

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата маг. фарм. Бранке Дивовић Матовић.

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, одржаној 08.09.2022. године, Одлуком број 2122/2 именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата маг. фарм. Бранке Дивовић Матовић, под насловом:

„Фармаколошка карактеризација утицаја деутерације изабраних пиразолохинолинона као модулатора ГАБА_A рецептора”

Комисија у саставу:

1. Др Владимир Добричић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет, председник Комисије
2. Др Бојан Батинић, доцент, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
3. Др Александар Трбовић, редовни професор, Универзитет у Београду – Медицински факултет

прегледала је приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација маг. фарм. Бранке Дивовић Матовић, под називом „Фармаколошка карактеризација утицаја деутерације изабраних пиразолохинолинона као модулатора ГАБА_A рецептора”, написана је на 120 страна са једноструким проредом и организована у следећих 7 целина: Увод (26 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (21 страна), Резултати (30 страна), Дискусија (13 страна), Закључак (2 стране) и Литература (13 страна). На почетку, докторска дисертација садржи сажетак на српском и енглеском језику и садржај поглавља/потпоглавља, а на крају кратку биографију кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству,

истоветности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације. Дисертација је написана јасним и прегледним стилем и садржи 41 слику и 13 табела. Преглед литературе садржи 147 навода.

Увод садржи преглед информација из литературних извора који су од значаја за теоријску основу истраживања која су спроведена у оквиру докторске дисертације. У првом делу описана је структура ГАБА_A рецептора (ГАБА_AР) и локализација везивних места на рецептору. Након тога описана је фармакологија (механизам дејства и фармаколошки ефекти) бензодиазепина као клинички најзначајнијих модулатора ГАБА_AР. Затим су детаљно описани ГАБА_AР који у рецепторском агрегату садрже $\alpha 6$ подјединицу, као и пиразолохинолинонско (ПХ) везивно место на ГАБА_AР које последњих година постаје место од интереса у истраживањима. Наведени су познати литературни подаци о селективности и ефикасности ПХ лигананда који делују као позитивни алостерни модулатори посредством ПХ места на ГАБА_AР који садрже $\alpha 6$ подјединицу у комбинацији са $\gamma 2$, односно, δ подјединицом. Објашњене су структурне карактеристике полазних једињења (PZ-II-029 и LAU463), затим њихових деутерисаних, нитрогенованих и флуорираних аналога (DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3, DK-I-86-1, DK-I-58-1, DK-II-58-1, DK-IV-15-1, DK-I-87-1, DK-I-59-1, DK-IV-19-1, DK-IV-20-1, DK-IV-22-1 и MM-I-10). Тестирани лиганди се могу везати на ГАБА_AР за различита везна места: ДС (диазепам сензитивна) и ДИ (диазепам инсензитивна) бензодиазепинска места, где делују као неутрални модулатори, као и за ПХ место. У зависности од електрофизиолошког исхода везивања лигананда дате структурне групе за одговарајуће ПХ место на различитим субпопулацијама ГАБА_AР, интеракција се може означити као функционално неутрална или активна. Конкретно, код ГАБА_AР у чији састав рецепторског комплекса улази $\gamma 2$ подјединица, ниједан од лигананда не активира рецепторе који садрже $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ или $\alpha 5$ подјединицу, док представници PZ-II-029 и LAU463 серије једињења активирају оне рецепторе који садрже $\alpha 6$ подјединицу. Међутим, на рецепторима који садрже δ и $\alpha 6$ подјединицу, за које се сви тестирани лиганди везују преко ПХ места, само PZ-II-029 и његови аналози, са изузетком DK-I-86-1, могу да делују као позитивни алостерни модулатори. На основу изложеног, лиганди се могу поделити у три субхемотипа (структурне групе): PZ-II-029 и његови аналози (DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3 и DK-I-86-1, уз напомену да последњи лиганд у низу према електрофизиологији припада групи LAU463 и аналога); LAU463 и аналози (DK-I-58-1 и DK-II-58-1), док трећем субхемотипу припада DK-I-87-1. Флуорирани аналози (DK-IV-19-1, DK-IV-20-1, DK-IV-22-1 и MM-I-10) нису сврстани у субхемотипове, јер их одликује неселективност у афинитету и ефикасности у контексту ГАБА_AР који садрже $\gamma 2$ подјединицу.

У другом делу Увода објашњена је функционална организација церебеларних кола и улога $\alpha 6$ ГАБА_AР, као и улога малог мозга у функцији централног нервног система. Затим, описани су неурални механизми краниофацијалних болова, тригеминална неуропатија и тренутне смернице за њено лечење. На крају уводног дела објашњени су појмови од значаја за разумевање одређених делова дисертације: деутерација у фармацеутској хемији, формулација ПХ лигананда као слабо растворних једињења, као и фазе у развојном путу новог лека.

Циљеви рада били су фармакокинетичка карактеризација (одређивање фармакокинетичких профила у крви, мозгу, јетри и бубрезима, као и слободних фракција

у крви и мозгу) изабраних ПХ лиганада и њихових деутерисаних аналога уз варирање: пута примене (интрапериотонеално (и.п.), перорално (п.о.) и интравенски (и.в.)), формулације (раствор, суспензија, наноемулзија), врсте и соја животиња (пацови *Wistar* и *Sprague-Dawley* соја, *C57BL* мишеви), у циљу утврђивања утицаја деутерације, флуоровања и нитрогеновања, као и других хемијских модификација у полазној структури (енг. *parent*), на унапређење фармакокинетичких параметара, заједничких фармакокинетичких особина, као и неочекиваних образаца кинетичког понашања. Други циљ била је фармакодинамска карактеризација изабраних ПХ лиганада и њихових деутерисаних, флуорованих и нитрогенованих аналога кроз бихејвиоралне тестове у циљу процене утицаја супстанци на домене расположења, когниције и моторне координације, уз процену разлика у фармаколошким ефектима полазних једињења и деутерисаних/флуорованих/нитрогенованих ПХ представника. Трећи циљ била је процена агонистичко-антагонистичког дејства изабраних ПХ лиганада на нивоу ГАБА_AР кроз међусобну интеракцију са бензодиазепинима, као и процена утицаја 9 ПХ лиганада из три структурне групе (PZ-II-029 и сродни деутерисани аналози DK-I-56-1, RV-I-029, DK-I-60-3 и DK-I-86-1; LAU463 и сродни деутерисани аналози DK-I-58-1 и DK-II-58-1; и DK-I-87-1) у бихејвиоралним тестовима у којима бензодиазепини испољавају изражене психомоторне или антиконвулзивне ефекте, као што су спонтана локомоторна активност, ротарод и губитак рефлекса усправљања, односно пентилентетразолски тест. Крајњи, четврти циљ било је испитивање профилактоичког антиноцицептивног ефекта DK-I-56-1 у анималном моделу тригеминалног неуропатског бола након хроничне констрикционе повреде инфраорбиталног живца посредством селективне модулације α 6 ГАБА_AР смештених на неуронима тригеминалног ганглиона.

Циљеви рада су били добро дефинисани.

Поглавље **Материјал и методе** наводи детаљан опис коришћене методологије и организовано је у 7 потпоглавља: Огледне животиње, Испитиване супстанце, Протоколи *in vitro* експеримената, *LC-MS/MS* аналитичка метода, Протоколи бихејвиоралних експеримената, Протокол испитивања профилактоичког антиноцицептивног ефекта DK-I-56-1 у моделу тригеминалне неуропатије на пацовима и Статистичка анализа података. У оквиру потпоглавља Протоколи *in vitro* експеримената детаљно је описана методологија одређивања фармакокинетичких профила и параметара изабраних лиганада у циљним ткивима огледних животиња, као и методологија одређивања слободне фракције изабраних лиганада у плазми и можданом ткиву. Потпоглавље Протоколи бихејвиоралних експеримената даје детаљан опис следећих тестова: спонтана локомоторна активност, ротарод, губитак рефлекса усправљања, пентилентетразолски тест, уздигнути плус лавиринт, тест јачине стиска и Морисов водени лавиринт (последња три теста урађена су као батерија бихејвиоралних тестова). У оквиру потпоглавља Протокол испитивања профилактоичког антиноцицептивног ефекта DK-I-56-1 у моделу тригеминалне неуропатије на пацовима описана је методологија модела унилатералне хроничне констрикционе повреде инфраорбиталног нерва (*eng. chronic constriction injury of infraorbital nerve (IoN-CCI)*), праћење изазваног болног понашања (механичке алодиније) и праћење „умивања” лица животиња.

Током истраживања употребљено је 305 пацова *Wistar* соја, 368 пацова *Sprague Dawley* соја и 242 миша *C57BL* соја. Коришћени су адултни мужјаци оба соја пацова као и мишева. Све експерименталне процедуре спроведене су у оквиру пројекта Министарства

просвете, науке и технолошког развоја под насловом „Бихејвиорални ефекти понављане примене новосинтетисаних супстанци селективних за поједине подтипове GABA_A рецептора: поређење са стандардним психофармаколошким лековима” (2011-2019). Приликом рада са експерименталним животињама примењивани су етички принципи дефинисани Правилником за рад са експерименталним животињама Фармацеутског факултета Универзитета у Београду и ЕУ директивом 2010/63/ЕУ.

У сваком од експеримената наведене су дозе, путеви примене као и формулације одабраних лиганата за дати експеримент. Након фармакокинетичких експеримената, спроведени су бихејвиорални експерименти кроз које је најпре урађена базична карактеризација, а онда испитане интеракције ПХ лиганата са диазепамом у тесту спонтане локомоторне активности, ротароду, тесту губитка рефлекса усправљања и пентилентетразолском тесту. Кроз наведене бихејвиоралне тестове праћен је утицај ПХ лиганата на седативно, атакично, хипнотичко/анестетичко и антиконвулзивно дејство диазепама. Након тога, лиганд ДК-И-56-1 који се издвојио као водеће једињење на основу фармакокинетичке и фармакодинамске карактеризације испитан је додатно у батерији бихејвиоралних тестова (уздигнути плус лавиринт, тест јачине стиска и Морисов водени лавиринт). У батерији тестова испитан је и лиганд ДК-И-87-1 који је на основу електрофизиолошких података погодан да буде негативна контрола у *in vivo* експериментима. У финалном експерименту, испитано је профилактоичко антиноцицептивно дејство лиганата ДК-И-56-1 на анималном моделу тригеминалне неуропатије. Наиме, пацови су били подвргнути подвезивању инфраорбиталног нерва (*IoN-CCI* група), при чему долази до развоја болне преосетљивости. Контролну групу чиниле су животиње код којих је спроведена оперативна процедура, приступљено је живцу, али он није подвезан (*sham* група). Обе групе животиња су даље подељене тако да су третиране или активном супстанцом (ДК-И-56-1), формулисаном у облику биокомпатибилне наноемулзије, или плацебо наноемулзијом (не садржи активну супстанцу). Третман је трајао 14 дана, почев од првог дана након операције. Додатно, праћено је и умивање или тимарење лица животиња као део генералне неге тела, који представља поуздан параметар за потенцијалне неспецифичне ефекте лекова као што су седација и моторна инкапациција (Deseure и Hans, 2015).

У потпоглављу Статистичка анализа података за сваки тест наведено која је статистика коришћена.

Подаци су били анализирани помоћу *Sigma Plot 12 (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA)* софтвера.

Примењена методологија је адекватна за реализацију постављених циљева дисертације.

Резултати истраживања приказани су на прегледан начин, текстуално и графички, коришћењем 41 слике и 13 табела. Груписани су у три веће целине: Резултати *in vitro* експеримената, Резултати бихејвиоралних експеримената и Резултати испитивања профилактоичког антиноцицептивног дејства ДК-И-56-1 на моделу тригеминалне неуропатије код пацова. У оквиру прве целине приказани су резултати фармакокинетичких експеримената и одређивања слободних фракција. У другој целини приказани су резултати бихејвиоралних тестова (тест спонтане локомоторне активности, ротарод, тест губитка рефлекса усправљања, пентилентетразолски тест, уздигнути плус лавиринт, тест јачине стиска и Морисов водени лавиринт). У трећој целини дати су

результати профилактоичког антиноцицептивног дејства ДК-I-56-1 у моделу хроничне констрикционе повреде инфраорбиталног живца.

Дискусија садржи анализу добијених експерименталних резултата на основу које су донети одговарајући закључци истраживања, уз преглед и поређење са резултатима који су доступни у литератури. Поглавље Дискусија написано је у осам целина које прате излагање резултата: Одређивање концентрација одабраних лиганата у циљним ткивима огледних животиња, Тест спонтане локомоторне активности, Ротарод тест, Тест губитка рефлекса усправљања, Пентилентетразолски тест, Батерија бихејвиоралних експерименталних, Профилактоичко антиноцицептивно дејство ДК-I-56-1 у моделу хроничне констрикционе повреде инфраорбиталног живца и Општа дискусија.

Поглавље **Закључак** садржи сажето приказане најважније закључке проистекле из резултата истраживања и њихове анализе, а који су у складу са постављеним циљевима истраживања.

У поглављу **Литература** наведено је 147 референци које су коришћене у докторској дисертацији, цитираних Харвардским стилем.

Б. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

Резултати ове докторске дисертације изложени су кроз девет целина, у складу са постављеним циљевима истраживања.

Фармакокинетички експерименти карактеризације одабраних ПХ лиганата показују да деутерисани аналози задржавају ефикасност на $\alpha\beta\gamma\delta$ ГАБА_AР која је компарабилна са оном коју имају полазна једињења. Међутим, фармакокинетичке особине су значајно унапређене. Деутерацијом се постиже боља циљана испорука у мозак на шта указују вредности партиционих коефицијената (K_p) супстанци ДК-I-56-1, RV-I-029 и ДК-I-60-3 које су веће у односу на K_p полазног једињења (PZ-II-029). Додатно, приближно два пута су веће вредности максималних концентрација (C_{max}) које у мозгу достижу деутерисани аналози (ДК-I-56-1, RV-I-029 и ДК-I-60-3) у поређењу са PZ-II-029. Са друге стране, C_{max} N-хетеро деутерисаног аналога, ДК-I-86-1, мања је него за PZ-II-029.

Одређивање слободних концентрација лека у компартману где остварује дејство има кључни значај. С тим у вези, за два ПХ лиганата, ДК-I-56-1 и ДК-I-60-3, процењене су слободне фракције (у плазми и мозгу) и израчунате слободне концентрације у мозгу. Слободне фракције оба лиганата у плазми биле су изузетно ниске. Међутим, слободне фракције у мозгу су биле веће, тако да су достигнуте значајне концентрације, што значи да су се захваљујући липофилности супстанце неометано дистрибуирале у мозак.

Резултати фармакокинетичке студије где је формулација предсављала фактор варијације показали су да између суспензије, раствора и наноемулзије ДК-I-56-1, примењених интраперитонеално код пацова, постоје дискретне разлике у фармакокинезици инкорпорираних активних супстанци. Може се сматрати да су суспензија и наноемулзија адекватне формулације за апликацију огледним животињама и да обезбеђују прихватљиву циљану испоруку супстанци у мозак.

Већу апсолутну оралну биорасположивост постигла је супстанца ДК-I-56-1 и у плазми и у мозгу у односу на вредности биорасположивости супстанце PZ-II-029. Ови подаци указују да је увођење деутеријума у основну структуру PZ-II-029 резултовало оптимизацијом фармакокинетичког понашања након пероралне примене, чиме се додатно фаворизује примена ДК-I-56-1 у експериментима бихејвиоралне карактеризације и испитивање њених ефеката у анималним моделима болести.

Фармакокинетичка карактеризација LAU463, његова два деутерисана аналога (ДК-I-58-1 и ДК-II-58-1) као и *prodrug* облика (ДК-IV-15-1) опет је доказала да деутерација има за последицу значајно побољшање фармакокинетичких особина деутерисаних једињења.

Тренд уочен у претходним фармакокинетичким експериментима потврђен је и у финалном. Наиме, деутерисани аналози лиганда PZ-II-029 (ДК-I-56-1, RV-I-029 и ДК-I-60-3) и LAU463 (ДК-I-58-1 и ДК-II-58-1) имају знатно повећане вредности K_p , α и C_{max} у свим случајевима, док је експозиција органа за излучивање остала приближно иста у поређењу са основним структурама (PZ-II-029 и LAU463). Док су вредности параметра α за ДК-I-58-1 и ДК-II-58-1 релативно високе, увођење флуора у одговарајуће молекуле имало је за последицу петоструко повећање изложености органа за излучивање, што је допринело значајном смањењу α вредности за ДК-IV-22-1 и ММ-I-10. Може се закључити да увођење флуора утиче на значајно оптерећење органа за излучивање, а о чему говоре укупни нивои флуорованих аналога у јетри и бубрегу (параметри AUC_{0-36} , $t_{1/2}$ и AUC_{0-36} , бубрег).

У тесту спонтане локомоторне активности спроведеном на мужјацима пацова *Sprague-Dawley* соја није утврђен никакав значајан ефекат на укупни пређени пут након пероралне или интраперитонеалне примене одабраних ПХ лиганда, У истом тесту, два лиганда (ДК-I-56-1 као аналог PZ-II-029 и ДК-I-58-1 као аналог LAU463), примењени интраперитонеално, нису антагонизовали хиполокомоторне ефекте диазепама.

У сету експеримената локомоторне активности спроведеним на мужјацима *Wistar* пацова, утврђен је неочекиван, хиперлокомоторни ефекат супстанце ДК-I-56-1, с тим да је у тесту утврђена дозна зависност фармаколошке активности у облику обрнутог латиничног слова У (то значи да најнижа и највиша доза не остварују значајан хиперлокомоторни ефекат).

На мужјацима мишева C57BL соја хиперлокомоторни ефекат утврђен је за PZ-II-029 и ДК-I-56-1 у све три испитиване дозе. У овом случају, није виђен очигледан однос дозе и ефекта супстанце ДК-I-56-1 у облику инверзног латиничног слова У као у претходном експерименту, али тенденција постоји што поткрепљује чињеница да животиње третиране дозом од 10 мг/кг прелазе статистички значајно дужи пут у поређењу са онима које су примиле дозу од 30 мг/кг.

На основу резултата последњег експеримента теста спонтане локомоторне активности уочава се раздвајање структурних група лиганда на основу биолошких ефеката. Наиме, LAU463 и аналози (ДК-I-58-1 и ДК-II-58-1) значајно смањују пређени пут у поређењу са СОЛ (растварач, солвенс) контролном групом. Супротно, PZ-II-029 и аналози (ДК-I-56-1, RV-I-029 и ДК-I-60-3) имају тенденцију остваривања хиперлокомоторног дејства без достизања статистичке значајности. Међутим, у времену мобилности, који представља робуснији параметар од укупног пређеног пута, статистички значајно повећање достигле су и групе животиња третиране са PZ-II-029, ДК-I-56-1 и ДК-I-60-3.

Ниједан од осам ПХ лиганда не доводи до нарушавања моторне вештине код пацова, што се процењује на основу времена одржавања животиње на ротирајућем ваљку (вретену) ротород апарата. Међутим, лиганди који припадају једној структурној групи

(субхемотику) – PZ-II-029 и његови аналози DK-I-56-1, RV-I-029 и DK-I-60-3 успевају да антагонизују диазепамом-индуковано оштећење моторне координације које се манифестује као значајно смањење времена одржавања на ротирајућем ваљку. С друге стране, диазепамом-индуковану моторну инкоординацију не успевају да превенирају (антагонизују) лиганди који припадају другом субхемотику, LAU463 и два аналога DK-I-58-1 и DK-II-58-1, као ни DK-I-86-1 и DK-I-87-1, примењени у истој дози и истим путем као PZ-II-029 и аналози.

Хипнотички/анестетички ефекти диазепама нису били ни спречени нити потенцирани ПХ лигандима. Насупрот томе, хиполокомоторни ефекат диазепама који је праћен након опоравка од губитка рефлекса усправљања у тесту спонтане локомоторне активности био је превениран лигандима PZ-II-029 и DK-I-60-3, за разлику од DK-I-58-1, DK-II-58-1 и DK-I-87-1 који нису успели да антагонизују хиполокомоторни ефекат диазепама.

У пентилентетразолском тесту, примена два одабрана ПХ лиганда (DK-I-56-1 и DK-II-58-1 као представници два субхемотику) у дози од 15 мг/кг није утицала на протективни антиконвулзивни ефекат диазепама, нити је обезбедила било какву заштиту од конвулзивних напада изазваних пентилентетразолом.

Резултати у уздигнутом плус лавиринту, тесту јачине стиска и Морисовом воденом лавиринту били су слични претходном налазу у ротароду. Наиме, лиганди који остварују потенцијацију ГАБА_AР који садрже $\alpha 6$ подјединицу не изазивају фармаколошке ефекте карактеристичне за класичне бензодиазепине (седација, моторна инкоординација, миорелаксација, анксиолитичко дејство).

У анималном моделу хроничне констрикционе повреде инфраорбиталног живца тестиран је DK-I-56-1, једињење одабрано као водеће на основу претходно спроведених фармакокинетичких и фармакодинамских експеримената. Статистички значајне разлике које су добијене на нивоу *IoN-CCI* групе, између животиња интраперитонеално третираних са DK-I-56-1, односно плацебом, 14. и 21. постоперативног дана указују на способност ПХ лиганда да сузбије развој неуропатског бола који је повезан са повредом гране тригеминалног нерва, током примене терапије и седам дана након прекида терапије. Међутим, 14 дана након примене терапије (28. постоперативни дан), антиноцицептивни ефекат DK-I-56-1 није детектован. Валидност модела тригеминалног неуропатског бола потврђују разлике које су утврђене између плацебом третираних група (група где је подвезан живац и група где је приступљено живцу али није подвезан) 14., 21. и 28. постоперативног дана.

В. УПОРЕДНА АНАЛИЗА ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Резултати експеримената приказане дисертације показали су одличан безбедносни профил третираних ПХ лиганда, који су разврстани у три структурне групе, а што је процењено у тесту спонтане локомоторне активности, уздигнутом плус лавиринту, ротароду, тесту губитка рефлекса усправљања, пентилентетразолском тесту и Морисовом воденом лавиринту. У овим тестовима диазепам, као референтни бензодиазепински лек, делујући позитивном модулацијом ГАБА_AР, испољава своје седативно, анксиолитичко/седативно, атакично, хипнотичко/анестетичко, антиконвулзивно и антероградно-амнестичко дејство, редом. Додатно, потенцијал за ступање у синергистичке или антагонистичке интеракције

може бити важан за механицистички нове терапијске опције које су у развоју, имајући у виду да фармакодинамске интеракције са већином лекова који ефекте испољавају на нивоу ЦНС-а могу утицати на њихову клиничку ефикасност и подношљивост (Johannessen и Landmark, 2010).

За два ПХ лиганда, ДК-I-56-1 и ДК-I-60-3, процењене су слободне фракције (у плазми и мозгу) и израчунате слободне концентрације у мозгу. Слободне фракције оба лиганда у плазми биле су изузетно ниске (0% за ДК-I-56-1 и 0,84% за ДК-I-60-3), односно, слободне концентрације практично нису могле бити израчунате. Међутим, слободне фракције у мозгу су биле веће, тако да су достигнуте значајне концентрације, што значи да су се захваљујући липофилности супстанце неометано дистрибуирале у мозак. Ettrup и сар. (2011) наводе слично запажање за велики број липофилних N-бензил-супституисаних фенетиламина, код којих ниска слободна фракција лиганда у плазми не утиче значајно на диспозицију у мождано ткиво. Приближно два пута већа вредност параметра AUC_{0-12} , мозак, за супстанцу ДК-I-56-1 указује на предност над ДК-I-60-3.

Једна од биокомпатибилних формулација коју одликују бројне предности је наноемулзија, тако да је део фармакокинетичких истраживања посвећен поређењу уобичајено коришћене суспензије, раствора који садржи 20% органског растварача ДМСО и 20% корастварача *Cremophor EL* (Chiou и сар., 2018) и наноемулзије супстанце ДК-I-56-1. Поређењем концентрација у плазми и мозгу за сваку временску тачку, за три формулације као и фармакокинетичких параметара показане су суптилне разлике, без јасних предности раствора који садржи висок проценат органског растварача и кораставарача у односу на биокомпатибилну наноемулзију. Може се сматрати да су суспензија и наноемулзија адекватне формулације за апликацију огледним животињама и да обезбеђују прихватљиву циљану испоруку супстанци у мозак.

Имајућу у виду да су подаци из студија метаболизма и фармакокинетике лека пресудни у одабиру структура које имају извесну активност на циљном месту од интереса, из база које чине милиони једињења, литература наводи бројне предности и значај методе касетног дозирања (Watanabe и сар., 2006; Nagilla и сар., 2011). С тим у вези у крајњем фармакокинетичком експерименту приказаном у дисертацији урађен је фармакокинетички скрининг 14 ПХ лиганда кроз експерименте касетног дозирања.

У сету експеримената локомоторне активности спроведеним на адултним мужјацима *Wistar* пацова, утврђен је неочекиван, хиперлокомоторни ефекат супстанце ДК-I-56-1 дозиране интраперитонеално (10 мг/кг). Ефекат је потврђен и у дози од 3 мг/кг, али није у дозама од 1 и 30 мг/кг. Ово указује да је у тесту утврђена дозна зависност фармаколошке активности у облику обрнутог латиничног слова У што није неуобичајено за психотропне лекове (нпр. налази са антипсихотима или прокогнитивним супстанцама; Narahashi и сар., 2004; Nishitani и сар., 2019).

Неочекивана блага хиперлокомоторна активност која је добијена на пацовима *Wistar* соја и мишевима *C57BL* соја (где је била присутна и у присуству седативне дозе диазепама), може да буде последица суптилног повећања мотивационог подстицаја, што се може искористити код депресивних поремећаја (Bewernick и сар., 2017). Такође, утврђено је да *CGS 9895*, као један од ПХ лиганда кога одликује висок афинитет за бензодаизепинско место где остварује неутралну модулацију, а у вишим концентрацијама остварује неселективну позитивну модулацију посредством ПХ места, дозно зависно антагонизује

антиконвулзивно дејство диазепама у пентилентетразолском тесту на мишевима (Katzman и Shannon, 1985). Оба скупа података добијених за ПХ лиганде сугеришу да су релативне улоге ГАБА_AР које садрже $\alpha 6$ подјединицу у регулацији моторичких функција свеобухватније и истакнутије код мишева него код пацова, што захтева даља истраживања на систематичнији начин. Ова хипотеза произилази из резултата филогенетског поређења који указују да је $\alpha 6$, поред $\alpha 4$ подјединице, најстарија α подјединица, а да је δ подјединица најстарија од свих подјединица ГАБА_AР (Ortells и сар., 1995).

У анималном моделу тригеминалне неуропатије статистички значајне разлике које су добијене на нивоу *IoN-CCI* групе, између животиња интраперитонеално третираних са ДК-И-56-1, односно плацебом, 14. и 21. постоперативног дана, указују на способност ПХ лиганда да сузбије развој неуропатског бола који је повезан са повредом гране тригеминалног нерва, током примене терапије и седам дана након прекида терапије. Међутим, 14 дана након примене терапије (28. постоперативни дан), антиноцицептивни ефекат ДК-И-56-1 није детектован. Аналогни резултати утврђени су за селективног агонисту 5-НТ_{1A} подтипа серотонинских рецептора у сличном *IoN-CCI* моделу (Deseure и сар., 2003). То би значило да ефекти немају тенденцију да се одржавају дуже време, већ су условљени нивоима лека у плазми или мозгу и нестају након завршетка примене третмана и пада нивоа концентрација у системској циркулацији и на месту дејства. Продужени ефекат је, ипак, трајао извесно време (седам дана), али треба напоменути да је то вероватно време које је било потребно да се патолошки процес разбукти након иницијалне супресије третманом.

Интересантно је напоменути да се тригеминални ганглион налази изван крвно-мождане баријере, тако да може бити место дејства лекова независно од способности да прођу крвно-мождану баријеру (Eftekhari и сар., 2015). Ова чињеница је важна јер је у фармакокинетичком експерименту одређивања слободних фракција у плазми и мозгу добијено да је у плазми вредност практично 0%, док се у мозгу достижу значајне вредности слободних концентрација. Међутим, не може се искључити могућност да се додатна ефикасност може постићи бољим приступом ЦНС-у јер постоји могућност да су $\alpha 6$ ГАБА_AР као мете за ДК-И-56-1 локализовани више рострално, на пример на синаптичким терминалима неурона тригеминалног ганглиона који садрже $\alpha 6$ подјединицу у кичменом тригеминалном *nucleus caudalis*-у, или било где друго у тригеминалном путу бола, и на тај начин у оквиру крвно-мождане баријере (Shibuta и сар., 2012). Независно од тога где се налазе рецептори који садрже $\alpha 6$ подјединицу и посредују у ефектима ДК-И-56-1 у описаном моделу тигеминалне неуропатије, очекује се да ће његова фармаколошки активна концентрација на месту дејства бити у корелацији са концентрацијом у мозгу где су израчунате слободне концентрације довољне да се оствари дејство. Литературни подаци показују да невезана фракција у хомогенатима можданог ткива неколико лекова мале молекулске масе у великој мери корелира са вредностима у ганглијама дорзалних рогова кичмене мождине, што се може узети као сурогат за ситуацију у периферном нервном ткиву (Liu и сар., 2018).

Занимљиво је да CGS 9895, један од ПХ лиганда декларисан као неутрални модулатор високог афинитета за бензодиазепинско место везивања и, при вишим концентрацијама, неселективни позитивни модулатор на ПХ месту (Varagić и сар., 2013a; Varagić и сар., 2013b), различито антагонизује ефекте диазепама код пацова, при чему је најефикаснији у антагонизму атаксичних ефеката диазепама (Katzman и Shannon, 1985). Дакле, феномен

који је утврђен у овој студији није поменут први пут, већ је познат од раније, а његово тумачење би повећало разумевање сложене модуларне улоге ГАБА_AР код пацова.

Према литературним подацима, између ГАБА_AР који садрже $\alpha 6$ подјединицу, који су претежно експримирани у малом мозгу, и моторичке координације постоји привидно парадоксалан однос. У ротарод тесту, $\alpha 6$ knock-out мишеви су били значајно више моторно инкапацирани дејством диазепама у поређењу са мишевима код којих је био очуван ген и експримирана $\alpha 6$ подјединица (Когри и сар., 1999). То упућује да неуротрансмисија посредована ГАБА_AР који садрже $\alpha 6$ подјединицу има тенденцију испољавања протективног, анти-атаксног утицаја.

У *in vitro* експериментима је показано да су три ПХ лиганда (означавају се као супстанца 3 (CGS 9895), супстанца 11 и супстанца 30), који делују као нискоафинитетни, неселективни позитивни алостерни модулатори на ПХ месту, у стању да потпуно инхибирају ефекте растућих концентрација диазепама на $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ рецепторима, када се примене у ниској концентрацији (50 nM) која је довољна да потпуно засити место везивања бензодиазепина, али недовољна да стимулише ГАБА-индуковану струју посредством ПХ места (Ramerstorfer и сар., 2011; Varagic и сар., 2013б). Стога се поставља питање зашто ПХ лиганди нису остварили антагонистички ефекат свих диазепамских ефеката испитиваних кроз *in vivo* тестове. Прво, антагонистичко дејство на бензодиазепинском месту везивања у бихејвиоралним тестовима може бити маскирано истовременим агонистичким дејством на ГАБА_AР који садрже $\alpha 6$ подјединицу. Друга могућност је да антагонистичко дејство ПХ лиганда на бензодиазепинском месту ГАБА_AР омета истовремено везивање лиганда и за ПХ место које је присутно на истом рецепторском агрегату, и обрнуто.

Литература

Bewernick BH, Urbach AS, Bröder A, Kayser S, Schlaepfer TE. Walking away from depression-motor activity increases ratings of mood and incentive drive in patients with major depression. *Psychiatry Res.* 2017 Jan;247:68-72. doi: 10.1016/j.psychres.2016.09.009.

Chiou LC, Lee HJ, Ernst M, Huang WJ, Chou JF, Chen HL, Mouri A, Chen LC, Treven M, Mamiya T, Fan PC, Knutson DE, Witzigmann C, Cook J, Sieghart W, Nabeshima T. Cerebellar $\alpha 6$ -subunit-containing GABAA receptors: a novel therapeutic target for disrupted prepulse inhibition in neuropsychiatric disorders. *Br J Pharmacol.* 2018 Jun;175(12):2414-2427. doi: 10.1111/bph.14198

Deseure K, Hans GH. Chronic Constriction Injury of the Rat's Infraorbital Nerve (IoN-CCI) to Study Trigeminal Neuropathic Pain. *J Vis Exp.* 2015 Sep 21;(103):53167. doi: 10.3791/53167.

Deseure K, Koek W, Adriaensen H, Colpaert FC. Continuous administration of the 5-hydroxytryptamine_{1A} agonist (3-Chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[(5-methyl-pyridin-2-yl)methyl] -amino]-methylpiperidin-1-yl]-methadone (F 13640) attenuates allodynia-like behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Aug;306(2):505-14. doi: 10.1124/jpet.103.050286.

Eftekhari S, Salvatore CA, Johansson S, Chen TB, Zeng Z, Edvinsson L. Localization of CGRP, CGRP receptor, PACAP and glutamate in trigeminal ganglion. Relation to the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2015 Mar 10;1600:93-109. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.031.

Ettrup A, Hansen M, Santini MA, Paine J, Gillings N, Palner M, Lehel S, Herth MM, Madsen J, Kristensen J, Begtrup M, Knudsen GM. Radiosynthesis and in vivo evaluation of a series of substituted ¹¹C-phenethylamines as 5-HT (2A) agonist PET tracers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011 Apr;38(4):681-93. doi: 10.1007/s00259-010-1686-8.

Johannessen SI, Landmark CJ. Antiepileptic drug interactions - principles and clinical implications. *Curr Neuropharmacol*. 2010 Sep;8(3):254-67. doi: 10.2174/157015910792246254.

Katzman NJ, Shannon HE. Differential diazepam-antagonist effects of the benzodiazepine receptor ligand CGS 9895 in rodents. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985 Dec;235(3):589-95. PMID: 3001268

Korpi ER, Koikkalainen P, Vekovischeva OY, Mäkelä R, Kleinz R, Uusi-Oukari M, Wisden W. Cerebellar granule-cell-specific GABAA receptors attenuate benzodiazepine-induced ataxia: evidence from alpha 6-subunit-deficient mice. *Eur J Neurosci*. 1999 Jan;11(1):233-40. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00421.x.

Liu H, Chen Y, Huang L, Sun X, Fu T, Wu S, Zhu X, Zhen W, Liu J, Lu G, Cai W, Yang T, Zhang W, Yu X, Wan Z, Wang J, Summerfield SG, Dong K, Terstappen GC. Drug Distribution into Peripheral Nerve. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018 May;365(2):336-345. doi: 10.1124/jpet.117.245613.

Nagilla R, Nord M, McAtee JJ, Jolivet LJ. Cassette dosing for pharmacokinetic screening in drug discovery: comparison of clearance, volume of distribution, half-life, mean residence time, and oral bioavailability obtained by cassette and discrete dosing in rats. *J Pharm Sci*. 2011 Sep;100(9):3862-74. doi: 10.1002/jps.22525.

Narahashi T, Moriguchi S, Zhao X, Marszalec W, Yeh JZ. Mechanisms of action of cognitive enhancers on neuroreceptors. *Biol Pharm Bull*. 2004 Nov;27(11):1701-6. doi: 10.1248/bpb.27.1701.

Nishitani N, Sasamori H, Ohmura Y, Yoshida T, Yoshioka M. Blonanserin suppresses impulsive action in rats. *J Pharmacol Sci*. 2019 Nov;141(3):127-130. doi: 10.1016/j.jphs.2019.09.013.

Ortells MO, Lunt GG. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci*. 1995 Mar;18(3):121-7. doi: 10.1016/0166-2236(95)93887-4.

Ramerstorfer J, Furtmüller R, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Sieghart W, Ernst M. The GABAA receptor alpha+beta- interface: a novel target for subtype selective drugs. *J Neurosci*. 2011 Jan 19;31(3):870-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5012-10.2011.

Shibuta K, Suzuki I, Shinoda M, Tsuboi Y, Honda K, Shimizu N, Sessle BJ, Iwata K. Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. *Brain Res*. 2012 Apr 27;1451:74-86. doi: 10.1016/j.brainres.2012.02.023.

Varagic Z, Ramerstorfer J, Huang S, Rallapalli S, Sarto-Jackson I, Cook J, Sieghart W, Ernst M. Subtype selectivity of $\alpha+\beta$ - site ligands of GABAA receptors: identification of the first highly specific positive modulators at $\alpha6\beta2/3\gamma2$ receptors. *Br J Pharmacol*. 2013b May;169(2):384-99. doi: 10.1111/bph.12153.

Varagic Z, Wimmer L, Schnürch M, Mihovilovic MD, Huang S, Rallapalli S, Cook JM, Mirheydari P, Ecker GF, Sieghart W, Ernst M. Identification of novel positive allosteric modulators and null modulators at the GABAA receptor $\alpha+\beta$ - interface. Br J Pharmacol. 2013a May;169(2):371-83. doi: 10.1111/bph.12151.

Watanabe T, Schulz D, Morisseau C, Hammock BD. High-throughput pharmacokinetic method: cassette dosing in mice associated with minuscule serial bleedings and LC/MS/MS analysis. Anal Chim Acta. 2006 Feb 10;559(1):37-44. doi: 10.1016/j.aca.2005.11.049.

Г. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Радови објављени у међународном часопису изузетних вредности (M21a)

1. Knutson DE, Kodali R, **Divović B**, Treven M, Stephen MR, Zahn NM, Dobričić V, Huber AT, Meirelles MA, Verma RS, Wimmer L, Witzigmann C, Arnold LA, Chiou LC, Ernst M, Mihovilovic MD, Savić MM, Sieghart W, Cook JM. Design and Synthesis of Novel Deuterated Ligands Functionally Selective for the γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor (GABAAR) $\alpha 6$ Subtype with Improved Metabolic Stability and Enhanced Bioavailability. J Med Chem. 2018 Mar 22;61(6):2422-2446. **IF (2018) = 6,054; Chemistry, Medicinal (3/61) M21a**

Радови објављени у истакнутом међународном часопису (M22)

1. **Divović Matović B**, Knutson D, Mitrović J, Stevanović V, Stanojević B, Savić S, Cook JM, Savić MM. Behavioural interaction of pyrazoloquinolinone positive allosteric modulators at $\alpha 6$ GABAA receptors and diazepam in rats: Anti-diazepam-induced ataxia action as a structure-dependent feature. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2022 Sep 30. **IF (2021) = 3,688; Pharmacology & Pharmacy (134/279) M22**

2. Vasović D, **Divović B**, Treven M, Knutson DE, Steudle F, Scholze P, Obradović A, Fabjan J, Brković B, Sieghart W, Ernst M, Cook JM, Savić MM. Trigeminal neuropathic pain development and maintenance in rats are suppressed by a positive modulator of $\alpha 6$ GABA(A) receptors. Eur J Pain. 2019 Jan 11. **IF (2019) = 3,492; Neurosciences (107/272) M22**

Саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34)

1. Divović Matović B, Mitrović J, Knutson DE, Batinić B, Savić SD, Savić MM. Nanosuspension formulation of DK-I-56-1, a deuterated ligand functionally selective for the $\alpha 6$ GABAA receptors, induces hyperlocomotion in mice. 32nd European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress, Copenhagen, Denmark, 7-10 September 2019

Д. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Резултати ове дисертације дали су детаљан увид у базичну фармакокинетичку и фармаколошку карактеризацију пиразолохинолинонских једињења која су међусобни аналози у смислу разлика које настају услед деутерације, нитрогеновања и флуоринације. За групу аналога супстанце PZ-II-029 који представљају потенцијалне лекове за бројне неуропсихијатријске болести показано је да су лишени било каквог потенцијала за акутне

нежељене интеракције са истовремено примењеним бензодиазепинима. С друге стране, могу у потпуности да спрече њихово атаксично дејство. Из наведене групе аналога, супстанца ДК-І-56-1 је идентификована као водећа молекула и показана је њена антиноцицептивна активност у анималном моделу тригеминалне неуропатије. С тим у вези, резултати ове дисертације су умногоме допринели да супстанца ДК-І-56-1 стигне до преклиничких испитивања, и на тај начин започне свој развој кроз регулаторне студије.

Ђ. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу прегледа докторске дисертације маг. фарм. Бранке Дивовић Матовић под називом **„Фармаколошка карактеризација утицаја деутерације изабраних пиразолохинолинона као модулятора ГАБА_A рецептора”** може се закључити да је кандидат испунио постављене циљеве и да резултати приказани у дисертацији представљају оригиналан и значајан научни допринос, што је потврђено њиховим објављивањем у облику три рада у међународним часописима, чији збир импакт фактора износи 13,234.

Комисија, стога, предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и након добијања сагласности Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду одобри маг. фарм. Бранки Дивовић Матовић јавну одбрану докторске дисертације.

Београд, 14.10.2022.

Чланови Комисије:

1. _____

Др Владимир Добричић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

2. _____

Др Бојан Батинић, доцент
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

3. _____

Др Александар Трбовић, редовни професор
Универзитет у Београду – Медицински факултет