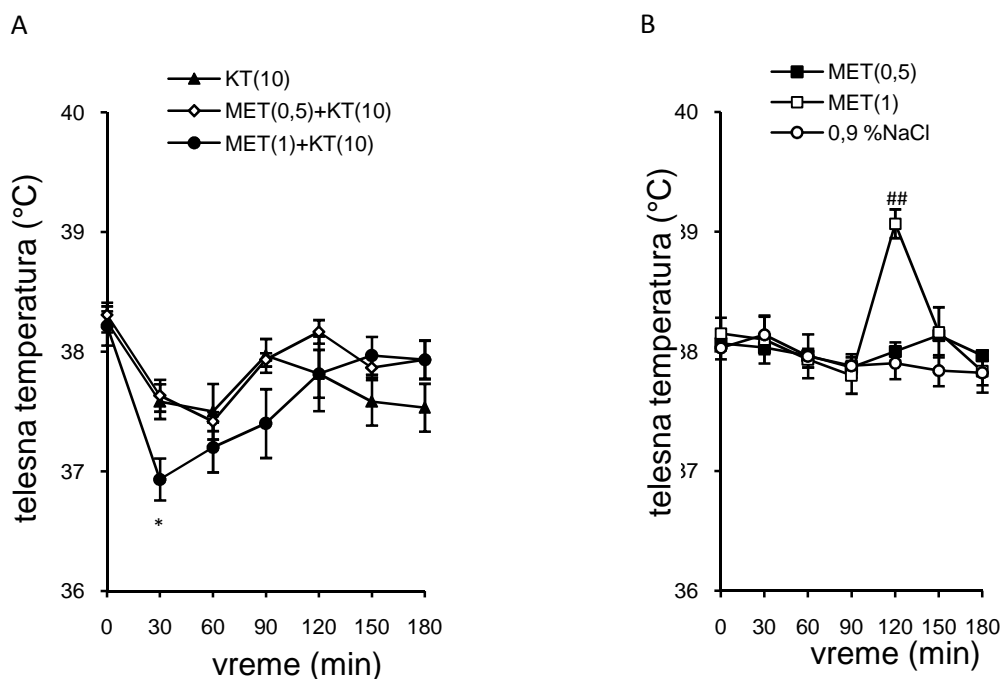
Slika IV.5.1. Vremenski tok efekta: A) kombinacije ketamina (KT, 10 mg/kg, ip) i johimbina (JOH, 0,5 i 1 mg/kg, sc) i B) johimbina (JOH, 0,5 i 1 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}$ C) na 6–8 pacova. Statisti ka zna ajnost postoji izme u KT(10) i kombinacije JOH(0,5, 1)-KT(10) (\*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### IV.5.2. Dejstvo metizergida na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg)

Metizergid (0,5 i 1 mg/kg, sc) primenjen sam ne uti e na bazalnu telesnu temperaturu ( $p > 0,05$ ) u pore enju sa 0,9% NaCl, osim u 120 minutu kada u dozi od 1 mg/kg dovodi do hipertermije (slika IV.5.2.B). Kombinacija ketamina (10 mg/kg ip) sa metizergidom u dozi od 0,5 mg/kg, imala je sli an efekt kao kada se ketamin primeni sam (10 mg/kg) ( $p > 0,05$ ). Doza od 1 mg/kg metizergida potencira ketaminsku hipotermiju (10 mg/kg, ip) ( $p < 0,05$ ) (slika IV.5.2.A). Efekt se pojavljuje u 30 minuta nakon intraperitonealne injekcije ketamina i tada istovremeno postiže maksimum dejstva. U pore enju sa 0,9% NaCl, doze od 0,5 i 1



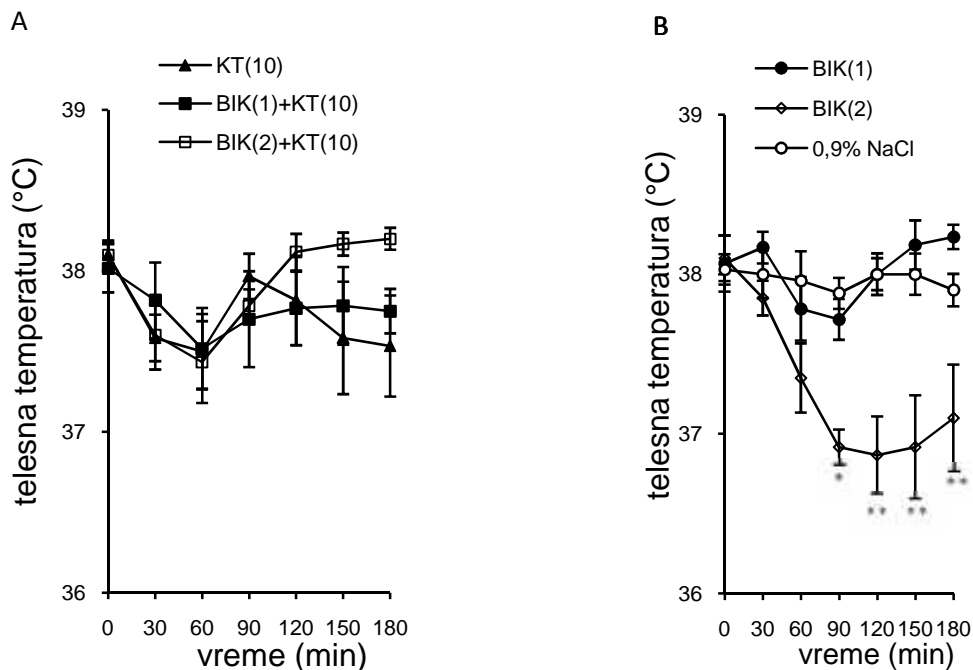
mg/kg metizergida u kombinaciji sa ketaminom (10 mg/kg) pokazuju maksimalno sniženje telesne temperature za 0,6 i 1,2°C. U pore enju sa ketaminom (10 mg/kg), metizergid (1 mg/kg) maksimalno snižava telesnu temperaturu pacova za 0,7°C.



Slika IV.5.2. Vremenski tok efekta: A) kombinacije ketamina (KT, 10 mg/kg, ip) i metizergida (MET, 0,5 i 1 mg/kg, sc) i B) metizergida (MET, 0,5 i 1 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa (°C) na 6–8 pacova. Statisti ka zna ajnost postoji izme u KT(10) i kombinacije MET(1)-KT(10) (\* $p < 0,05$ ), kao i izme u MET(1) i 0,9% NaCl (## $p < 0,01$ )(One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

### IV.5.3. Dejstvo bikukulina na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg)

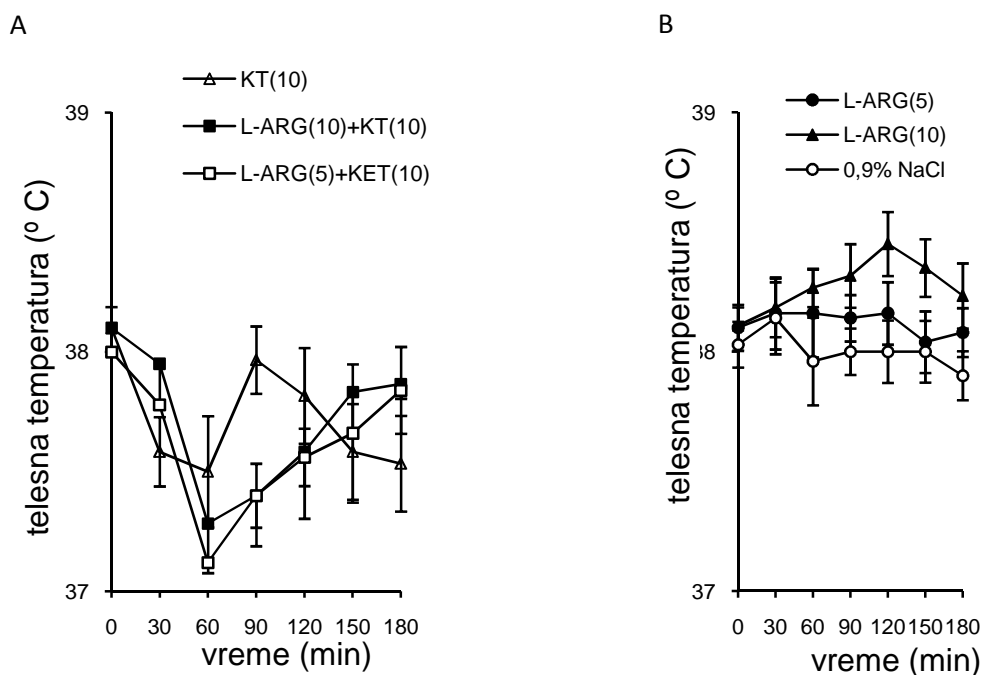
Bikukulin (1 mg/kg, sc) primenjen sam ne uti e na bazalnu temperaturu pacova u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p>0,05$ ). Bikukulin u dozi od 2 mg/kg primenjen sam dovodi do hipotermije u 90 minutu (slika IV.5.3.B). Hipotermija koju daje bikukulin u dozi od 2 mg/kg, traje od 90-180 minuta u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p<0,05$ ). Doze od 1 i 2 mg/kg u kombinaciji sa ketaminom (10 mg/kg ip), nisu dale statisti ki razli it efekt u pore enju sa samim ketaminom ( $p>0,05$ ). U prisustvu ketamina (10 mg/kg), bikukulinom izazvana hipotermija se menja do vrednosti bazalne temperature (slika IV.5.3.A).



Slika IV.5.3. Vremenski tok efekta: A) kombinacije ketamina (KT, 10 mg/kg, ip) i bikukulina (BIK, 1 i 2 mg/kg, sc) i B) bikukulina (BIK, 1 i 2 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}\text{C}$ ) na 6–8 pacova. Statisti ka zna ajnost postoji izme u BIK(2) i 0,9% NaCl (\*\*  $p<0,01$ , \*  $p<0,05$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### IV.5.4. Dejstvo L-arginina na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg)

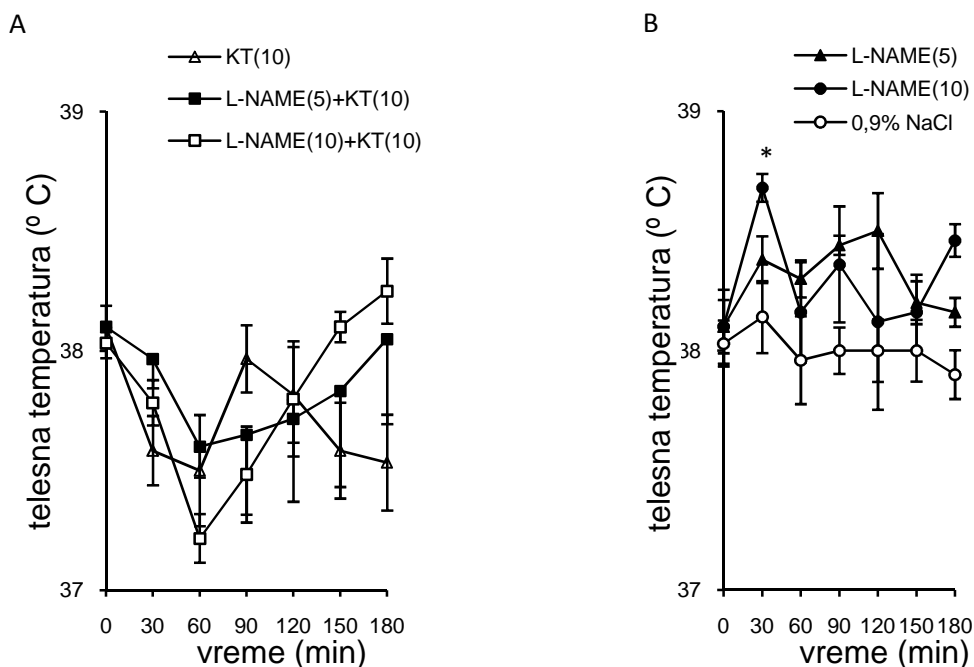
L-arginin (5 i 10 mg/kg) primenjen sam ne uti e na bazalnu temperaturu pacova u pore enju sa 0,9% NaCl (slika IV.5.4.B).L-arginin (5 i 10 mg/kg) u kombinaciji sa ketaminom 10 mg/kg produbljuje ketaminom izazvanu hipotermiju, ali ne postoji statisti ka zna ajnost u odnosu na sam ketamin ( $p>0,05$ )(slika IV.5.4.A). U pore enju sa 0,9% NaCl, doze od 5 i 10 mg/kg L-arginina u kombinaciji sa ketaminom (10 mg/kg) pokazuju maksimalno sniženje telesne temperature za 0,9 i 0,7°C. U pore enju sa ketaminom (10 mg/kg), L-arginin (5 i 10 mg/kg) maksimalno snižava telesnu temperaturu pacova za 0,6°C.



Slika IV.5.4. Vremenski tok efekta: A) kombinacije ketamina (KT, 10 mg/kg, ip) i L-arginina (L-ARG, 5 i 10 mg/kg, sc) i B) L-arginina (L-ARG, 5 i 10 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa (°C) na 6–8 pacova. Ne postoji statisti ka zna ajnost izme u KT i kombinacije L-ARG-KT (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### IV.5.5. Dejstvo L-NAME na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg)

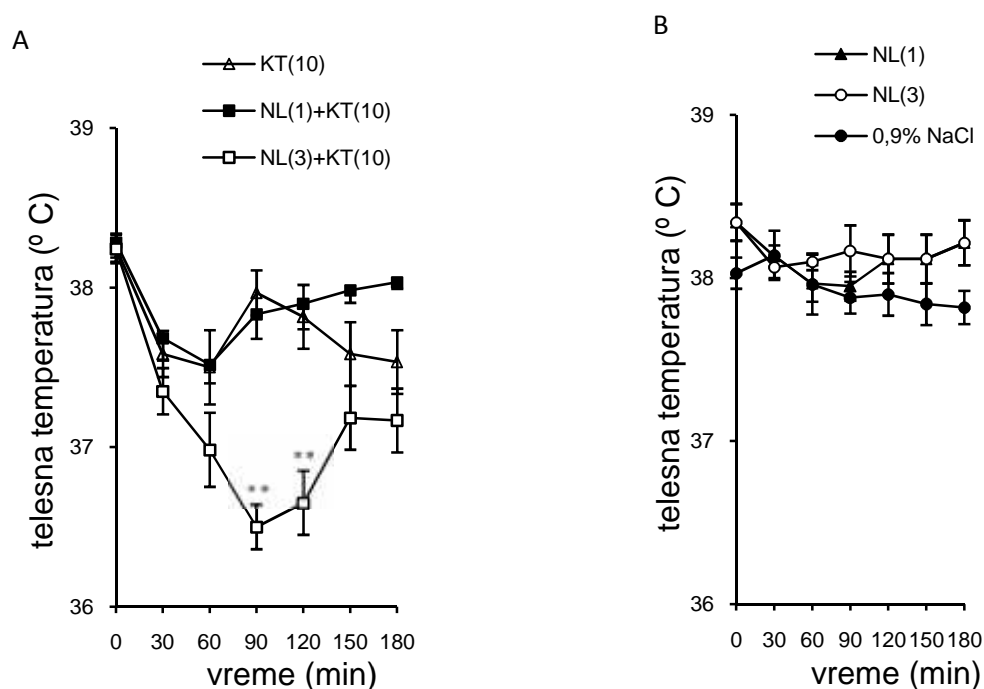
L-NAME (5 mg/kg) primenjen sam ne uti e na bazalnu telesnu temperaturu pacova u pore enju sa 0,9% NaCl (slika IV.5.5.B). L-NAME (10 mg/kg) primenjen sam pove ava telesnu temperaturu pacova u 30 min u odnosu na 0,9% NaCl ( $p < 0,05$ ). Ne postoji statisti ki zna ajna razlika izme u L-NAME (5 i 10 mg/kg) u kombinaciji sa ketaminom 10 mg/kg u pore enju sa samim ketaminom (10 mg/kg) ( $p > 0,05$ ) (slika IV.5.5.A).



Slika IV.5.5. Vremenski tok efekta: A) kombinacije ketamina (KT, 10 mg/kg, ip) i L-NAME (L-NAME, 5 i 10 mg/kg, sc) i B) L-NAME (L-NAME, 5 i 10 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa ( $^{\circ}$ C) na 6–8 pacova. Statisti ka zna ajnost postoji izme u L-NAME (10) i 0,9 % NaCl ( $p < 0,05$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### IV.5.6. Dejstvo naloksona na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg)

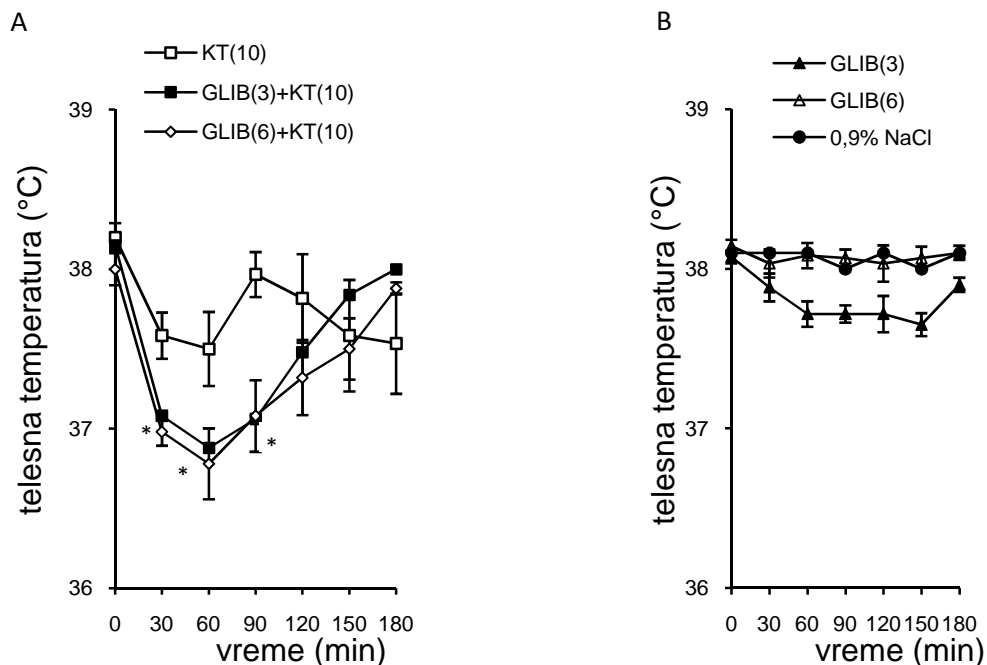
Nalokson (1 i 3 mg/kg) ne uti e na bazalnu telesnu temperaturu u pore enju sa 0,9% NaCl ( $p>0,05$ ) (slika IV.5.6.B). Nalokson u dozi od 1 mg/kg u kombinaciji sa ketaminom 10 mg/kg ne uti e na ketataminom izazvanu hipotermiju ( $p>0,05$ ). Nalokson u dozi od 3 mg/kg u kombinaciji sa ketaminom 10 mg/kg, produbljuje ketaminsku hipotermiju u 90 i 120 minutu ( $p<0,01$ ) (slika IV.5.6.A). U odnosu na 0,9% NaCl, kombinacija nalokson (1 i 3 mg/kg)-ketamin snižava telesnu temperature maksimalno za 0,5 i 1,5 °C. U pore enju sa ketaminom (10 mg/kg), nalokson (3 mg/kg) maksimalno snižava telesnu temperaturu pacova za 1,5°C.



Slika IV.5.6. Vremenski tok efekta: A) kombinacije ketamina (KT, 10 mg/kg, ip) i naloksona (NL, 1 i 3 mg/kg, sc) i B) naloksona (NL, 1 i 3 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka ta ka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa (°C) na 6–8 pacova. Statisti ka zna ajnost postoji izme u KT(10) i kombinacije NL(3)-KT(10) (\*\*  $p<0,01$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

#### IV.5.7. Dejstvo glibenklamida na hipotermni efekt ketamina (10 mg/kg)

Glibenklamid (3 i 6 mg/kg) ne utiče na bazalnu telesnu temperaturu u poređenju sa 0,9% NaCl ( $p>0,05$ ) (slika IV.5.7.B). Ketaminom izazvana hipotermija je produbljena dejstvom glibenklamida ( $p<0,05$ ) (slika IV.5.7.A). U odnosu na 0,9% NaCl, kombinacija glibenklamid (3 i 6 mg/kg)-ketamin snižava telesnu temperature maksimalno za 1,2 i 1,3 °C. U poređenju sa ketaminom (10 mg/kg), glibenklamid maksimalno snižava telesnu temperaturu pacova za 0,9°C (slika IV.5.7.A).



Slika IV.5.7. Vremenski tok efekta: A) kombinacije ketamina (KT, 10 mg/kg, ip) i glibenklamida (GLIB, 3 i 6 mg/kg, sc) i B) glibenklamida (GLIB, 3 i 6 mg/kg, sc) na telesnu temperaturu pacova. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SEM telesne temperature izražene u stepenima Celzijusa (°C) na 6–8 pacova. Postoji statistička značajnost između KT(10) i kombinacije GLIB(3,6)-KT(10) ( $p<0,05$ ) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

## V DISKUSIJA

### V.1. Uticaj derivata morfina i fentanila na antinocicepciju i telesnu temperaturu kod pacova

Dobro je poznato da i morfin i fentanil imaju slične zajedničke neželjene efekte (karakteristične za agoniste  $\mu$ -opioidnih receptora) kao što su sedacija, mučnina, opstipacija, depresija disanja i, pri produženoj primeni, tolerancija i zavisnost koje se javljaju pri analgetičkim dozama. Kod ispitanika kojima su dati morfin ili fentanil primećeno je povećanje telesne temperature kao i neželjeni događaji, ali nema studija kojima se poredi incidenca pojave povišene telesne temperature između ova dva leka.

Naši rezultati ukazuju na to da su terapijski indeksi (hipertermna doza  $HD_{50}$ /antinociceptivna doza  $AD_{50}$ ) za derivate fentanila relativno visoki, dok su zaštitni indeksi za jedinjenja morfina 1.

U ovom ispitivanju prvi put pokazana je razlika između u dve glavne klase opioidnih lekova, derivata morfina (fenantrenski tip) i derivata fentanila (4-anilinopiperidinski tip) u izazivanju hipertermije kod pacova. Do sada nije objavljeno ni jedno ispitivanje kojim bi bila utvrđena povezanost između strukture i temperaturnog odgovora agonista  $\mu$ -opioidnih receptora. Derivati morfina i derivati fentanila su izazivali hipertermiju kod pacova u dozama koje su oko 2 puta niže, odnosno 6-11 puta više od njihovih srednjih efektivnih antinociceptivnih doza, respektivno.

Antinociceptivni i hipertermni efekti derivata morfina (fenantrenski tip) i derivata fentanila (4-anilinopiperidinski tip) su dozno-zavisni. Redosled jačine u izazivanju hipertermije derivata fentanila je veoma sličan redosledu njihove antinociceptivne jačine. Jedinjenja morfina su takođe imala sličan redosled jačine u izazivanju hipertermije i antinocicepcije. Ako serija srodnih agonista pokaže istu relativnu jačinu u izazivanju različitih efekata, verovatno je da su ti efekti posredovani sličnim ili istim receptorima (Bourne i Zastrow, 2007). Ovo bi moglo da ukaže na to da slični receptori učestvuju u

ispoljavanju antinociceptivnih i hipertermnih efekata. Antinociceptivni i hipertermni efekti u obe serije su bili poništeni prethodnim davanjem naloksona, neselektivnog antagoniste opioidnih receptora, što ukazuje na to da se njihovi efekti ostvaruju preko opioidnih receptora. Ovi receptori najverovatnije pripadaju  $\mu$ -opioidnim receptorima, s obzirom da je u ranijim studijama objavljeno da oni u estvuju u antinocicepciji (Kissin i sar., 1983) i hipertermiji (Baker i Meert, 2002; Cao i Morisson, 2005) izazivanim fentanilom/morfinom.

Moglo bi se pretpostaviti da razlika u selektivnosti prema antinociceptivnom/temperaturnom odgovoru izme u opioidnih agonista derivata fentanila i morfina koja je otkrivena u ovom ispitivanju verovatno odražava razli it afinitet i efikasnost agonista za razli ite podtipove opioidnih receptora (Yang i sar., 1992). Pre nekoliko decenija su ra ene studije vezivanja i farmakološke studije podtipova opioidnih receptora, mada njihov zna aj u pogledu termoregulacije nije bio u potpunosti prou en. Me utim, kako eliminacija jednog jedinog gena koji kodira  $\mu$ -opioidne receptore dovodi do prestanka funkcije  $\mu$ -receptora (kako analgezije, tako i depresije disanja), dalje podklasifikovanje primarnih tipova opioidnih receptora nema smisla (Dietis i sar., 2011). Dalja ispitivanja eliminacije gena kod miševa ukazuju na to da su razli iti efekti agonista  $\mu$ -opioidnih receptora posredovani posebnim intracelularnim signalnim putevima (Davis, 2012). Standardni agonisti i antagonisti aktiviraju ili inaktiviraju celokupnu mrežu prenošenja signala receptora. Me utim, „pristrasni” ligandi selektivno aktiviraju neke signale, izbegavaju i, ili ak inaktiviraju i druge signale posredovane istim receptorom (Rives i sar., 2012; Rivero i sar., 2012; Nozaki i sar., 2012; Pradhan i sar., 2012). Na primer, morfin pre aktivira puteve posredovane beta-arestinom 2 *in vivo*, dok fentanil i metadon mogu da aktiviraju prenošenje signala posredovano i beta-arestinom 1 i beta-arestinom 2 (Groer i sar., 2011). U tom pogledu, velika antinociceptivna i mala hipertermna ja ina tj. ve a selektivnost ka antinocicepciji, derivata fentanila u odnosu na morfin, otkrivena u ovom ispitivanju, može da predstavlja „pristrasni” agonizam prema  $\mu$ -opioidnim receptorima.

Ovo otkri e bi moglo da pomogne u boljoj karakterizaciji opioidnih receptora i sintezi selektivnijih opioida. Ovi rezultati bi tako e mogli da unaprede naše znanje o



mehanizmu hipertermije izazvane opioidima i pruže nova saznanja o ulozi opioidnog sistema u termoregulaciji.

Ovim ispitivanjem je utvrđeno da su derivati morfina (fenantrenski tip) i derivati fentanila (4-anilinopiperidinski tip) izazivali hipertermiju kod pacova u dozama oko 2 puta manjim i 6-11 puta većim od njihove srednje efektivne antinociceptivne doze, respektivno. Potrebna su dalja ispitivanja kako bi se razjasnio značaj ovih saznanja.

## **V.2. Antinociceptivni efekt magnezijum sulfata, ketamina, morfina i njihovih kombinacija**

Glavno otkriće ovog daljaispitivanja je sinergizam između ketamina i magnezijum sulfata, NMDA antagonista, u modelu akutne termičke nocicepcije kod pacova. Ketamin i magnezijum sulfat su se pokazali neefikasnim kada se primenjuju sami u ovom modelu bola tj. u testu potapanja repa u toplu vodu. Kombinacijom ova dva leka dobija se statistički značajno veće produženje latentnog vremena u testu potapanja repa u toplu vodu, u poređenju sa pojedinačno datim lekovima, što je ukazalo na sinergističku interakciju. Po prvi put je dokazano da efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat zavisi od redosleda primene leka; veći antinociceptivni efekt se dobija kada se ketamin primeni pre magnezijum sulfata. Takođe, magnezijum sulfat povećava i efikasnost kombinacije ketamin-morfin u modelu akutnog nociceptivnog bola. Kombinacija ova tri leka nije ranije ispitivana. Doze magnezijum sulfata i ketamina su odabrane iz eksperimenata morfin-ketamin i morfin-magnezijum sulfat koji su prvo izvedeni i koji su pokazali da ketamin i magnezijum sulfat povećavaju antinociceptivni efekt morfina.

Naši rezultati su u skladu sa prethodnim studijama (McCartney i sar., 2004; Nechifor i sar., 2011). Nasuprot našim rezultatima, Gupta (2011) je pokazao da magnezijum sulfat (5 mg/kg), primenjen sam izaziva prolazno povećanje latence u *tail flick* testu kod miševa. Ove razlike su verovatno posledica korišćenja različitih testova za termičku nocicepciju (*tail-flick*/*tail immersion* test) kao i razlike između vrste životinja koje su korišćene u eksperimentima.

Pokazano je da ketamin samo u anesteti kim dozama pove ava latencu u *tail-flick* testu na pacovima (Pekoe i Smith, 1982). Subanalgeti ke doze ketamina potenciraju opioidnu analgeziju (Laulin i sar., 2002; Campos i sar., 2006; Holtman i sar., 2008; Carstensen i Møller, 2010). Magnezijum pove ava analgeziju izazvanu opioidima (Gupta i sar., 2011; Nechifor i sar., 2011).

Magnezijum je nekompetitivni antagonist NMDA receptora koji blokira jonski kanal (Fawcett i sar., 1999), dok se ketamin vezuje nekompetitivno za fenciklidinsko mesto NMDA receptora (Øye i sar., 1992) blokira otvaranje kanala i smanjuje frekvencu otvaranja kanala alosteri kim mehanizmom (Orser i sar., 1997a). Kako ketamin i magnezijum sulfat blokiraju NMDA receptor razli itim mehanizmima, nije iznena uju e da postoji sinergizam izme u ova dva leka. Kako ovi lekovi pojedina no dati nemaju analgeti ko dejstvo, izoblografska analiza nije mogla biti izvedena. Razli ite doze ketamina (2,5; 5; 10 mg) i magnezijum sulfata (2,5; 5; 10 mg) kombinovane su u razli itim odnosima (0,5:1, 1:1 i 2:1). Ketamin-magnezijum sulfat u dozama 2,5 : 5, 5 : 5, i 10 : 5 mg/kg ispoljavaju sinergisti ko dejstvo, ali efekt nije dozno-zavisan. Nije jasno zašto je magnezijum sulfat samo u dozi od 5 mg/kg efektivan u kombinaciji sa ketaminom. Izgleda da je za interakciju sa ketaminom tj. za sinergizam bitnija doza magnezijum sulfata od relativne proporcije lekova u kombinaciji (0,5:1, 1:1, 2:1).

Ketamin poseduje analgetska svojstva koja su posledica njegovih interakcija sa kalcijumskim i natrijumskim kanalima, dopaminskim ali i sa opioidnim receptorima, kao i sa ponovnim preuzimanjem noradrenalina i serotonina. Tako e ketamin uti e na holinergi ku transmisiju, a ima i antiinflamatorna svojstva (Hirota i Lambert, 1996). Pokazano je da magnezijum smanjuje aktivnost ne samo NMDA receptora, ve tako e redukuje aktivnost presinapti kih i postsinapti kih kalcijumskih kanala, modulira osloba anje neurotransmitera. Ispoljava modulatorno dejstvo na natrijumske i kalijumske kanale, i tako može da uti e na membranski potencijal (Herroeder i sar., 2011). Farmakokinetska interakcija izme u ketamina i magnezijum sulfata je manje mogu a, jer nema farmakokinetskih interakcija izme u sistemski datog magnezijuma i drugih lekova.

U nekoliko ranijih *ex vivo* studija ispitivana je interakcija između ketamina i magnezijuma i dobijeni su različiti rezultati. Harrison i Simmonds (1985) su pokazali aditivnu interakciju između ova dva leka na kortikalnim neuronima pacova. Na neuronima hipokampusa miševa, magnezijum smanjuje blokadu NMDA receptora izazvanu ketaminom (MacDonald i sar., 1991). U eksperimentima koji su izvođeni na *Xenopus oocitima*, kombinacija ketamina i magnezijuma inhibira NR1/NR2A i NR1/NR2B glutamatne receptore na sinergistički način (Liu i sar., 2001). U nekoliko *in vivo* studija na životinjama dobijeni su opretni rezultati. Na miševima, magnezijum dati intraperitonealno, potencira ketaminom izazvanu anesteziju na sinergistički način tj. povećava procenat gubitka refleksa uspravljanja, vreme spavanja i vremena oporavka (Irifune i sar., 1992). Douglas i Dagirmanjian, (1975) su u svojoj studiji pokazali da su mladi pacovi koji su koristili hranu sa manjkom magnezijuma, duže spavali pod dejstvom ketamina nego kontrolna grupa životinja koja je primala hranu sa normalnim sadržajem magnezijuma. Slične rezultate su dobili Orser i sar. (1997b) koji su pokazali da je hipomagnezijemija kod pacova povezana sa povećanjem osetljivosti na ketamin, što je pokazano u eksperimentima, kroz kraće vreme gubitka refleksa uspravljanja i produženje latentnog perioda povlačenja šape nakon stiskanja prsta. Ova dva istraživanja su delimično u skladu sa našim rezultatima da je efekat kombinacije veći i kada se ketamin primeni pre magnezijuma. Moguće je da ako se magnezijum daje pre ketamina, magnezijum blokira kanale neko vreme i ne dozvoljava vezivanje ketamina. Kada se prvo ketamin veže za fenciklidinsko mesto, povećanje koncentracije magnezijuma može povećati blok. Ovaj mogući mehanizam može objasniti činjenicu da se u našoj studiji postiže bolji efekat kada se magnezijum daje posle ketamina. Ne možemo da povežemo naše rezultate sa koncentracijom magnezijuma u serumu zato što ista nije merena. Takođe, u našoj studiji je pokazano da doza magnezijuma određuje da li će doći do interakcije ili ne.

Nasuprot ovim rezultatima Queiroz-Castro i sar. (2006) su pokazali na kozama da ketamin u kombinaciji sa magnezijumom nije značajno smanjio minimalnu alveolarnu koncentraciju izoflurana u poretku sa samim ketaminom. Kod ovaca, intravenski primenjena kombinacija ketamin-magnezijum izaziva značajno dužu analgeziju, a u

pore enju sa analgezijom kada je dat sam ketamin ili sam magnezijum (DeRossi i sar., 2012).

Kombinacija ketamin-magnezijum ispitivana je i na ljudima u cilju smanjivanje postoperativnog bola. Randomizirane dvostruko-slepe, placebo-kontrolisane studije nisu pokazale da se bol/potrošnja analgetika nakon operacije krajnika kod dece smanjuje, kada se male doze ketamina i/ili magnezijum sulfata daju intravenski pre operacije (O'Flaherty i Lin, 2003). U dvostruko-slepoj randomiziranoj kontrolisanoj studiji na pacijentima kojima je tokom anestezije data kombinacija magnezijum sulfata i S(+)-ketamina, pokazano je da su nakon operacije, ti pacijenti koristili više opioidnog analgetika piritramida nego pacijenti koji su dobijali sam ketamin (Stessel i sar., 2013).

Prema dostupnim literaturnim podacima, NMDA receptori imaju ulogu u akutnoj antinocicepciji izazvanoj morfinom. Le enje opioidima dovodi do pove anja protein kinaze C (PKC) koja aktivira NMDA receptore i na taj na in redukuje antinociceptivni efekat opioida (Mao, 1999). U eksperimentalnim modelima na životinjama pokazano je da dodavanje NMDA antagonista morfinu, može pove ati efekte morfina u modelima termi ke nocicepcije na životinjama (Allen i sar., 2003; Nemmani i sar., 2004; Fischer i sar., 2005; Grisel i sar., 2005). Postavlja se pitanje da li je razlika izme u naših rezultata i prethodnih studija, posledica primene razli itih doza i redosleda primene ketamina i magnezijum sulfata. Naši rezultati mogu delimi no objasniti zašto su prethodne studije, koje su prou avale kombinaciju ketamina i magnezijuma imale neusaglašene rezultate.

Antinociceptivni efekti kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat su antagonizovani naloksonom (3 mg/kg, s.c.), neselektivnim antagonistom opioidnih receptora, ukazuju i da se ova interakcija dešava preko opioidnih receptora. Ovo otkri e bi moglo biti od koristi u situacijama kada postoji predoziranje, iako su potrebne ve e doze naloksona u odnosu na onu koja bi se upotrebila da se antagonizuje sam morfin.

Ketamin ima nekoliko dobrih efekata zbog inhibicije NMDA signalnog puta (Persson, 2010). Me utim, primena ovih lekova u klini kim uslovima povezana je sa dozno-zavisnim neželjenim dejstvima.

U našim eksperimentima mala doza morfina (2,6 mg/kg), ketamina (5 mg/kg) i magnezijum sulfata (5 mg/kg) primenjena zajedno, ne dovodi do poremećaja motorne koordinacije što je verifikovano rotarod testom. Ovi podaci ukazuju da kombinovana primena niskih doza ketamina i magnezijum sulfata može izazvati veći klinički efekt bez prekoračenja sigurne doze. Ova informacija može biti korisna za sprečavanje ili lečenje akutnog bola u nekoliko slučajeva. Ketamin, a moguće i magnezijum imaju neuroprotektivno dejstvo (Hudetz i Pagel, 2010; Sen i Gulati, 2010). Bilo bi dobro ispitati neuroprotektivno dejstvo kombinacije ketamin-magnezijum.

### **V.3. Efekt magnezijum sulfata, ketamina, morfina i njihovih kombinacija na telesnu temperaturu pacova**

Glavno otkriće ovog dela ispitivanja je sinergistička interakcija između dva NMDA antagonista, ketamina i magnezijum sulfata u snižavanju telesne temperature kod pacova. Magnezijum sulfat ne utiče na telesnu temperaturu pacova, niti utiče na morfinsku hipertermiju, dok ketamin dovodi do smanjenja telesne temperature primenjen sam, ali snižava i morfinsku hipertermiju u zavisnosti od doze.

Međutim, subefektivne doze ketamina u kombinaciji sa neefektivnim magnezijum sulfatom dovele su do značajnog smanjenja telesne temperature, kako bazalne, tako i morfinske hipertermije.

Magnezijum je nekompetitivni antagonist NMDA receptora koji blokira jonski kanal (Fawcett i sar., 1999), dok se ketamin vezuje nekompetitivno za fenciklidinsko mesto NMDA receptora (Øye i sar., 1992), blokira otvaranje kanala i smanjuje frekvencu otvaranja kanala alosteričkim mehanizmom (Orser i sar., 1997a). Kako ketamin i magnezijum blokiraju NMDA receptor različitim mehanizmima, nije iznenađujuće da postoji sinergizam između ova dva leka (Øye i saradnici, 1992). Farmakokinetička interakcija između ovih lekova izgleda manje moguća, jer nisu zabeležene farmakokinetičke interakcije između sistemski datog magnezijuma i drugih lekova. Važno je napomenuti da su doze sistemskog magnezijuma i ketamina koje su korišćene u ovoj studiji one koje se

naj eš e koriste u studijama na životinjama i da su u rasponu terapijskih doza koje se primenjuju na ljudima (Quibell i saradnici , 2011).

U nekoliko *ex vivo* studija koje su ispitivale interakcije između ketamina i magnezijuma dobijeni su različiti rezultati. Harrison and Simmonds (1985) su pokazali aditivnu interakciju između ova dva leka na kortikalnim neuronima pacova. Na neuronima hipokampusa miševa, magnezijum smanjuje blokadu NMDA receptora izazvanu ketaminom (MacDonald i sar., 1991). U eksperimentima koji su izvođeni na *Xenopus oocitima*, kombinacija ketamina i magnezijuma inhibira NR1/NR2A i NR1/NR2B glutamatne receptore na sinergisti ki na in (Liu i sar. , 2001). U *in vivo* studiji na pacovima, magnezijum dat intraperitonealno, potencira ketaminom izazvanu anesteziju na sinergisti an na in tj. povećava procenat gubitka refleksa uspravljanja, vreme spavanja i vremena oporavka (Irifune i sar., 1992). Nasuprot tome, Orser i sar. (1997b) pokazali da je hipomagnezijemija kod pacova povezana sa povećanjem osetljivosti na ketamin, što je pokazano u eksperimentima, kroz kraće vreme gubitka refleksa uspravljanja i produženje latentnog perioda povlačenja šape nakon stiskanja prsta. Queiroz-Castro i sar. (2006) su pokazali da na kozama ketamin u kombinaciji sa magnezijumom nije značajno smanjio minimalnu alveolarnu koncentraciju izoflurana u poređenju sa samim ketaminom. Međutim, kod ovaca, intravenski primenjena kombinacija ketamin-magnezijum izaziva značajno dužu analgeziju u poređenju sa analgezijom kada je primenjen sam ketamin ili sam magnezijum (DeRossi i sar., 2012).

Svi ovi efekti na životinjama su pospešili istraživanja kombinacije ketamin-magnezijum na ljudima za postoperativnu analgeziju. Randomizirane dvostruko-slepe, placebo-kontrolisane studije nisu pokazale da se bol/potrošnja analgetika nakon operacije krajnika kod dece smanjuje, kada se male doze ketamina i/ili magnezijum sulfata daju intravenski pre operacije (O'Flaherty i Lin, 2003). U dvostruko-slepoj randomiziranoj kontrolisanoj studiji na pacijentima kojima je tokom anestezije data kombinacija magnezijum sulfata i S(+)-ketamina, pokazano je da su nakon operacije ti pacijenti koristili više opioidnog analgetika piritramida nego pacijenti koji su dobijali sam ketamin (Stessel i sar., 2013).

Koliko je poznato, interakcije između ketamina i magnezijuma u smanjenju telesne temperature nisu ranije ispitivane.

U ovoj studiji, intraperitonealno dat ketamin (5-30 mg/kg) dovodi do značajnog dozno-zavisnog smanjenja telesne temperature kod pacova. Analizom krivih odnosa doze i efekta na telesnu temperaturu ketamina kao i kombinacije ketamin-magnezijum sulfat, utvrđeno je da postoji sinergizam. Takođe je pokazano da je za isti efekt potrebno 5,3 puta smanjenje doze ketamina kada se lekovi daju u fiksnoj kombinaciji tj. masenom odnosu doza (1:1). Pored toga, mala doza magnezijum sulfata (5 mg/kg, sc) povećava efekat ketamina u snižavanju telesne temperature (1,25-10 mg/kg, ip), a takođe smanjuje i morfinску hipertemiju za oko 2,5, odnosno 5,3 puta. Efekat ketamina na telesnu temperaturu dobijen u ovoj studiji u skladu je sa prethodnim eksperimentima (Fahim i sar., 1973; Pitsikas i Boulதாகis, 2009). Kod životinja, drugi NMDA antagonisti kao što su MK-801, dekstrometorfan i LY 235959 daju blagu, ali značajnu hipotermiju, ukazuju i na ulogu endogenog glutamatergičkog sistema koji dovodi do hipertermije aktivacijom NMDA receptora (Corbett i sar., 1990; Rawls i sar., 2002). Shodno činjenici da ketamin pri subanestetičkim dozama blokira NMDA receptore (Øye i sar., 1992), mehanizam kojim ketamin dovodi do hipotermije može se pripisati, bar delimično, blokadi NMDA receptora. Ketamin takođe stupa u interakcije sa kalcijumskim i natrijumskim kanalima, dopaminskim receptorima, kao i sa ponovnim preuzimanjem noradrenalina i serotonina. Takođe ketamin utiče na holinergičku transmisiju (Quibell i sar., 2011). Fahim i saradnici (1973) su prepostavili da ketamin (50-100 mg/kg, ip) dovodi do hipotermije kod pacova, oslobađanjem serotonina u hipotalamusu. Imaju i u vidu da serotonin ima značajnu ulogu u termoregulaciji (Malone i Taylor, 2001), ne može se poreći i učestvovati u serotonergičkom sistemu u hipotermiji izazvanoj ketaminom.

U našoj studiji je po prvi put otkriveno da rastuće doze subanestetičkih doza ketamina dovode do dozno-zavisnog smanjenja morfinске hipertemije. Ovaj efekat je pojačan za oko 5,3 puta u prisustvu male doze magnezijum sulfata.

Dobro je poznato da agonisti  $\mu$ -opioidnih receptora dovode do dozno-zavisne hipertermije (Vučković i sar., 1998; Vučković i sar., 2009; Savić Vujović i sar., 2013). Morfin u dozi 10

mg/kg dovodi do hipertermije i izaziva nishodnu regulaciju podjedinice iRNA, NMDA receptora u hipotalamusu, glavnog termoregulatornog centra u mozgu (Le Greves i sar., 1998). *In vivo* studija mikrodijalize je pokazala da akutni tretman morfinom poveća nivo glutamata u striatumu, strukturi koja ima indirektnu ulogu u termoregulaciji (Huang i sar., 1997). Ovi rezultati ukazuju da je morfinska hipertermija delimično posredovana povećanjem glutamatergičke transmisije preko NMDA receptora koji se nalaze u regionima mozga koji regulišu telesnu temperaturu. U skladu sa ovim, morfinska hipertermija može da se smanji lekovima koji povećavaju preuzimanje glutamata (β-laktamski antibiotici), smanjuju oslobađanje glutamata (riluzol) i blokiraju glutamatergičku transmisiju preko NMDA receptora (dekstrometorfan) (Rawls i sar., 2003; Rawls i sar., 2007). Dekstrometorfan smanjuje morfinsku hipertermiju, pa je ovo u skladu sa našim rezultatima da kombinacija ketamin i ketamin-magnezijum sulfat smanjuju morfinsku hipertermiju. Nalokson, neselektivni antagonist opioidnih receptora, utiče na morfinsku hipertermiju i potvrđuje dobro dokumentovanu ulogu μ-opioidnih receptora u morfinskoj hipertermiji (Savić Vujović i sar., 2013). Ketamin primenjen u dozi u kojoj sam ne daje značajan efekt, potencira efekt naloksona na morfinsku hipertermiju. Bliska rasprostranjenost NMDA i μ-opioidnih receptora je pronađena u gotovo svim delovima centralnog nervnog sistema (CNS) i najnovija istraživanja su pokazala da postoji direktna povezanost μ-opioidnih i NMDA receptora (Rodriguez - Munoz i sar., 2012).

Ispitivanja na životinjama su pokazala da hipotermija ima zaštitno dejstvo kod neuroloških povreda (van der Vorp i sar., 2007). Kod ljudi, neuroprotektivni efekat hipotermije pokazan je pri neurološkom oporavku nakon zastoja srca koji se desio van bolnice (Peberdi i sar., 2010; Deakin i sar., 2010). Pod određenim uslovima, hipotermija se takođe koristi u lečenju teške traumatske povrede mozga, moždanog udara i infarkta miokarda (Bernard i Buist, 2003; Polderman, 2004; Polderman, 2008). Međutim, hipotermija kod budnih ili blago sediranih pacijenata je težak zadatak, dok god se aktiviraju mehanizmi termoregulacione odbrane tj. vazokonstrikcija i drhtavica. Takođe, opšta i neuroaksijalna anestezija dovode do smanjenja telesne temperature, izazivaju odbranu organizma, uključujući i vazokonstrikciju i drhtavicu (Sessler, 2008). Najčešće ispitivani i



najefikasniji lekovi koji bi smanjili drhtavicu su klonidin, meperidin, tramadol, nefopam i ketamin (Mahmood i Zveifler, 2007; Nakasuji i sar., 2011; Park i sar., 2012).

Magnezijum ispoljava slede a dejstva: analgezija, miši na relaksacija, vazodilatacija, spre avanje eklampsije u trudno i, le enje aritmija i dr. (Herroeder i sar., 2011). Može da smanji prag drhtanja (Wadhwa i sar., 2005), ili da dovede do periferne vazodilatacije (Gozdemir i sar., 2010). Intravenskim dodavanjem magnezijum sulfata pove ava se brzina hla enja kod volonetra koji nisu pod anestezijom (Zweifler i sar., 2004). Magnezijum sulfat je efikasan protiv drhtavice u opštoj i lokalnoj anesteziji (Kizilirmak i sar., 1997; Gozdemir i sar., 2010). I niske vrednosti magnezijuma u serumu su povezane sa drhtavicom (Badjatia i sar., 2008). Na osnovu pregleda rezultata 14 studija, zaklju eno je da perioperativna suplementacija magnezijumom spre ava postoperativnu hipomagnezijemiju i smanjuje u estalost postoperativne drhtavice (Lysakowski i sar., 2007). Magnezijum opušta miši e, što dovodi do smanjenja intenziteta drhtanja. Nesedativno svojstvo magnezijuma je veoma zna ajno u potencijalnoj primeni ovog leka u terapiji drhtavice (Kizilirmak i sar., 1997; Lysakowski i sar., 2007; Badjatia i sar., 2008). Za razliku od magnezijuma, ketamin pove ava arterijski pritisak i puls zbog direktne centralne simpatike stimulacije i inhibicije preuzimanja norepinefrina na postganglijskim nervnim završecima simpatikog sistema, a može dovesti do smanjenja osnovne i periferne preraspodele toplote (Ikeda i sar., 2001). Osim toga, i ketamin i magnezijum imaju potencijalne neuroprotektivne efekte (Jellish i sar., 2008; Hudetz i Pagel, 2010). Eksperimentalni podaci sugerišu da se neuroprotektivni efekt hipotermije može pove ati dodavanjem magnezijum sulfata (Song i sar., 2013). Pitsikas i Boultadakis (2009) su pokazali na pacovima da je blaga hipotermija izazavana ketaminom imala zaštitnu ulogu kod životinja u testu prepoznavanja predmeta i smanjila deficit u pam enju prilikom lokacije objekta. Boyko i saradnici (2013) su pokazali da blaga ( 33 do 36° C) i umerena (30 do 32°C) hipotermija dovode do smanjenja nivoa glutamata u krvi pacova, kao i da neuroprotektivna svojstva hipotermije mogu delimi no biti posledica mehanizma koji uklanja glutamat iz krvi.

Ovi nalazi su u skladu sa našim prethodnim rezultatima koji su pokazali da visoka temperatura spoljašnje sredine poveća i telesnu temperaturu i neurotoksičnost fentanila kod pacova (Vučković i saradnici, 1998).

#### **V.4. Mehanizam hipotermnog dejstva ketamina (10 mg/kg)/kombinacije ketamin-magnezijum sulfat**

U našoj studiji je ispitivan hipotermni efekt kombinacije dva NMDA antagonista ketamina i magnezijum sulfata. Utvrđeno je da kombinacija ketamin-magnezijum sulfat dovodi do dozno-zavisnog sniženja telesne temperature kod pacova. Takođe, dokazan je sinergizam ketamina i magnezijum sulfata u snižavanju telesne temperature. Mehanizam hipotermnog dejstva kombinacije ketamin-magnezijum sulfat do sada nije ispitivan. Jedan od zadataka ove teze bio je ispitivanje upravo mehanizma dejstava kombinacije ova dva NMDA antagonista koristeći antagoniste različitih receptora i jonskih kanala koji imaju ulogu u termoregulaciji (tabela V.4).

Tabela V.4: Uticaj antagonista na hipotermni efekt ketamina(10) /kombinacije ketamin(5)-magnezijum sulfat(5)

Antagonist	Ketamin 10 mg/kg	Ketamin 5 mg/kg + magnezijum sulfat 5 mg/kg
Johimbin	+	+
Metizergid	+	-
Bikukulin	∅	∅
L-arginin	∅	-
L-NAME	∅	-
Nalokson	+	∅
Glibenklamid	+	∅

+ produbljuje hipotermiju;

- smanjuje hipotermiju;

nema uticaj

#### **V.4.1. Dejstvo johimbina na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)**

Johimbin u malim dozama (0,5-3 mg/kg) primenjen sam ne uti e na bazalnu telesnu temperaturu pacova što je u skladu sa rezultatima drugih autora (Degernes i sar., 1988). Primenjen u ve im dozama 5-20 mg/kg, johimbin dovodi do dozno-zavisnog sniženja telesne temperature (Papeschi i sar., 1971).

Johimbin (0,5 i 1 mg/kg) je produbio hipotermiju izazvanu ketaminom (10 mg/kg) za 2°C. U ovim dozama johimbin nije uticao na hipotermni efekt kombinacije ketamin-

magnezijum sulfat. Primenjen u dozi od 3 mg/kg johimbin produbljuje hipotermni efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat.

Manje produbljivanje hipotermije ketamin-magnezijum sulfat kombinacije sa johimbinom, u odnosu na sam ketamin, verovatno je posledica dejstva magnezijuma. Moguće je da se magnezijum suprotstavlja dejstvu johimbina u našim eksperimentima. Tako je moguće da magnezijum smanjuje oslobađanje noradrenalina i 5-hidroksitriptamina, što je dovelo da johimbin u dozama 0,5 i 1 mg/kg ne utiče na hipotermni efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat.

Naši rezultati ukazuju da je hipotermija izazvana kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat/ketaminom potencirana johimbinom, antagonistom alfa<sub>2</sub> receptora. Poznato je da anestetici mogu stimulisati adrenoceptore direktnom interakcijom sa receptorima (što može biti slučaj sa ketaminom), ili mogu da aktiviraju simpatički nervni sistem centralnim mehanizmom (što može biti slučaj sa tiopentalom) (Melamed i sar., 2003). Papeschi i saradnici su u svojim eksperimentima zaključili da povećanjem doze johimbina 5-20 mg/kg dolazi do povećanja oslobađanja serotonina. Sniženje telesne temperature može biti povezano sa stimulacijom serotonergičkih receptora putem johimbina, ali ni efekt posredovan dejstvom noradrenalina na mozak, ne može biti isključen. Johimbin antagonizuje ksilazin u anesteziji izazvanoj kombinacijom ketamin-ksilazin, čime je ubrzao oporavak od anestezije kod azijskih lavova, tigrova i leoparda (Sontakke i sar., 2009). U drugim studijama johimbin nije antagonizovao hipotermiju izazvanu anestezijom davanjem kombinacije ksilazin-ketamin (Komulainen i Olson, 1991), što je u skladu sa našim rezultatima.

Johimbin se vezuje za 5-HT<sub>1A</sub> receptore i dovodi do hipotermije (Dilsaver i Davidson, 1989; Winter i Rabin, 1992). Zato što aktivacija 5-HT<sub>1A</sub> receptora dovodi do hipotermije (Li i sar., 2009), moguće je da je johimbin preko ovih receptora produbio hipotermiju kombinacije ketamin-magnezijum sulfat, kao i samog ketamina. Sam johimbin dovodi do hipotermije, koja je antagonizovana korišćenjem WAY 100135, selektivnog antagoniste 5-HT<sub>1A</sub> receptora (Przegalinski i sar., 1994). Kod krmača, johimbin dovodi do

brzog oporavka iz anestezije izazvanoj ksilazinom, ketaminom i telazolom. Upravo zbog toga ovaj lek može biti koristan u veterinarskoj medicini za brz oporavak iz anestezije (Monique i sar., 2014).

#### **V.4.2. Dejstvo bikukulina na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)**

U našim eksperimentima bikukulin u dozi od 1 mg/kg ne utiče na bazalnu temperaturu pacova, dok u dozi od 2 mg/kg dovodi do hipotermije. Bikukulin u dozama od 1 i 2 mg/kg ne utiče na hipotermiju izazvanu ketaminom (10 mg/kg). Takođe, bikukulin ne utiče na hipotermiju izazvanu kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat.

Ishiwata i saradnici (2005) su pokazali da GABA (250-1000 mg/kg i.p.) dovodi do doznazavisnog pada telesne temperature sputanih pacova pri konstantnoj temperaturi okoline od 18-22 °C. Pretretman propranololom (10 mg/kg, i.p.) ili bikukulinom (3 mg/kg, i.p.) potencira hipotermiju izazvanu GABA-om. Hipotermija koju izaziva GABA može nastati zbog oslobađanja serotonina, aktivacijom bikukulin-neosetljivih GABA receptora koji se nalaze na centralnim serotonergičkim neuronima. Ovo može objasniti i efekt bikukulina u dozi od 2 mg/kg na bazalnu telesnu temperaturu u našim eksperimentima.

Razlike naših eksperimenata u odnosu na druge studije u dejstvu bikukulina na telesnu temperaturu mogu biti i posledica različitog načina primene ovog leka.

Može se pretpostaviti da je GABA<sub>A</sub>-serotonin interakcija jako bitna za termoregulaciju i da postoji u preoptičkoj regiji ili u dorzomedijalnom hipotalamusu (Dimicco i Zaretsky, 2007) ili da projekcije dorzalnih i medijalnih vlakana različitou utiču na bazalnu i stresom izazvanu telesnu temperaturu. Pokazano je da 5-HT inhibira oslobađanje GABA-e presinaptički u termoregulatornoj hipotalamičkoj medijalnoj preoptičkoj regiji, a ovaj efekt može biti blokirano antagonistom 5-HT<sub>1A</sub> receptora (Lee i sar., 2008).

Ne može se isključiti ni mogućnost nishodne aktivacije hipotalamičkih 5-HT<sub>1A</sub> receptora, nakon direktne aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora, koja je neophodna za održavanje telesne temperature. Hipoteza potencijalnih interakcija GABA<sub>A</sub> receptora i 5-HT<sub>1A</sub> receptora, treba detaljno da se ispita.

Van Bogaert i sar., (2006) ispitivali su hipertermiju izazvanu stresom. Ispitivana je uloga 5-HT<sub>1A</sub> receptora u stresom izazvanoj hipertermiji, a koristili su se 5-HT<sub>1A</sub> receptor *knockout* miševi. Pokazano je da GABA-ergički lekovi sa anksiolitičkim dejstvom stimulišu  $\alpha_2$  subjedinicu GABA<sub>A</sub> receptora. Takođe je pokazano da je  $\alpha_1$  subjedinica uključena u regulaciju bazalne telesne temperature i da njena stimulacija može izazvati hipotermiju.

U našim eksperimentima je pokazano da GABA<sub>A</sub> receptori nemaju ulogu u hipotermiji izazvanoj kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat, kao ni u ketaminom izazvanoj hipotermiji.

#### **V.4.3. Dejstvo metizergida na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)**

Primenjen sam, metizergid (0,5 mg/kg) ne utiče na bazalnu telesnu temperaturu, dok u dozi od 1 mg/kg kada u 120 minuta dovodi do hipertermije. Komiskey i saradnici (1975) su u svojim eksperimentima takođe dobili hipertermiju nakon davanja metizergida, koja je verovatno posledica oslobađanja prostaglandina.

Metizergid u dozi od 0,5 mg/kg ne utiče na hipotermni efekt ketamina u dozi od 10 mg/kg. U dozi od 1 mg/kg metizergid produbljuje hipotermiju izazvanu ketaminom 10 mg/kg ( $p < 0,05$ ). Znači da se preko serotonergičkih receptora ne antagonizuje efekt samog ketamina, već se produbljuje.

Metizergid u dozi od 1 mg/kg smanjuje hipotermiju izazvanu kombinacijom ketamin(5)-magnezijum(5), ali bez statističke značajnosti. U ovoj dozi kombinacija metizergid-ketamin-magnezijum sulfat dovodi i do hipertermnog efekta u 120 minuta, što je verovatno rezultat oslobađanja protaglandina (Komiskey HL i Rudy TA, 1975). U dozi od 0,5 mg/kg metizergid antagonizuje hipotermni efekt izazvan kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat. Svakako, možemo reći da se hipotermni efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat dešava preko serotonergičkog sistema, što je potvrđeno korišćenjem antagoniste serotonergičkih receptora metizergida. Za određivanje podtipa serotoninskih receptora, bili bi potrebni selektivni antagonisti 5-HT receptora.

Razlike u dejstvu metizergida na ketamin (10 mg/kg) i kombinaciju ketamin(5)-magnezijum sulfat(5), mogu biti i posledica presinapti ke inhibicije 5-HT receptora.

Poznato je da 5-hidroksitriptofan izaziva hipotermiju. Fahim i saradnici (1973) su u svojim eksperimentima na pacovima zaklju ili da ketamin dovodi do hipotermije verovatno preko osloba anja 5-hidroksitriptamina u hipotalamusu i da je ovaj efekt sli an onom koji daje morfin kod netolerantnih pacova. U istraživanju Fahima i saradnika koriš ene su rastu e doze ketamina 20-100 mg/kg. Me utim, hipotermni efekt samog ketamina u našim eksperimentima nije antagonizovan metizergidom. Razlika izme u naših eksperimenata i istraživanja Fahima i saradnika (1973) je verovatno posledica koriš enja razli itih doza. Mi smo koristili dozu od 10 mg/kg koja je mnogo manja u odnosu na one koje su koriš ene u njihovim eksperimentima (Fahim i sar., 1973).

Lin i saradnici (1981) su zaklju ili da hipotermija izazvana natrijum pentobarbitalom ili ketaminom bila antagonizovana deplecijom nivoa serotonina u mozgu pomo u 5,7-dihidroksitriptamina ili p-hlorofenilalaninom. Anestetici, kao što su pentobarbital ili ketamin dovode do hipotermije pove avaju i gubitak toplote i smanjenjem produkcije metaboli ke toplote, verovatno osloba anjem endogenog serotonina u mozgu (Lin i sar., 1981).

Pokazano je da antagonisti 5-HT<sub>2</sub> receptora-katanserin, ritanserin i DV-7028 ne uti u na hipotermiju izazvanu 5-hidroksitriptofanom, a da je neselektivni 5-HT antagonist-metizergid u dozi od 1 mg/kg smanjio ovu hipotermiju. Ovi rezultati su pokazali da 5-HT<sub>2</sub>receptori kod miševa nisu uklju eni u 5-HT posredovanoj termoregulaciji (Morishima i Shibano, 1995). Ovo je u skladu sa našim rezultatima. Metizergid je antagonist 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> i 5-HT<sub>2C</sub> receptora. Naši rezultati su u skladu sa prethodnim studijama, i mogu e je da se hipotermni efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat dešava preko 5-HT<sub>1A</sub>receptora. Me utim u jednoj od studija je pokazano da postoji funkcionalna povezanost i interakcija izme u 5-HT<sub>1A</sub> i 5-HT<sub>2A</sub> receptora na regulaciju telesne temperature kod pacova (Salmi i Ahlenius,1998).

Aktivacija serotonergih receptora u preopti kom prednjem delu hipotalamusa posreduje u termoregulaciji pacova. Aktivacija serotonergih receptora u hipotalamusu

smanjuje produkciju toplote i/ili povećava gubitak toplote, dok inhibicija serotonergičkih receptora u hipotalamusu povećava produkciju toplote i/ili smanjuje gubitak toplote kod pacova (Lin i sar., 1983). Ovo je u skladu sa našim eksperimentima i još jedna potvrda da se hipotermija izazvana kombinacijom ketamina i magnezijum sulfata dešava preko serotonergičkog sistema. Moguće je da je magnezijum sulfat smanjio oslobađanje serotonina, pa je metizergid uspeo da antagonizuje hipotermni efekt ove kombinacije.

Cordeiro i saradnici (2014) su ispitivali efekte povećanja anorganičnog triptofana centralno na fizičku aktivnost i na termoregulaciju, kada je pacovima dat parahlorofenilalanin (p-CPA), inhibitor konverzije triptofana u serotonin. Davanje triptofana pacovima rezultiralo je povećanim skladištenjem toplote i redukcijom umora kod pacova koji su bili aktivni, dok je pretretman sa p-CPA blokirao efekte triptofana na termoregulaciju i aktivnost pacova. Tako je utvrđeno da serotonin učestvuje u mehanizmu gubitka toplote tokom vežbanja. Aktivacija centralnih 5-HT<sub>3</sub> receptora je efektivnija u indukciji hipotermije nego u smanjenju termogeneze i povećanju gubitka toplote (Voronova i sar., 2011).

#### **V.4.4. Dejstvo L-arginina i L-NAME na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)**

L-arginin (5 i 10 mg/kg) ne utiče na bazalnu telesnu temperaturu pacova. L-arginin u kombinaciji sa ketaminom 10 mg/kg, ne utiče na ketaminsku hipotermiju. Kada se primeni sa kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat, L-arginin u dozi od 5 mg/kg dovodi do smanjenja hipotermije, ali bez postojanja statističke značajnosti. U dozi od 10 mg/kg L-arginin smanjuje hipotermiju izazvanu kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat za 0,7 °C (postoji statistička značajnost  $p < 0,05$ ). Kada se kombinaciji L-arginin-ketamin-magnezijum sulfat doda L-NAME, dolazi do delimične redukcije hipotermnog efekta kombinacije ketamin-magnezijum sulfat. Naši rezultati ukazuju da NO ima dualno dejstvo u hipotermnom efektu kombinacije ketamin-magnezijum sulfat.

U našim eksperimentima L-NAME (2,5 i 5) primenjen sam ne utiče na bazalnu temperaturu pacova. Ulugol i saradnici (2000) su pokazali da visoke doze ketamina i N-



nitro-L-arginin metilestar mogu izazvati hipotermiju. Njihovi eksperimenti ukazuju da su NMDA receptori i azotni oksid uključeni u termoregulaciju.

L-NAME u dozi od 10 mg/kg u kombinaciji sa ketaminom 10 mg/kg dovodi do produbljenja ketaminske hipotermije, ali bez postojanja statističke značajnosti. U našim eksperimentima L-NAME nije uticao na ketaminsku hipotermiju.

L-NAME u dozi od 2,5 mg/kg ne utiče na kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat, dok u dozi od 5 mg/kg antagonizuje hipotermni efekt ove kombinacije u 60 i 90 minuta. Ovi rezultati ukazuju da je NO uključen u hipotermni efekt kombinacije ketamin(5)-magnezijum sulfat(5).

Postoji povezanost između NMDA receptora i NO. Aktivacija NMDA receptora stimuliše azotni oksid signalni put, za koji je pokazano da ima važnu ulogu u spinalnom nociceptivnom procesu. Intratekalna primena NMDA antagonista ili inhibicija NOS i solubilne guanilat ciklaze, blokira NMDA izazvanu nocicepciju (Kawamata and Omote, 1999). U *in vitro* eksperimentima je pokazano da NMDA tretman dovodi do povećanja oslobađanja cGMP iz kičmene moždine odraslih pacova i ovo povećanje može biti blokirano inhibitorima NOS (Kawamata and Omote, 1999). Aktivacija spinalnih NMDA receptora može izazvati bol stimulišući NOS da dovede do stvaranja NO, koji dalje može aktivirati solubilnu guanilat ciklazu da poveća cGMP (Ashina i sar., 1999; Lizarraga i sar., 2008).

Blokada NMDA receptora ketaminom, blokira stimulaciju NO sintaze i inhibira stvaranje cGMP u kulturama cerebralnih neurona (Gonzales i sar., 1995). Ovo je u skladu sa našim rezultatima gde je pokazano da L-arginin kao prekursor NO, ne utiče na ketamin u dozi od 10 mg/kg. Očigledno je da L-arginin produkuje NO, a da ketamin inhibira njegovu sintezu, tako da L-arginin nije promenio hipotermni efekt ketamina. L-NAME nije uticala na hipotermni efekt ketamina, što je rezultat verovatno dvostruke inhibicije NO.

Ketamin stimuliše L-arginin/NO/ciklični GMP put u izazivanju antinociceptivnih efekata i na taj način izaziva periferni antinociceptivni efekt kod pacova (Romero i sar., 2011). L-arginin u kombinaciji sa ketamin-magnezijum sulfatom dovodi do antagonizma

hipotermnog efekta ove kombinacije. L-arginin i magnezijum sulfat pove avaju osloba anje NO (Houston,2011), dok ga ketamin blokira.

Bulutcu i saradnici (2002) su pokazali da L-NAME, inhibitor azot oksid sintaze, antagonizuje antinociceptivne efekte ketamina kod miševa. Nasuprot ovome intavenski primenjen ketamin nije imao efekt na NOS aktivnost. U našim eksperimentima intraperitonealno dat ketamin je dao hipotermni efekt, dok supkutano dat L-NAME nije antagonizovao ovaj hipotermni efekt.

L-NAME (1-3, ali ne u dozi od 10, mg/kg) smanjuje deficit memorije koju izaziva ketamin. Rezultati ukazuju da anestetici ke doze ketamina popravljaju komponente memorije (skladištenje i/ili preuzimanje informacija) i da nitritni oksid modulira njihove efekte na ponašanje (Boultadakis i Pitsikas, 2011).

L-NAME u dozi od 2,5 mg/kg potpuno blokira hipotermni efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat. O igledno da magnezijum koji uti e na pove anje produkcije NO, preovladava u ovom bloku. Svakako ovi rezultati ukazuju na uticaj NO u hipotermnom efektu kombinacije ketamin-magnezijum sulfat.

#### **V.4.5. Dejstvo naloksona na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)**

Neselektivni antagonist opioidnih receptora nalokson (1 i 3 mg/kg) nije uticao na bazalnu telesnu temperaturu pacova. U jednoj od studija je otkriveno da 30 mg/kg naloksona ili naltreksona dovodi do hipotermije i da je hipotermija izražena i u tamnom i u svetlom delu ciklusa (Eikelboom, 1987).

Nalokson u dozi od 1 mg/kg nije uticao na hipotermiju izazvanu ketaminom (10 mg/kg). Nalokson u dozi od 3 mg/kg je produbio ketaminsku hipotermiju za maksimalno 1,5 °C.

Nalokson nije uticao na hipotermiju izazvanu kombinacijom ketamin-magnezijum sulfat. U našim eksperimentima (Vu kovi i sar., 2014) pokazano je da je nalokson u dozi od 3 mg/kg potpuno antagonizovao kombinaciju morfin (2,6 mg/kg)-ketamin (5mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg), što je ukazalo na posredovanje opioidnih receptora u ovoj

kombinaciji. Za razliku od tih eksperimenata, hipotermni efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat nije antagonizovan naloksonom što je ukazalo na zaklju ak da se hipotermni efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat najverovatnije ne ostvaruje putem opioidnih receptora. Na osnovu naših eksperimenata možemo zaklju iti da se magnezijum u kombinaciji ketamin-magnezijum sulfat suprotstavlja dejstvu naloksona.

Bhat i sar., (1998) su pokazali u svojim eksperimentima da NMDA tretman pove ava NOS aktivnost u preopti kom anteriornom i u medijalnom hipotalamusu *in vitro*. Efekt je bio potpuno antagonizovan davanjem MK-801. U *in vivo* studijama pokazano je da tretman naloksonom zna ajno pove ava osloba anje glutamata u preopti koj regiji kod neanesteziranih, slobodno pokretnih mužjaka pacova. Ovo može objasniti naše eksperimente. Nalokson u kombinaciji sa ketaminom produbljuje ketaminsku hipotermiju, što je verovatno rezultat dejstva naloksona koji pove ava osloba anje glutamata i pove ava aktivnost NOS-a, nasuprot blokadi glutamata ketaminom, pa je rezultat produbljivanje ketaminske hipotermije.

Možemo re i i da se preko opioidnih receptora produbljuje ketaminska hipotermija u našim eksperimentima, dok ovi receptori ne u estvuju u ketamin-magnezijum sulfat izazvanoj hipotermiji.

Neselektivni antagonist opioidnih receptora nalokson (1,5 mg/kg, s.c.) potencira hipotermiju i blokira hipertermiju koju izaziva deltorfin II-selektivni agonist delta opioidnih receptora. Tako e nalokson potencira hipotermiju izazvanu malom dozom deltorfina II. Bifazni efekt deltorfina II ukazuje na interakciju izme u delta i mi opioidnih receptora u termoregulaciji kod pacova. Ovi rezultati ukazuju na dve centralne adaptacije koje se javljaju u hladnim okolnostima: non-mi opioidni process, koji pove ava osetljivost na toplotu i mi-opioidni process koji potencira hipertermiju (Salmi i sar., 2003; Wilson i Howard, 1996). U našim eksperimentima mogu e je da je nalokson u dozi od 3 mg/kg produbio ketaminsku hipotermiju upravo preko -opioidnih receptora.

Pacheco i saradnici (2014) su u svojim eksperimentima pokazali da nalokson antagonizuje ketaminom izazvanu antinocicepciju na dozno-zavistan na in. U njihovim eksperimentima je pokazano da su endogeni opiodi kao i  $\mu$ - i -opioidni receptori uklju eni u ketaminom

izazvanoj centralnoj antinocicepciji, dok  $\mu$ -opioidni receptori nisu uključeni u ovaj efekt (Pacheco i sar., 2014).

#### **V.4.6. Dejstvo glibenklamida na ketamin (10 mg/kg) /kombinaciju ketamin (5 mg/kg)-magnezijum sulfat (5 mg/kg)**

Glibenklamid (3 i 6 mg/kg) ne utiče na bazalnu telesnu temperaturu pacova. Glibenklamid (3 i 6 mg/kg) produbljuje hipotermiju izazvanu ketaminom u dozi od 10 mg/kg. Za razliku od dejstva na ketamin, glibenklamid u ovim dozama ne utiče na hipotermni efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat. Znači da  $K_{ATP}$  kanali nisu uključeni u hipotermni efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat. Verovatno se magnezijum sulfat suprotstavio efektu glibenklamida. Takođe, moguće je da magnezijum sulfat blokira blokadu glibenklamidom i da zato nema promene hipotermnog dejstva kombinacije ketamin-magnezijum sulfat prilikom delovanja glibenklamida. Rezultati Vastani i sar. (2013) ukazuju da vezivanje magnezijumovih jona zavisi od tipa i konformacijskog stanja voltažno-zavisnih natrijumskih kanala. Poznato je da magnezijum deluje i na kalijumove kanale. Magnezijum kao pozitivan jon možda sprečava prodiranje glibenklamida u  $K_{ATP}$  kanal, a ketamin u kanal NMDA receptora pa zbog toga u našim rezultatima glibenklamid ne utiče na kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat.

Ketamin inhibira aktivnost  $K_{ATP}$  kanala izazvanih nikorandilom na dožno-zavistan na in. Povećanje intracelularnog MgADP smanjuje inhibitornu jačinu racemata ketamina na glatkim mišićima aorte pacova (Kawano i sar., 2010). Poznato je da Mg i NO imaju ulogu u regulaciji fiziološkog opstanka i smrti mišića. Yamanaka i sar., (2013) su pokazali da je NO uključeno u regulaciju  $Mg^{2+}$ . Pokazano je da signalni put NO/cGMP/protein kinaza G (PKG) dovodi do povećanja  $Mg^{2+}$ , a mobilizacija  $Mg^{2+}$  se dešava za vreme oslobađanja  $Mg^{2+}$  iz mitohondrija izazvan otvaranjem mitohondrijalnih  $K_{ATP}$  kanala (Yamanaka i sar., 2013).

Glibenklamid dati intracerebroventrikularno antagonizuje hipertermiju izazvanu supkutano datim morfinom na dožno-zavistan na in. Ovim rezultatima je pokazano da  $K_{ATP}$  kanali imaju važnu ulogu kao modulatori hipertermnog efekta mu agonista (Narita i sar.,

1992). Efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat se ne dešava preko opioidnih receptora. Tako e je pokazano da glibenklamid i nalokson produbljuju ketaminom izazvanu hipotermiju na sli an na in. Mogu e je da se magnezijum sulfat u našim eksperimentima suprotstavlja dejstvu kako glibenklamida, tako i naloksona.

## VI ZAKLJU CI

1. Antinociceptivni i hipertermni efekti derivata morfina (fenantrenski tip) su dozno-zavisni.
2. Antinociceptivni i hipertermni efekti derivata fentanila (4-anilinopiperidinski tip) su dozno-zavisni.
3. Redosled ja ine u izazivanju hipertermije derivata fentanila je veoma sli an redosledu njihove antinociceptivne ja ine.
4. Jedinjenja morfina su tako e imala sli an redosled ja ine u izazivanja hipertermije i antinocicepcije.
5. Derivati morfina (fenantrenski tip) izazivaju hipertermiju kod pacova u dozama oko 2 puta manjim od njihove srednje efektivne antinociceptivne doze.
6. Derivati fentanila (4-anilinopiperidinski tip) izazivaju hipertermiju kod pacova u dozama 6-11 puta ve im od njihove srednje efektivne antinociceptivne doze.
7. Razlika izme u dve glavne klase opioidnih lekova, derivata morfina (fenantrenski tip) i derivata fentanila (4-anilinopiperidinski tip) je u relativnoj ja ini izazivanja hipertermije u odnosu na analgeziju.
8. Antinociceptivni i hipertermni efekti derivata morfina i derivata fentanila poništavaju se davanjem naloksona, neselektivnog antagoniste opioidnih receptora, što ukazuje na to da se njihovi efekti ostvaruju posredstvom opioidnih receptora.
9. Terapijski indeksi (srednja efektivna doza za hipertermiju ( $HD_{50}$ )/srednja efektivna antinociceptivna doza ( $AD_{50}$ ), za derivate fentanila su relativno visoki, dok su za jedinjenja morfina manja ili jednaka jedinici ( 1).
10. Ketamin nema antinociceptivno dejstvo u testu potapanja repa u toplu vodu.
11. Magnezijum sulfat nema antinociceptivno dejstvo u testu potapanja repa u toplu vodu.
12. U akutnom nociceptivnom bolu kod pacova postoji sinergizam u antinociceptivnom dejstvu izme u ketamina i magnezijum sulfata datih u malim dozama i u odre enim proporcijama doza.

13. Redosled davanja magnezijum sulfata i ketamina je važan u akutnom nociceptivnom bolu kod pacova, jer male doze magnezijum sulfata mogu značajno više da povećaju efekt ketamina ako se primene posle, nego ako se primene pre ketamina.
14. Male doze magnezijum sulfata mogu značajno povećati analgetički efekt kombinacije morfin-ketamin, pod uslovom da se magnezijum sulfat primeni posle ovih lekova. Ove kombinacije bi mogle smanjiti neželjena dejstva pojedinačno datih lekova.
15. Nalokson, neselektivni antagonist opioidnih receptora antagonizuje antinociceptivni efekt kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat, ukazujući da se efekt kombinacije dešava preko opioidnih receptora.
16. Kombinacija niskih doza morfina, ketamina i magnezijum sulfat ne remeti značajno motornu aktivnost pacova u odnosu na nisku dozu samog morfina.
17. Ketamin izaziva dozno-zavisno sniženje telesne temperature pacova.
18. Magnezijum sulfat ne utiče na telesnu temperaturu pacova.
19. Postoji sinergistička interakcija između magnezijum-sulfata i ketamina u dejstvu na telesnu temperaturu tj. izazivanju hipotermije.
20. Magnezijum sulfat povećava efekt ketamina u snižavanju telesne temperature za oko 2,5 puta.
21. Interakcija ketamin-magnezijum sulfat se najverovatnije odvija na nivou NMDA receptora, a glutamatergički sistem igra ključnu ulogu u regulaciji telesne temperature.
22. Magnezijum sulfat ne utiče na morfinску hipertermiju.
23. Rastuće doze subanestetičkih doza ketamina dozno-zavisno smanjuju morfinску hipertermiju.
24. Efekt ketamina u snižavanju morfinске hipertermije pojačan je za oko 5,3 puta u prisustvu male doze magnezijum sulfata.
25. Nalokson potpuno antagonizuje efekt kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat u dejstvu na telesnu temperaturu.
26. Hipotermija koju izaziva ketamin, može se produbiti blokadom adrenergičkog ( $\alpha_2$  adrenergičkih receptora), serotonergičkog i opioidergičkog sistema, kao i blokadom ATP-senzitivnih  $K^+$  kanala.

27. U hipotermnom efektu ketamina ne u estvuje GABA-ergi ki, kao ni NO sistem.
28. U hipotermnom efektu kombinacije ketamin-magnezijum sulfat u estvuje i serotonergi ki sistem, ali ulogu ima i NO sistem.
29. Hipotermija koju izaziva kombinacija ketamin-magnezijum sulfat, može se produbiti blokadom adrenergi kog sistema (blokadom alfa<sub>2</sub> adrenergi kih receptora).
30. U hipotermnom efektu kombinacije ketamin-magnezijum sulfat ne u estvuje GABA-ergi ki (GABA<sub>A</sub> receptori), opioidergi ki sistem, kao ni ATP-senzitivni K<sup>+</sup> kanali.



## VII LITERATURA

1. Adams HA. Abteilung Anästhesiologie I, Medizinischen Hochschule Hannover. *Anaesthesiologie und Reanimation* 1998; 23(3):60-63.
2. Adler MW, Geller EB. Thermoregulation and the opioid system. *NIDA Res. Monogr* 1989; 95:180-5.
3. Adriaenssens G, Vermeyen KM, Hoffmann VL, Mertens E, Adriaenssens HF. Postoperative analgesia with i.v. patient-controlled morphine: effect of adding ketamine. *Br J Anaesth* 1999; 83: 393-6.
4. Allen RM, Granger AL, Dykstra LA. The competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist (-)-6-phosphonomethyl-deca-hydroisoquinoline-3-carboxylic acid (LY235959) potentiates the antinociceptive effects of opioids that vary in efficacy at the mu-opioid receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 307:785-92.
5. Almeida MC, Branco LG. Role of nitric oxide in insulin-induced hypothermia in rats. *Brain Res Bull* 2001; 54(1):49-53.
6. Ashina M, Lassen LH, Bendtsen L, Jensen R, Olesen J. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on chronic tension-type headache: a randomised crossover trial. *Lancet* 1999; 353: 287–289.
7. Badjatia N, Strongilis E, Gordon E, Prescutti M, Fernandez L, Fernandez A, Buitrago M, Schmidt JM, Ostapkovich ND, Mayer SA. Metabolic impact of shivering during therapeutic temperature modulation: the Bedside Shivering Assessment Scale. *Stroke* 2008; 39:3242-7.
8. Baker AK, Meert TF. Functional effects of systemically administered agonists and antagonists of mu, delta, and kappa opioid receptor subtypes on body temperature in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 302: 1253-64.
9. Bell RF, Dahl JB, Moore RA, Kalso E. Perioperative ketamine for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 25:CD004603.

10. Benamar K, Yondorf M, Barreto VT, Geller EB, Adler MW. Deletion of mu-opioid receptor in mice alters the development of acute neuroinflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 323:990-4.
11. Bennett GJ. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA receptor. *J Pain Symptom Manage* 2000; 19(1):S2-6.
12. Berenyi S, Toth Z, Sepsi A, Zekany A, Gyulai S, Makleit S. Synthesis and biological evaluation of some halogenated 6,14-ethenomorphinan derivatives. *Med. Chem. Res.* 1995; 5(1):26-32.
13. Bernard SA, Buist M. Induced hypothermia in critical care medicine: a review. *Crit Care Med.* 2003; 31:2041-51.
14. Berry PH, Convington EC, Dahl JL, Katz JA, Miaskowski C. *Pain: Current understanding of assessment management and treatments.* Glenview: American Pain Society, 2006.
15. Bhat GK, Mahesh VB, Ping L, Chorich L, Wiedmeier VT, Brann DW. Opioid-glutamate-nitric oxide connection in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 1998;139(3):955-60.
16. Borazan H, Kececioglu A, Okesli S, Otelcioglu, S.. Oral magnesium lozenge reduces postoperative sore throat: a randomized, prospective, placebo-controlled study. *Anesthesiology* 2012; 117:512-8.
17. Bossard AE, Guirimand F, Fletcher D, Gaude-Joindreau V, Chauvin M, Bouhassira D. Interaction of a combination of morphine and ketamine on the nociceptive flexion reflex in human volunteers. *Pain.* 2002; 98(1-2):47-57.
18. Boulant JA. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *J Appl Physiol* (1985). 2006; 100(4):1347-54.
19. Boultadakis A, Pitsikas N. Anesthetic ketamine impairs rats' recall of previous information: the nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-L-arginine methylester antagonizes this ketamine-induced recognition memory deficit. *Anesthesiology.* 2011; 114(6):1345-53.

20. Bourne H, von Zastrow M. Drug receptors & pharmacodynamics. In: Katzung BG, editor, Basic and Clinical Pharmacology, New York: The McGraw-Hill Companies Inc, 2007;11-33.
21. Boyko M, Kuts R, Gruenbaum BF, Melamed I, Gruenbaum SE, Klein M, Shapira Y, Zlotnik A. The role of hypothermia in the regulation of blood glutamate levels in naive rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 2013; 25:174-83.
22. Bulutcu F, Dogrul A, Güç MO. The involvement of nitric oxide in the analgesic effects of ketamine. *Life Sci.* 2002;71(7):841-53.
23. Campos AR, Santos FA, Rao VS. Ketamine-induced potentiation of morphine analgesia in rat tail-flick test: role of opioid-, alpha2-adrenoceptors and ATP-sensitive potassium channels. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2006; 29:86-9.
24. Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF, Sved AF. Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure *J Comp Neurol.* 2003; 460(3):303-26.
25. Cao WH, Morrison SF. Brown adipose tissue thermogenesis contributes to fentanyl-evoked hyperthermia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2005; 288:723-32.
26. Carstensen M, Møller AM. Adding ketamine to morphine for intravenous patient-controlled analgesia for acute postoperative pain: a qualitative review of randomized trials. *British Journal of Anaesthesia* 2010; 104:401-6.
27. Chen X, McClatchy DB, Geller EB, Tallarida RJ, Adler MW. The dynamic relationship between mu and kappa opioid receptors in body temperature regulation. *Life Sci* 2005; 78:329-33.
28. Colman AS, Miller JH. mu-1 opioid receptor stimulation decreases body temperature in conscious, unrestrained neonatal rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(6):377-81.
29. Commons KG, van Bockstaele EJ, Pfaff DW. Frequent colocalization of mu and NMDA-type glutamate receptors at postsynaptic sites in periaqueductal gray neurons. *J Comp Neurol* 1999; 408:549-59.

30. Corbett D, Evans S, Thomas C, Wang D, Jonas RA. MK-801 reduced cerebral ischemic injury by inducing hypothermia. *Brain Res* 1990; 514:300-4.
31. Cordeiro LM, Guimarães JB, Wanner SP, La Guardia RB, Miranda RM, Marubayashi U, Soares DD. Inhibition of tryptophan hydroxylase abolishes fatigue induced by central tryptophan in exercising rats. *Scand J Med Sci Sports*. 2014; 24(1):80-8.
32. Davidson EM, Carlton SM. Intraplantar iwection of dextrorphan, ketamine or memantine attenuates formalininduced behaviours. *Brain Res* 1998; 785:136-42.
33. Davis MP. Evidence from basic research for opioid combinations. *Expert. Opin. Drug Discov* 2012; 7:165-78.
34. Deakin CD, Nolan JP, Soar J, Sunde K, Koster RW, Smith GB, Perkins GD, 2010. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation. Adult advanced life support. *Resuscitation*. 2010; 81:1305-52.
35. Decollogne S, Tomas A, Lecerf C, Adamowicz E, Seman M. NMDA receptor complex blockade by oral administration of magnesium: comparison with MK-801. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997; 58(1):261-8.
36. Degernes LA, Kreeger TJ, Mandsager R, Redig PT. Ketamine-xylazine anesthesia in red-tailed hawks with antagonism by yohimbine. *J Wildl Dis*. 1988; 24(2):322-6.
37. DeRossi R, Pompermeier CT, Silva-Neto AB, Barros AL, Jardim PH, Frazílio FO. Lumbosacral epidural magnesium prolongs ketamine analgesia in conscious sheep. *Acta Cirurgica Brasileira* 2012; 27:137-43.
38. Dietis N, Rowbotham DJ, Lambert DG. Opioid receptor subtypes: fact or artifact? *Br. J. Anaesth* 2011; 107: 8-18.
39. Dilsaver SC, Davidson RK. Chronic treatment with amitriptyline produces subsensitivity to the hypothermic effects of yohimbine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1989; 13:211–215.
40. Dimicco JA, Zaretsky DV. The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292(1):47-63.

41. Douglas BG, Dagirmanfian R. The effects of magnesium deficiency on ketamine sleeping times in the rat. *British Journal of Anaesthesia* 1975; 47:336-40.
42. Ebert B, Thorkildsen C, Andersen S, Christrup LL, Hjeds H. Opioid analgesics as noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 553-9.
43. Eikelboom R. Naloxone, naltrexone and body temperature. *Life Sciences* 1987; 40(11):1027-32.
44. Eisenberg E, Kleiser A, Dortort A, Haim T, Yarnitsky D. The NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor antagonist memantine in the treatment of postherpetic neuralgia: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Pain* 1998; 2: 321-7.
45. Fahim I, Ismail M, Osman OH. Role of 5-hydroxytryptamine in ketamine-induced hypothermia in the rat. *Br J Pharmacol* 1973; 48(4):570-6.
46. Fawcett WJ, Haxby EJ, Male DA. Magnesium: physiology and pharmacology. *Br J Anaesth* 1999; 83:302-20.
47. Feldberg W, Lotti VJ. Temperature responses to monoamines and an inhibitor of MAO injected into the cerebral ventricles of rats. *Br J Pharmacol Chemother.* 1967; 31(1):152-61.
48. Fischer BD, Carrigan KA, Dykstra LA. Effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on acute morphine-induced and l-methadone-induced antinociception in mice. *Journal of Pain* 2005; 6:425-33.
49. Fischer BD, Dykstra LA. Interactions between an N-methyl-D aspartate antagonist and low-efficacy opioid receptor agonists in assays of schedule-controlled responding and thermal nociception. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 318(3):1300-6.
50. Forman LJ. NMDA receptor antagonism produces antinociception which is partially mediated by brain opioids and dopamine. *Life Sci* 1999; 64:1877-87.
51. Fraga D, Machado RR, Fernandes LC, Souza GE, Zamprônio AR. Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -independent fever. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2008; 294:411-20.

52. Freedman DX, Giarman NJ. LSD-25 and the status and level of brain serotonin, *Ann N Y Acad Sci* 1962; 96:98-107.
53. Gonzales JM, Loeb AL, Reichard PS, Irvine S. Ketamine inhibits glutamate-, N-methyl-D-aspartate-, and quisqualate-stimulated cGMP production in cultured cerebral neurons. *Anesthesiology* 1995; 82(1):205-13.
54. Gozdemir M, Usta B, Demircioglu RI, Muslu B, Sert H, Karatas OF. Magnesium sulphate infusion prevents shivering during transurethral prostatectomy with spinal anesthesia: a randomized, double-blinded, controlled study. *J Clin Anesth* 2010; 22:184-9.
55. Grisel JE, Allen S, Nemmani KV, Fee JR, Carliss R. The influence of dextromethorphan on morphine analgesia in Swiss Webster mice is sex-specific. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2005; 81:131-8.
56. Groer CE, Schmid CL, Jaeger AM, Bohn LM. Agonist-directed interactions with specific beta-arrestins determine mu-opioid receptor trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *J. Biol. Chem* 2011; 286:31731–41.
57. Gupta LK, Gupta R, Tripathi CD. N-Methyl-D-aspartate receptor modulators block hyperalgesia induced by acute low-dose morphine. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2011; 38:592-7.
58. Hales TG. Arresting the development of morphine tolerance and dependence. *British Journal of Anaesthesia* 2011; 107: 653-5.
59. Handler CM, Geller EB, Adler MW. Effect of selective mu-, kappa- and delta selective opioid agonist on thermoregulation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 43:1209-1216.
60. Handler CM, Piliero TC, Geller EB, Adler MW. Effect of ambient temperature on the ability of mu-, kappa- and delta-selective opioid agonists to modulate thermoregulatory mechanisms in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268(2):847-55.
61. Harrison NL, Simmonds MA. Quantitative studies on some antagonists of N-methyl-d-aspartate in slices of rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* 1985; 84:381–91.

62. Herroeder S, Schönherr ME, De Hert SG, Hollmann MW. Magnesium--essentials for anesthesiologists. *Anesthesiology* 2011; 114: 971-93.
63. Hirota K, Lambert DG. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. *British Journal of Anaesthesia* 1996; 77: 441-4.
64. Hirota K, Lambert DG. Ketamine: Ketamine: new uses for an old drug? *British Journal of Anaesthesia* 2011; 107:123-6.
65. Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, Johnson RL, Chen ZF, Richerson GB. Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *J Neurosci.* 2008; 28(10):2495-505.
66. Hoffman JM, Brown JW, Sirlin EA, Benoit AM, Gill WH, Harris MB, Darnall RA. Activation of 5-HT1A receptors in the paraventricular nucleus decreases shivering during cooling in the conscious piglet *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293(1):518-27.
67. Holtman JR Jr, Crooks PA, Johnson-Hardy J, Wala EP. Interaction between morphine and norketamine enantiomers in rodent models of nociception. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2008; 90: 769-77.
68. Houston M. The role of magnesium in hypertension and cardiovascular disease. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2011; 13(11):843-7.
69. Huang NK, Tseng CJ, Wong CS, Tung CS. Effects of acute and chronic morphine on DOPAC and glutamate at subcortical DA terminals in awake rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 56:363-71.
70. Hudetz JA, Pagel PS. Neuroprotection by ketamine: a review of the experimental and clinical evidence. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2010; 24:131-42.
71. Iannello S, Belfiore F. Hypomagnesemia. A review of pathophysiological, clinical and therapeutical aspects. *Panminerva Med.* 2001;43(3):177-209.
72. Ikeda T, Kazama T, Sessler DI, Toriyama S, Niwa K, Shimada C, Sato S. Induction of anesthesia with ketamine reduces the magnitude of redistribution hypothermia. *Anesth Analg* 2001; 93: 934-8.

73. Irifune M, Shimizu T, Nomoto M, Fukuda T. Ketamine-induced anesthesia involves the N-methyl-d-aspartate receptor-channel complex in mice. *Brain Res.* 1992; 596:1–9.
74. Ishiwata T, Saito T, Hasegawa H, Yazawa T, Kotani Y, Otokawa M, Aihara Y. Changes of body temperature and thermoregulatory responses of freely moving rats during GABAergic pharmacological stimulation to the preoptic area and anterior hypothalamus in several ambient temperatures. *Brain Res* 2005;1048(1-2):32-40.
75. Ishizaki K, Sasaki M, Karasawa S, Obata H, Nara T, Goto F. The effect of intrathecal magnesium sulphate on nociception in rat acute pain models. *Anaesthesia* 1999;54(3):241-6.
76. Ivanovi MD, Mi ovi IV, Vu kovi S, Prostran M, Todorovi Z, Kricojevi VD, Djordjevi JB, Došen-Mi ovi Lj. The synthesis and preliminary pharmacological evaluation of the racemic cis and trans 3-alkylfentanyl analogues. *J. Serb. Chem. Soc* 2004; 69:511–26.
77. Jackson DL, Hargreaves KM. Activation of excitatory amino acid receptors in bovine dental pulp evokes the release of iCGRP. *J Dent Res* 1999; 78:54-60.
78. Javery KB, Ussery TW, Steger HG, Colclough GW. Comparison of morphine and morphine with ketamine for postoperative analgesia. *Can J Anaesth* 1996; 43(3):212-5.
79. Jelenkovi A, Veskov R, Jovanovi M, Rai evi R, Bokonji D, Vesna Vasilev V, Boškovi B. Bol i ekscitatorne amino kiseline. *Vojnosanitetski pregled* 2002;59(1):49-58.
80. Jellish WS, Zhang X, Langen KE, Spector MS, Scalfani MT. Intrathecal magnesium sulphate administration at the time of experimental ischemia improves neurological functioning by reducing acute and delayed loss of motor neurons in the spinal cord. *Anesthesiology* 2008; 108:78-86.
81. Kao CH, Kao TY, Huang WT, Lin MT. Lipopolysaccharide- and glutamate-induced hypothalamic hydroxyl radical elevation and fever can be suppressed by N-methyl-D-aspartate-receptor antagonists. *J Pharmacol Sci* 2007; 104:130-6.



82. Kawamata T, Omote K. Activation of spinal N-methyl-D-aspartate receptors stimulates a nitric oxide/cyclic guanosine 3,5-monophosphate/glutamate release cascade in nociceptive signaling. *Anesthesiology* 1999; 91(5):1415-24.
83. Kawano T, Tanaka K, Yinhu, Eguchi S, Kawano H, Takahashi A, Nakaya Y, Oshita S. Effects of ketamine on nicorandil induced ATP-sensitive potassium channel activity in cell line derived from rat aortic smooth muscle. *J Med Invest.* 2010; 57(3-4):237-44.
84. Kissin I, Kerr R, Smith LR. Assessment of anaesthetic action of morphine and fentanyl in rats. *Can. Anaesth. Soc. J.* 1983; 30:623-628.
85. Kizilirmak S, Karaka SE, Akça O, Ozkan T, Yavru A, Pembeci K, Sessler DI, Telci L. Magnesium sulphate stops postanesthetic shivering. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 813:799-806.
86. Komiskey HL, Rudy TA. The involvement of methysergide-sensitive receptors and prostaglandins in the hyperthermia evoked by 5-HT in the cat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1975;11(2):195-208.
87. Komulainen A, Olson ME. Antagonism of ketamine-xylazine anesthesia in rats by administration of yohimbine, tolazoline, or 4-aminopyridine. *Am J Vet Res* 1991; 52(4):585-8.
88. Kress HG. Abteilung für Allgemeine Anaesthesie und Intensivmedizin (B) der Universität Wien. *Der Anaesthesist* 1997; 46:8-19.
89. Lai CC, Kuo TI, Lin HH. The role of protein kinase A in acute ethanol-induced neurobehavioral actions in rats. *Anesthesia & Analgesia* 2007; 105:89-96.
90. Langer SZ. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol.* 1974; 23(13):1793-800.
91. Laulin JP, Maurette P, Corcuff JB, Rivat C, Chauvin M, Simonnet G. The role of ketamine in preventing fentanyl-induced hyperalgesia and subsequent acute morphine tolerance. *Anesthesia & Analgesia* 2002; 94:1263-9.

92. Le Grevès, P, Huang W, Zhou Q, Thörnwall M, Nyberg F. Acute effects of morphine on the expression of mRNAs for NMDA receptor subunits in the rat hippocampus, hypothalamus and spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1998; 341:161-4.
93. Lee KS1, Han TH, Jo JY, Kang G, Lee SY, Ryu PD, Im JH, Jeon BH, Park JB. Serotonin inhibits GABA synaptic transmission in presympathetic paraventricular nucleus neurons. *Neurosci Lett* 2008; 439(2):138-42.
94. Lehmann KA. Opioids: overview on action, interaction and toxicity. *Support Care Cancer* 1997; 5:439-44.
95. Li JX, Koek W, France CP. Food restriction and streptozotocin differentially modify sensitivity to the hypothermic effects of direct- and indirect-acting serotonin receptor agonists in rats. *Eur J Pharmacol* 2009; 613:60–63.
96. Lin JH and Lin MT. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase pathway in organum vasculosum laminae terminalis: possible role in pyrogenic fever in rabbits. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 179-185.
97. Lin MT, Wu JJ, Tsay BL. Serotonergic mechanisms in the hypothalamus mediate thermoregulatory responses in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1983; 322(4):271-8.
98. Lin MT. Effects of sodium pentobarbital on thermoregulatory responses in the rat. *Neuropharmacology*. 1981; 20(7):693-8.
99. Liu HT, Hollmann MW, Liu WH, Hoenemann CW, Durieux ME. Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium: Part I. *Anesth Analg* 2001; 92:1173-81.
100. Lizarraga I, Chambers JP, Johnson CB. Synergistic depression of NMDA receptor-mediated transmission by ketamine, ketoprofen and L-NAME combinations in neonatal rat spinal cords in vitro. *Br J Pharmacol*. 2008;153(5):1030-42.
101. Lysakowski C, Dumont L, Czarnetzki C, Tramèr MR. Magnesium as an adjuvant to postoperative analgesia: a systematic review of randomized trials. *Anesth Analg* 2007; 104:1532-9.

102. MacDonald fF, Bartlett MC, Mody I, Pahapill P, Reynolds JN, Salter MW, Schneiderman JH, Pennefather PS. Action of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* 1991; 432: 483-508.
103. Mahmood MA, Zweifler RM. Progress in shivering control. *J Neurol Sci* 2007; 261:47-54.
104. Malone DT, Taylor DA. Involvement of somatodendritic 5-HT(1A) receptors in Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced hypothermia in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;69: 595–601.
105. Mao J. NMDA and opioid receptors: their interaction in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Research Reviews* 1999; 30: 289–304.
106. Martín-Cora FJ, Fornal CA, Metzler CW, Jacobs BL. Single unit responses of serotonergic medullary and pontine raphe neurons to environmental cooling in freely moving cats *Neuroscience*. 2000; 98(2):301-9.
107. Maurset A, Skoglund LA, Hustveit O, Oye I. Comparison of ketamine and pethidine in experimental and postoperative pain. *Pain* 1989; 36(1):37-41.
108. McCartney CJ, Sinha A, Katz J. A qualitative systematic review of the role of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in preventive analgesia. *Anesthesia & Analgesia* 2004; 98: 1385-400.
109. Melamed R, Bar-Yosef S, Shakhar G, Shakhar K, Ben-Eliyahu S. Suppression of natural killer cell activity and promotion of tumor metastasis by ketamine, thiopental, andhalothane, but not by propofol: mediating mechanisms and prophylactic measures. *Anesth Analg* 2003; 97(5):1331-9.
110. Mercadante S, Lodi F, Sapio M, Calligara M, Serretta R. Long-term ketamine subcutaneous continuous infusion in neuropathic cancer pain. *J Pain Symptom Manage* 1995; 10:564-8.
111. Merskey H, Bugduk N. Classification of chronic pain. Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. 2<sup>nd</sup> ed. Seattle, WA: IASP Press; 1994.

112. Miaskowski C, Cleary J, Burney R, Coyne P, Finley R, Foster R, et al., Guidelines for the management of cancer pain in adults and children ( Clinical Practice Guidelines Series, No. 3). Glenville IL: American Pain Society, 2005.
113. Michaelis E. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progr Neurobiol* 1998; 54: 415-569.
114. Mi ovi IV., Ivanovi MD, Vu kovi S, Jovanovi -Mi i D, Beleslin D, Došen-Mi ovi Lj, Kiricojevi VD. 3-Carbomethoxy fentanyl: Synthesis, pharmacology and conformational analysis. *Heterocycl. Commun.* 1998; 4:171-9.
115. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-42.
116. Monique D, Patris-Garcia, DVM, Anna Johnson, Suzanne Millman, Kenneth Strakler, Locke Karrier. Effects of yohimbine, an alpha 2-antagonistic reversal agent on physiological recovery parameters of anesthetized sows. *Journal of Swine Health AND production* 2014; 22(1):16-23.
117. Morishima Y, Shibano T. Evidence that 5-HT<sub>2A</sub> receptors are not involved in 5-HT-mediated thermoregulation in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52(4):755-8.
118. Morrison SF. Central pathway controlling brown adipose tissue. *New Physiol Sci* 2004; 19:67-74.
119. Morrison SF. Activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in raphe pallidus inhibits leptin-evoked increases in brown adipose tissue thermogenesis *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286(5):832-7.
120. Murck H. Ketamine, magnesium and major depression-from pharmacology to pathophysiology and back. *J Psychiatr Res* 2013; 47:955-65.
121. Murck H. Magnesium and affective disorders. *Nutr Neurosci.* 2002; 5(6):375-89.
122. Na HS, Ryu JH, Do SH. The role of magnesium in pain. In: Vink R and Nechifor M (eds). *Magnesium in the central nervous system.* University of Adelaide Press, Adelaide, South Australia, 2011; pp 157-165.

123. Nakasuji M, Nakamura M, Imanaka N, Tanaka M, Nomura M. An intraoperative small dose of ketamine prevents remifentanil-induced postanesthetic shivering. *Anesth Analg* 2011; 113:484-7.
124. Narita M, Suzuki T, Misawa M, Nagase H. Role of central ATP-sensitive potassium channels in the hyperthermic effect of morphine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1992; 109(1-2):239-40.
125. Nason MW Jr, Mason P. Medullary raphe neurons facilitate brown adipose tissue activation. *J Neurosci*. 2006; 26(4):1190-8.
126. Nechifor, M. Magnesium involvement in pain. *Magnesium Research* 2011; 24:220-2.
127. Nemmani KV, Grisel JE, Stowe JR, Smith-Carliss R, Mogil JS. Modulation of morphine analgesia by site-specific N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: dependence on sex, site of antagonism, morphine dose, and time. *Pain* 2004; 109:274-83.
128. Nisijima K, Kuboshima K, Shioda K, Yoshino T, Iwamura T, Kato S. Memantine attenuates 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced hyperthermia in rats. *Neurosci Lett* 2012; 531:198-203.
129. Nozaki C, Le Bourdonnec B, Reiss D, Windh RT, Little PJ, Dolle RE, Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C.  $\mu$ -Opioid Mechanisms for ADL5747 and ADL5859 Effects in Mice: Analgesia, Locomotion, and Receptor Internalization. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 2012; 342: 799-807.
130. O'Flaherty JE, Lin CX. Does ketamine or magnesium affect posttonsillectomy pain in children? *Paediatr Anaesth* 2003; 13:413-21.
131. Ogden KK, Traynelis SF. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32:726-33.
132. Orser B, Smith D, Henderson S, Gelb A. Magnesium deficiency increases ketamine sensitivity in rats. *Canadian Journal of Anesthesia* 1997b; 44:883-90.
133. Orser BA, Pennefather PS, MacDonald JF. Multiple mechanisms of ketamine blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. *Anesthesiology* 1997a; 86:903-917.

134. Øye I, Paulsen O, Maurset A. Effects of ketamine on sensory perception: Evidence for a role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1992; 260:1209–13.
135. Øye I. Ketamine analgesia, NMDA receptors and the gates perception. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 1998; 42:747-9.
136. Pacheco Dda F, Romero TR, Duarte ID. Central antinociception induced by ketamine is mediated by endogenous opioids and  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors. *Brain Res.* 2014; 1562:69-75.
137. Papeschi R, Sourkes TL, Youdim MB. The effect of yohimbine on brain serotonin metabolism, motor behavior and body temperature of the rat. *European Journal of Pharmacology* 1971;15(3):318-26.
138. Park SM, Mangat HS, Berger K, Rosengart AJ. Efficacy spectrum of antishivering medications: meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care Med.* 2012; 40:3070-82.
139. Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, Geocadin RG, Zimmerman JL, Donnino M, Gabrielli A, Silvers SM, Zaritsky AL, Merchant R, Vanden Hoek TL, Kronick SL. Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation.* 2010; 122:768-86.
140. Pekoe GM, Smith DJ. The involvement of opiate and monoaminergic neuronal systems in the analgesic effects of ketamine. *Pain.* 1982 Jan;12(1):57-73.
141. Persson J. Wherefore ketamine? *Current Opinion in Anaesthesiology* 2010; 23:455–60.
142. Petrovi V, Buzadzi B, Kora A, Vasiljevi A, Jankovi A, Kora B. NO modulates the molecular basis of rat interscapular brown adipose tissue thermogenesis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2010; 152(2):147-59.
143. Piepponen TP, Kivastik T, Katajamäki J, Zharkovsky A, Ahtee L. Involvement of opioid  $\mu$  1 receptors in morphine-induced conditioned place preference in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 58(1):275-9.

144. Pitsikas N, Boultadakis A. Pre-training administration of anesthetic ketamine differentially affects rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuropharmacology*. 2009; 57: 1-7.
145. Polderman KH. Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence. *Intensive Care Med*. 2004; 30:556-75.
146. Polderman KH. Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet*. 2008; 371:1955-69.
147. Pradhan AA, Smith ML, Kieffer BL, Evans CJ. Ligand-Directed Signaling Within the Opioid Receptor Family. *Br J Pharmacol* 2012; 167:960-9.
148. Przegaliński E, Filip M, Chojnacka-Wójcik E, Tatarczyńska E. The role of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> (5-HT<sub>1A</sub>) receptors in the anticonflict activity of beta-adrenoceptor antagonists. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994; 47(4):873-8.
149. Queiroz-Castro P, Egger C, Redua MA, Rohrbach BW, Cox S, Doherty T. Effects of ketamine and magnesium on the minimum alveolar concentration of isoflurane in goats. *Am J Vet Res* 2006; 67:1962-6.
150. Quibell R, Prommer EE, Mihalyo M, Twycross R, Wilcock A. Ketamine\*. *J Pain Symptom Manage* 2011;41:640-9.
151. Rawls SM, Adler MW, Gaughan JP, Baron A, Geller EB, Cowan A. NMDA receptors modulate morphine-induced hyperthermia. *Brain Res* 2003; 984:76-83.
152. Rawls SM, Benamar K. Effects of opioids, cannabinoids, and vanilloids on body temperature. *Front. Biosci. (Schol Ed)*. 2011; 3:822-45.
153. Rawls SM, Cowan A, Tallarida RJ, Geller EB, Adler MW. N-methyl-D-aspartate antagonists and WIN 55212-2[4,5-dihydro-2-methyl-4(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenyl-carbonyl)-6H-pyrrolo[3,2,1-i,j]quinolin-6-one], a cannabinoid agonist, interact to produce synergistic hypothermia. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303:395-402.

154. Rawls SM, Tallarida R, Robinson W, Amin M. The beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, attenuates morphine-evoked hyperthermia in rats. *Br J Pharmacol* 2007; 15:1095-102.
155. Rivero G, Llorente J, McPherson J, Cooke A, Mundell SJ, McArdle CA, Rosethorne EM, Charlton SJ, Krasel C, Bailey CP, Henderson G, Kelly E. Endomorphin-2: A Biased Agonist at the  $\mu$ -Opioid Receptor. *Mol. Pharmacol* 2012; 82:178-88.
156. Rives ML, Rossillo M, Liu-Chen LY, Javitch J.A. 6'-Guanidinonaltrindole (6'-GNTI) Is a G Protein-biased  $\mu$ -Opioid Receptor Agonist That Inhibits Arrestin Recruitment. *J. Biol. Chem.* 2012; 287:27050-4.
157. Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Vicente-Sánchez A, Berrocoso E, Garzón J. The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37:338-49.
158. Romero TR, Galdino GS, Silva GC, Resende LC, Perez AC, Côrtes SF, Duarte ID. Ketamine activates the L-arginine/Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Anesth Analg.* 2011; 113(5):1254-9.
159. Rondón LJ, Privat AM, Daulhac L, Davin N, Mazur A, Fialip J, Eschalier A, Courteix C. Magnesium attenuates chronic hypersensitivity and spinal cord NMDA receptor phosphorylation in a rat model of diabetic neuropathic pain. *The Journal of Physiology* 2010; 588: 4205-15.
160. Salmi P, Ahlenius S. Evidence for functional interactions between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rat thermoregulatory mechanisms. *Pharmacol Toxicol.* 1998; 82(3):122-7.
161. Salmi P, Kela J, Arvidsson U, Wahlestedt C. Functional interactions between delta- and mu-opioid receptors in rat thermoregulation. *Eur J Pharmacol.* 2003; 458(1-2):101-6.
162. Savi Vujovi KR, Vu kovi S, Srebro D, Ivanovi M, Došen-Mi ovi Lj, Vu eti C, Džolji E, Prostran M. A comparison of the antinociceptive and temperature



- responses to morphine and fentanyl derivatives in rats. *Arch Pharm Res* 2013; 36:501-8.
163. Schumacher MA, Basbaum AI, Way WL. Opioid analgesics & antagonists. In: Katzung BG, editor. *Basic & Clinical Pharmacology*, Ninth edition. New York: Lange Medical Books/McGraw Hill Medical Publishing Division; 2005. p. 497-516.
164. Sen AP, Gulati A. Use of magnesium in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 2010; 7:91-9.
165. Sessler DI. Temperature monitoring and perioperative thermoregulation. *Anesthesiology* 2008; 109:318-38.
166. Siwek M, Wróbel A, Dudek D, Nowak G, Zieba A. The role of copper and magnesium in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *Psychiatr Pol* 2005; 39(5):911-20.
167. Soave PM, Conti G, Costa R, Arcangeli A. Magnesium and anaesthesia. *Current Drug Targets* 2009; 10:734-43.
168. Song W, Wu YM, Ji Z, Ji YB, Wang SN, Pan SY. Intra-carotid cold magnesium sulphate infusion induces selective cerebral hypothermia and neuroprotection in rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Neurol Sci* 2013; 34:479-86.
169. Sontakke SD, Umapathy G, Shivaji S. Yohimbine antagonizes the anaesthetic effects of ketamine-xylazine in captive Indian wild felids. *Vet Anaesth Analg* 2009; 36(1):34-41.
170. Stannard CF, Porter GE. Ketamine hydrochloride in the treatment of phantom limb pain. *Pain* 1993; 54: 227-30.
171. Stannard C, Booth S. *Pain*. 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2004
172. Steiner AA, Antunes-Rodrigues J, McCann SM, Branco LG. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282(2):584-93.

173. Stessel B, Ovink JK, Theunissen HM, Kessels AG, Marcus MA, Gramke H. Is s-ketamine with or without magnesium sulphate an alternative for postoperative pain treatment? Randomised study. *Eur J Anaesthesiol* 2013; 30:91-3.
174. Suzuki M, Tsueda K, Lansing PS, Tolan MM, Fuhrman TM, Ignacio CI, et al. Small-dose ketamine enhances morphine-induced analgesia after outpatient surgery. *Anesth Analg* 1999; 89:98-103.
175. Tallarida RJ, Cowan A, Raffa RB. Antinociceptive synergy, additivity, and subadditivity with combinations of oral glucosamine plus nonopioid analgesics in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 699-704.
176. Tallarida RJ, Murray RB. *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*. 2nd ed. Springer Verlag, New York 1986.
177. Tallarida RJ. Interactions between drugs and occupied receptors. *Pharmacol Ther* 2007; 113:197-209.
178. Tomi MA, Vu kovi SM, Stepanovi -Petrovi RM, Ugresi ND, Prostran MS, Boskovi B. Synergistic interactions between paracetamol and oxcarbazepine in somatic and visceral pain models in rodents. *Anesth. Analg* 2010; 110:1198-205.
179. Ulugol A, Dost T, Dokmeci D, Akpolat M, Karadag CH, Dokmeci I: Involvement of NMDA receptors and nitric oxide in the thermoregulatory effect of morphine in mice. *J Neural Transm* 2000; 107:515–21
180. Van Bogaert M, Oosting R, Toth M, Groenink L, van Oorschot R, Olivier B. Effects of genetic background and null mutation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors on basal and stress-induced body temperature: modulation by serotonergic and GABA<sub>A</sub>-ergic drugs. *Eur J Pharmacol*. 2006; 550(1-3):84-90.
181. van der Worp HB, Sena ES, Donnan GA, Howells DW, Macleod MR. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain* 2007; 130: 3063-74.
182. Vastani N, Seifert B, Spahn DR, Maurer K. Sensitivities of rat primary sensory afferent nerves to magnesium: implications for differential nerve blocks. *Eur J Anaesthesiol* 2013; 30(1):21-8.

183. Vinkers CH, van Oorschot R, Korte SM, Olivier B, Groenink L. 5-HT1A receptor blockade reverses GABA(A) receptor alpha3 subunit-mediated anxiolytic effects on stress-induced hyperthermia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010; 211(2):123-30.
184. Voronova IP, Naumenko VS, Khramova GM, Kozyreva TV, Popova NK Central 5-HT3 receptor-induced hypothermia is associated with reduced metabolic rate and increased heat loss. *Neurosci Lett* 2011; 504(3):209-14.
185. Vu kovi S, Ivanovi M, Prostran M, Todorovi Z, Ristovi Z, Micovi I, Beleslin D. Higher environmental temperature potentiates cataleptic effect of fentanyl in rats. *Jpn. J. Pharmacol* 1998; 78:523-7.
186. Vu kovi S, Prostran M, Ivanovi M, Došen-Mi ovi Lj, Todorovi Z, Neši Z, Stojanovi R, Divac N, Mikovi Ž. Fentanyl analogs: structure-activity-relationship study. *Curr. Med. Chem* 2009; 16:2468-74.
187. Vu kovi S, Savi Vujovi K, Srebro D, Medi B, Vu eti , Prostran M, Prostran M. Synergistic interaction between ketamine and magnesium in lowering body temperature in rats. *Physiology and Behaviour* 2014; 127:45-53.
188. Vu kovi S. Farmakoterapija bola. U: Prostran M.urednik. *Klini ka farmakologija*. Beograd: Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu, 2012; 103-124.
189. Wadhwa A, Sengupta P, Durrani J, Akça O, Lenhardt R. Magnesium sulphate only slightly reduces the shivering threshold in humans. *Br J Anaesth* 2005; 94:756–62.
190. Wallace K. The patophysiology of pain. *Crit Care Nurs Q* 1992; 15:1-13.
191. Warren S, Yeziarski RP, Capra NE. The Somatosenzorz System II: Touch, Thermal Sense, and Pain. In: Haines DE, editor. *Fundamental Neuroscience*, Second edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002; 273-302.
192. Wei H, Petrovaara A. MK-801, an NMDA receptor antagonist, in the rostroventromedial medulla attenuates development of neuropathic symptoms in the rat. *Neroreport* 1999; 10: 2933-7.
193. Willis WD. *The Pain System: The Neural Basis of Nociceptive Transmission in the Mammalian*. Basel: S Karger, 1985

194. Wilson JR, Howard BA. Effects of cold acclimation and central opioid processes on thermoregulation in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 54(2):317-25.
195. Winter JC, Rabin RA. Yohimbine as a serotonergic agent: evidence from receptor binding and drug discrimination. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263:682–689.
196. Yamanaka R, Shindo Y, Hotta K, Suzuki K, Oka K. NO/cGMP/PKG signaling pathway induces magnesium release mediated by mitoKATP channel opening in rat hippocampal neurons. *FEBS Lett.* 2013; 587(16):2643-8.
197. Yang PK, Weinger MB, Negus SS. Elucidation of dose-effect relationships for different opiate effects using alfentanil in the spontaneously ventilating rat. *Anesthesiology* 1992; 77:153-61.
198. Yousef AA, Al-Deeb AE. A double-blinded randomised controlled study of the value of sequential intravenous and oral magnesium therapy in patients with chronic low back pain with a neuropathic component. *Anaesthesia* 2013; 68:260-6.
199. Zarrindast MR, Karami M, Sepehri H, Sahraei H. Influence of nitric oxide on morphine-induced conditioned place preference in the rat central amygdala. *Eur J Pharmacol* 2002;453(1):81-9.
200. Zweifler RM, Voorhees ME, Mahmood MA, Parnell M. Magnesium sulfate increases the rate of hypothermia via surface cooling and improves comfort. *Stroke.* 2004; 35:2331-4.

## SPISAK SKRA ENICA

IASP - Internacionalno udruženje za ispitivanje bola

$\mu$  receptor - mi receptor

$\delta$  - delta

$\kappa$  - kapa

IL-1 beta-interleukin 1 beta

NMDA - N-metil-D-aspartat

AMPA - alfa-amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazol

KAI - kainatna kiselina

PCP - fenciklidin

MK801 - dizocilpin

CNQX - 6-ciano-7-nitrokvinoxalin-2,3-dion

APV - (2R)-amino-5-fosfonovaleri na kiselina; (2R)-amino-5-fosfonopentanoat

GABA - gama aminobuterna kiselina

EAK - ekscitatorna amino kiselina

receptor - alfa receptor

5-HT - 5 hidroksitriptamin

BAT - mrko masno tkivo

PO/AH - preoptički/anteriorni hipotalamus

NO - azotni oksid

NOS - sintaza azotnog oksida

L-NAME - L-arginin metil ester hidrohlorid

ATN - akutna termička nocicepcija

ATP - adenzin trifosfat

Ip - intraperitonealno

Sc - subkutano

## Biografija

Katarina Savić Vučković rođena je 12.09.1979. godine u Kruševcu. Medicinski fakultet u Beogradu završila je 2004. godine sa prosečnom ocenom 9,37. Specijalističke akademske studije iz Eksperimentalne fiziologije i patološke fiziologije završila je 2009. godine, odbranivši temu „Poremećaj mehanizama citoprotekcije u ulcerogenezi“. Specijalizaciju iz Kliničke farmakologije završila je sa odličnim uspehom 2013. godine. Radi na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu u zvanju asistenta. Na ovom Institutu zaposlena je od 2009. godine. Uža oblast njenog rada je farmakologija CNS-a, kao i farmakologija bola. Dobitnik je brojnih nagrada i stipendija u inostranstvu. Autor je i ko-autor u više poglavlja udžbenika, knjiga, monografija, šezdeset stručnih radova i publikacija, od kojih je deset radova *in extenso* u časopisima indeksiranim u *CC/SCI* bazi.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Katarina Savić Vujović

broj upisa FN-02/09

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Efekti opioida i antagonista NMDA receptora na telesnu temperaturu i akutni  
nociceptivni bol kod pacova

---

---

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 29.11.2014.

Katarina Savić Vujović

Katarina Savić Vujović



Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Katarina Savić Vujović

Broj upisa FN-02/09

Studijski program Fiziološke nauke

Naslov rada \_ Efekti opioida i antagonista NMDA receptora na telesnu temperaturu i akutni nociceptivni bol kod pacova

Mentor Prof. dr Sonja Vučković

Potpisani \_Katarina Savić Vujović\_\_\_\_\_

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 29.11.2014.

Katarina Savić Vujović

Katarina Savić Vujović

**Prilog 3.**

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Efekti opioida i antagonista NMDA receptora na telesnu temperaturu i akutni nociceptivni bol kod pacova

---

---

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 29.11.2014.

**Potpis doktoranda**

*Katarina Savić Vujović*  
Katarina Savić Vujović

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.