

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Srđan M. Joksimović

**Značaj modulacije pojedinih podtipova
benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A
receptora za ispoljavanje bihevioralnih
efekata benzodiazepina**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY**

Srđan M. Joksimović

**The role of modulating distinct subtypes of
the benzodiazepine binding site of GABA_A
receptors in the manifestation of
benzodiazepine behavioral effects**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTOR
DOKTORSKE DISERTACIJE:

Dr Miroslav Savić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu–Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Miroslav Savić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu–Farmaceutski fakultet

Dr Nenad Ugrešić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu–Farmaceutski fakultet

Dr Dubravko Bokonjić, redovni profesor
Univerzitet odbrane u Beogradu,
Medicinski fakultet Vojnomedicinske
akademije

DATUM ODBRANE:

Bilo bi izuzetno neiskreno reći da je ova doktorska disertacija plod samo mog rada. Prvo bih želeo da se zahvalim svojim kolegama i najbližim saradnicima Jovani Kovačević, Mariji Milić, Tamari Timić, Tamari Radulović i Bojanu Batiniću, bez čije svesrdne pomoći kako u eksperimentalnom radu, tako u rešavanju brojnih problema na koje smo nailazili, ne bih uspeo da završim ovu disertaciju.

Posebno sam zahvalan Tamari Timić i Aleksandru Obradoviću na dugim i smislenim diskusijama, podršci i prijateljskim savetima, koji su mi bili od velike pomoći u trenucima kada je to bilo najpotrebnije.

Zahvalnost dugujem i kolegici Gordani Brajković iz Nacionalnog centra za kontrolu trovanja VMA, kao i kolegi Bojanu Markoviću sa Katedre za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta.

Ovo istraživanje ne bi bilo moguće bez uspešne saradnje sa profesorom James M. Cook-om (SAD), pa mu se ovom prilikom zahvaljujem na ukazanom poverenju. Veliku pomoć u izradi disertacije predstavljali su mi i rezultati iz laboratorije profesora Werner-a Sieghart-a iz Centra za istraživanje mozga (Austrija). Njegovi oštroumni komentari i zapažanja znatno su uticali na diskusiju naših rezultata. Naročito se zahvaljujem kolegi Zdravku Varagiću koji je sproveo najveći deo ovih eksperimenata.

Prof. dr Nenad Ugrešić i prof. dr Dubravko Bokonić su svojim iskustvom i vrlo korisnim komentarima i sugestijama pomogli da ova disertacija bude kvalitetnija i sveobuhvatnija, i na tome sam im veoma zahvalan.

Svom mentoru, prof. dr Miroslavu Saviću, dugujem beskrajnu zahvalnost na savetima, kritikama, strpljenju, ali i neverovatnoj požrtvovanosti tokom svih sedam godina naše saradnje: od diplomskog rada do doktorske disertacije.

I na kraju, želim da se zahvalim svojoj porodici na bezrezervnoj podršci i ljubavi koju su mi pružali svih ovih godina. Sve što bih mogao da napišem kao zahvalnicu svojoj supruzi umanjilo bi ono šta stvarno osećam i mislim.

Značaj modulacije pojedinih podtipova benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora za ispoljavanje bihevioralnih efekata benzodiazepina

REZIME

Ubrzo nakon otkrića supstanci benzodiazepinske strukture 60-tih godina prošlog veka, diazepam je postao jedan od najpropisivanijih lekova (Valium®). Međutim, iako i dalje vrlo popularni lekovi, benzodiazepini se u modernoj kliničkoj praksi propisuju sa mnogo više predostrožnosti, što se može povezati sa pojavom novijih terapijskih alternativa, ali i ne tako povoljnog bezbednosnog profila. Svi benzodiazepini koji se nalaze u kliničkoj upotrebi su neselektivni pozitivni alosterni modulatori benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora. Ovo vezno mesto se nalazi na međupovršini između α i γ_2 podjedinice GABA_A receptora, koji se najčešće sastoji od 1 γ , 2 β i 2 α (α_1 , α_2 , α_3 ili α_5) podjedinice. Benzodiazepini, primenjeni akutno, ispoljavaju sedativni, hipnotički, anksiolitički, antikonvulzivni, miorelaksantni i amnezijski efekat u eksperimentalnih životinja i ljudi. Višekratna primena benzodiazepina može dovesti do fizičke zavisnosti tako da se po prekidu terapije mogu pojaviti znaci sindroma obustave, a poznato je i da ovi lekovi mogu biti lekovi zloupotrebe. Komparabilan afinitet i značajna potencijacija sva četiri podtipa GABA_A receptora zaslužni su za ovako širok spektar delovanja benzodiazepina.

Svi ovi nedostaci uticali su na smanjenje kliničke upotrebe benzodiazepina, ali su istovremeno inspirisali razvoj supstanci selektivnih za pojedine podtipove GABA_A receptora – od kojih potencijalno najveći terapijski značaj imaju anksioselektivni anksiolitici – čime bi se postiglo razdvajanje željenih od neželjenih efekata. Razvoj selektivnih liganada se u velikoj meri oslanjao na rezultate studija na genetski modifikovanim miševima, koji su jasno ukazali na vezu između pojedinih podtipova GABA_A receptora i različitih efekata benzodiazepina. Tako su sedativni, amnezijski, ataksični i delom antikonvulzivni efekat diazepamata pripisani populaciji α_1 GABA_A receptora, anksiolitički α_2 –, a u određenim okolnostima i α_3 GABA_A receptorima, u posredovanju miorelaksantnog efekta učestvuju $\alpha_2/\alpha_3/\alpha_5$ GABA_A receptori, dok su za uticaj na određene memorijske procese odgovorni GABA_A receptori koji sadrže α_5 podjedinicu.

Međutim, ovako dogmatski koncept ne oslikava realnu situaciju u složenom biološkom sistemu u kojem jedan efekat može zavisiti od aktivacije različitih podtipova receptora. Stoga, u ispitivanje povezanosti modulacije pojedinih podtipova GABA_A receptora i bihejvioralnih efekata benzodiazepina potrebno je uključiti i farmakološku manipulaciju selektivnim ligandima na nativnim eksperimentalnim životinjama. Eksperimenti koji predstavljaju osnovu disertacije upravo su usmereni ka ispitivanju bihejvioralnih efekata novosintetisanih liganada GABA_A receptora (SH-I-048A, WYS8, SH-053-2'N, JY-XHe-053 i SH-053-R-CH3-2'F) u pacova, kao i povezivanju ovih *in vivo* efekata sa *in vitro* elektrofiziološkim profilima ispitivanih supstanci. Dodatno, odredili smo koncentraciju SH-I-048A i WYS8, čiji se *in vitro* profili znatno razlikuju od svih do sada publikovanih supstanci, u plazmi/serumu i homogenatu mozga pacova, kako bi procenili u kojoj meri ovi ligandi prolaze krvno-moždanu barijeru. U cilju bihejvioralne karakterizacije ovih supstanci korišćeni su: test spontane lokomotorne aktivnosti (praćenje sedativnog efekta), uzdignuti plus-lavirint (praćenje uticaja na anksioznost), Morisov vodeni lavirint (prostorno učenje), rotarod (ataksija), test jačine stiska (miorelaksacija) i pentilentetrazolski test (antikonvulzivni efekat).

Koncentracije SH-I-048A i WYS8 u plazmi/serumu i homogenatu mozga bile su u očekivanim granicama i u direktnoj korelaciji sa primenjenim dozama, svedočeci o jasnoj vezi između postignutih koncentracija u mozgu pacova i identifikovanih bihejvioralnih efekata. Rezultati eksperimenata sa supstancom bez selektivnosti u afinitetu za GABA_A receptore osetljive na benzodiazepine (SH-I-048A), dokazali su da je moguće postići selektivan uticaj na određene bihejvioralne efekte, samo ako postoje čak i relativno male razlike u potencijaciji pojedinih podtipova GABA_A receptora. Parcijalna aktivacija α_1 GABA_A receptora – koja nastaje kao posledica primene WYS8, supstance sa izuzetnom selektivnošću za ovaj podtip GABA_A receptora – može indukovati samo zanemarljive promene u ponašanju pacova. Međutim, u kombinaciji sa diazepamom, WYS8 je značajno uticao na smanjenje sedacije, mišićne relaksacije i antikonvulzivne aktivnosti diazepama, dok je ataksija ostala nepromenjena, a anksiolitički efekat diazepama postao razotkriven. U svetlu rezultata studija na transgenim životinjama, nalaz da α_1 GABA_A receptori imaju regulatornu ulogu u efektima, kao što su miorelaksantni i antikonvulzivni, pa čak i anksiolitički, a presudnu u memorijskim deficitima u vodenom lavirintu, predstavlja značajan doprinos u

razjašnjenju povezanosti modulacije pojedinih podtipova GABA_A receptora i različitih bihevioralnih efekata benzodiazepina. U našim eksperimentalnim uslovima, supstance sa sniženom aktivnošću na α_1 GABA_A receptorima ispoljile su skroman anksiolitički potencijal, a u slučaju SH-053-2'N nije bilo moguće razdvojiti sedativni od anksiolitičkog efekta. Supstanca sa određenom selektivnošću u efikasnosti na α_5 GABA_A receptorima (SH-053-R-CH3-2'F) bila je bez primetnog potencijala za ispoljavanje anksiolitičkog efekta, ali je dozno-zavisno ispoljila hipolokomotorni efekat, što je u skladu sa pretpostavljenom ulogom ovih receptora u posredovanju sedativnog efekta. Ovi nalazi, inače u suprotnosti sa pojedinim rezultatima dobijenim sa supstancama sličnih profila, pokazuju da postizanje selektivnog anksiolitičkog efekta, čak i u pretkliničkim ispitivanjima, predstavlja izuzetno težak zadatak.

Naši rezultati podstiču potrebu za uspostavljanjem integrativnijeg pristupa, kojim bi se uz pomoć poznavanja dostupnosti ispitivanih supstanci u biofazi jasno korelirali njihovi *in vitro* i *in vivo* profili, a rezultati studija na genetski modifikovanim životinjama koristili kao jedna od osnovnih, ali ne nužno i određujućih informacija. U potrazi za supstancama optimizovanih farmakoloških profila, kao što su anksioselektivni anksiolitici, stiče se utisak da je odgovarajući balans između aktivacije pojedinih podtipova GABA_A receptora važniji od ciljane aktivacije samo određenih populacija ovih receptora, kako je predloženo studijama na transgenim miševima.

KLJUČNE REČI: benzodiazepini; selektivni ligandi; GABA_A receptor; bihevior; *Wistar* pacov.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

UDK broj: 615.214:159.9.019.4:616-092.9 (043.3)

The role of modulating distinct subtypes of the benzodiazepine binding site of GABA_A receptors in the manifestation of benzodiazepine behavioral effects

ABSTRACT

Soon after the discovery of benzodiazepines in 1960s, diazepam became one of the most selling prescription drugs (Valium[®]). However, in modern clinical practice, due to other therapeutic alternatives and their suboptimal safety profile, benzodiazepines are being prescribed with considerable caution. All benzodiazepines currently in clinical use are nonselective positive allosteric modulators of benzodiazepine binding site of GABA_A receptors. This site is located at the interface of an α and a γ_2 subunit of a GABA_A receptor, usually composed of 1 γ , 2 β i 2 α (α_1 , α_2 , α_3 ili α_5) subunits. After acute treatment, benzodiazepines exert sedative, hypnotic, anxiolytic, anticonvulsive, muscle relaxant and amnesic effects in both experimental animals and humans. Repeated administration can lead to physical dependence and withdrawal symptoms upon cessation of treatment. Also, it is recognized that these drugs have abuse liability. Comparable affinity and significant potentiation at all four benzodiazepine-sensitive GABA_A receptor subtypes are responsible for such a wide spectrum of action elicited by benzodiazepines.

These drawbacks have restricted the clinical use of benzodiazepines, but also inspired the development of subtype-selective agonists of GABA_A receptors – among which anxiolytic possess the largest therapeutical potential – which would enable separation of wanted from unwanted effects. The development of subtype-selective ligands is mainly based on the results of genetic studies, which pointed to a relationship between individual GABA_A receptor subtypes and different effects of benzodiazepines. Thus, sedation, motor incapacitation, anterograde amnesia and, in part, anticonvulsant effect have been attributed to GABA_A receptor population containing the α_1 subunit, anxiolytic effect is most likely mediated by α_2 and, under certain conditions, α_3 GABA_A receptors, muscle relaxant effects are mediated via $\alpha_2/\alpha_3/\alpha_5$ GABA_A receptors, whereas the influence of benzodiazepines on distinct memory processes has been linked to α_5 GABA_A receptors.

However, such a dogmatic approach is far from ideal and cannot identify all behavioral substrates in a complex biological system where one effect can depend on activation of different GABA_A receptor subtypes. Hence, to examine the connections between the modulation of individual GABA_A receptor subtypes and behavioral effects of benzodiazepines, it seems crucial to use the pharmacological manipulations with subtype-selective ligands on native experimental animals. Experiments in the present thesis are focused on behavioral effects of newly synthesized ligands acting at benzodiazepine site (SH-I-048A, WYS8, SH-053-2'N, JY-XHe-053 and SH-053-R-CH3-2'F) in rats, as well as on the connection between these *in vivo* effects and *in vitro* electrophysiological profiles of examined compounds. In order to assess whether SH-I-048A and WYS8, whose *in vitro* profiles could be considered unique, can cross the blood-brain barrier, and to what extent, the plasma/serum and brain tissue concentrations of these ligands were determined. Ligands were tested in behavioral procedures designed to assess the sedative, anxiolytic, amnesic, ataxic, muscle relaxant, and anticonvulsant effects of positive modulators at the benzodiazepine binding site, by means of the spontaneous locomotor activity, elevated plus-maze, Morris water maze, grip strength, and pentylenetetrazole tests, respectively.

The plasma/serum and brain tissue concentrations of SH-I-048A and WYS8 were in the expected range and in direct correlation with the doses applied, demonstrating a clear relationship between the achieved brain concentrations and behavioral effects in rats. The results of experiments with a compound devoid of any selectivity in affinity for benzodiazepine-sensitive GABA_A receptors (SH-I-048A) revealed that even small differences in potentiations of individual GABA_A receptor subtypes can produce a distinct behavioral output. The partial activation at α_1 GABA_A receptors effected by WYS8 may induce only negligible behavioral consequences. Its combination with diazepam, however, was connected with a reduced sedation, muscle relaxation, and anticonvulsant activity, as compared with diazepam alone, whereas ataxia was preserved, while the anxiolytic effect of 2 mg/kg diazepam became unmasked. In the light of the results of genetic studies, our findings that α_1 GABA_A receptors have a regulatory role in myorelaxant, anticonvulsive, and even anxiolytic effects, and a crucial importance in mediating the diazepam-induced memory deficits in water maze, give a valuable contribution in clarifying the relations between the potentiation of individual

GABA_A receptor subtypes and different behavioral effects of benzodiazepines. In our experimental settings, ligands with low activity at α_1 GABA_A receptors exerted only modest anxiolytic potential, whereas in the case of SH-053-2'N sedative and anxiolytic effects could not have been separated. The ligand with a certain degree of functional selectivity for α_5 GABA_A receptors (SH-053-R-CH3-2'F) was devoid of any anxiolytic potential, but it dose-dependently induced hypolocomotion, which is in accordance with the presumed role of these receptors in the mediation of sedative effect. In contrary to a number of published results with ligands possessing similar profiles, these findings suggest that selective anxiolytic effect is hard to achieve, even in a preclinical testing.

Our results encourage a more integrative approach, by which it would be possible to establish firmer links between *in vitro* and *in vivo* data for a given ligand with the aid of its biophase availability, while the results of genetic studies would be used as one of the basic, but not necessarily determining pieces of information. In the quest for ligands with optimized pharmacological profiles, such are anxiolytic, it seems that a correct balance is more important than individual actions at different GABA_A receptor subtypes, which was a concept proposed by studies with transgenic mice.

KEYWORDS: benzodiazepines; subtype-selective ligands; GABA_A receptor; behavior; *Wistar* rat.

Academic Expertise: Pharmacy

Major in: Pharmacology

UDC number: 615.214:159.9.019.4:616-092.9 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GABA KAO NEUROTRANSMITER I GABA INTERNEURONI	2
1.2. TIPOVI RECEPTORA ZA GABA–U.....	4
1.2.1. GABA _A RECEPTORI	4
1.2.1.1. STRUKTURA I DISTRIBUCIJA GABA _A RECEPTORA	5
1.2.1.2. BENZODIAZEPINSKO MESTO VEZIVANJA GABA _A RECEPTORA.....	5
1.3. MODULATORI BENZODIAZEPINSKOG MESTA VEZIVANJA GABA _A RECEPTORA: BIHEJVORALNI EFEKTI I KLINIČKA UPOTREBA.....	10
1.4. GENSKA TEHNOLOGIJA U RASVETLJAVANJU SUPSTRATA BIHEJVORALNIH EFEKATA BENZODIAZEPINA.....	13
1.5. RAZVOJ NOVOSINTETISANIH SUPSTANCI ZA BENZODIAZEPINSKO MESTO VEZIVANJA	15
1.5.1. FARMAKOKINETIČKE I FARMAKODINAMIČKE MODIFIKACIJE	16
1.5.2. RAZVOJ SUPSTANCI SELEKTIVNIH ZA POJEDINE PODTIPOVE GABA _A RECEPTORA	18
1.5.2.1. LIGANDI BENZODIAZEPINSKOG MESTA VEZIVANJA SINTETISANI U LABORATORIJU PROF. COOK–A.....	5
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	26
3. MATERIJAL I METODE	27
3.1. ŽIVOTINJE	27
3.2. SUPSTANCE	27
3.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IZABRANIH SUPSTANCI U SERUMU/PLAZMI I MOZGU PACOVA.....	28
3.4. BIHEJVORALNI TESTOVI	30
3.4.1. TEST SPONTANE LOKOMOTORNE AKTIVNOSTI.....	30
3.4.2. UZDIGNUTI PLUS–LAVIRINT	31
3.4.3. MORISOV VODENI LAVIRINT	33
3.4.4. ROTAROD	35
3.4.5. TEST JAČINE STISKA	36
3.4.6. PENTILENTETRAZOLSKI TEST	37
3.5. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	38

4. REZULTATI.....	40
4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IZABRANIH SUPSTANCI U PLAZMI/SERUMU I MOZGU PACOVA.....	40
4.1.1. EKSPERIMENT 1.....	40
4.1.2. EKSPERIMENT 2.....	40
4.2. TEST SPONTANE LOKOMOTORNE AKTIVNOSTI	41
4.2.1. EKSPERIMENT 1.....	41
4.2.2. EKSPERIMENT 2.....	43
4.2.3. EKSPERIMENT 3.....	44
4.2.4. EKSPERIMENT 4.....	46
4.2.5. EKSPERIMENT 5.....	47
4.3. UZDIGNUTI PLUS–LAVIRINT	49
4.3.1. EKSPERIMENT 1.....	49
4.3.2. EKSPERIMENT 2.....	50
4.3.3. EKSPERIMENT 3.....	52
4.3.4. EKSPERIMENT 4.....	54
4.3.5. EKSPERIMENT 5.....	55
4.4. MORISOV VODENI LAVIRINT	55
4.4.1. EKSPERIMENT 1.....	55
4.4.2. EKSPERIMENT 2.....	56
4.4.3. EKSPERIMENT 3.....	62
4.5. ROTAROD	63
4.5.1. EKSPERIMENT 1.....	63
4.5.2. EKSPERIMENT 2.....	63
4.6. TEST JAČINE STISKA.....	64
4.6.1. EKSPERIMENT 1.....	64
4.6.2. EKSPERIMENT 2.....	65
4.7. PENTILENTETRAZOLSKI TEST.....	66
4.7.1. EKSPERIMENT 1.....	66
5. DISKUSIJA.....	68
5.1. SH–I–048A.....	70
5.2. WYS8.....	73

5.3. SH-053-2’N, JY-XHE-053 i SH-053-R-CH3-2’F.....	81
5.4. OPŠTA DISKUSIJA.....	85
6. ZAKLJUČCI.....	91
7. LITERATURA.....	93
KRATKA BIOGRAFIJA KANDIDATA	113

1. UVOD

Ekscitacija i inhibicija neuronskih mreža čine osnovu prenosa informacija u centralnom nervnom sistemu (CNS) sisara. U adekvatnom balansu između aktivnosti ekscitatornih i inhibitornih neurotransmitera leži tajna normalnog funkcionisanja najkompleksnijih procesa koji se odigravaju u mozgu. Nedvosmisleno je pokazano da je najvažniji ekscitatorni neurotransmiter u CNS–u glutamat, a inhibitorni γ -aminobuterna kiselina (GABA). Međusobna koordinacija ova dva neurotransmiterska sistema osigurava adekvatnu ritmičku aktivnost, kako pojedinačnih, tako i grupa neurona, menjajući na taj način sinaptičku plastičnost i osiguravajući normalno funkcionisanje CNS–a (Foster i Kemp, 2006). Smatra se da aktivnost inhibitornih interneurona, od kojih su većina GABA–ergički, definiše prostorno–vremenske okvire neophodne za različite obrasce neuronskih oscilacija koje su od kritičnog značaja za obradu informacija u različitim moždanim strukturama (O’Keefe i Recce, 1993; Paulsen i Moser, 1998; Engel i sar., 2001; Klausberger i sar., 2003; Buzsaki i Draguhn, 2004).

Koliko je GABA važan činilac u neurotransmisiji svedoči i činjenica da se ovaj neurotransmiter može identifikovati praktično u trećini moždanih sinapsi (Burt, 2003). U skladu sa fundamentalnom ulogom koju GABA ima u funkcionisanju CNS–a, sintetisan je veliki broj supstanci koje modulišu GABA–ergički sistem i na taj način utiču na najrazličitije procese: anksioznost, san, učenje i pamćenje, koordinaciju pokreta, mišićni tonus i epileptogenu aktivnost (Korpi i sar., 2002a). Praktično sve molekularne komponente signalnog puta GABA–e, od sinteze preko aktivacije receptora do ponovnog preuzimanja, mogu se smatrati potencijalnim terapijskim metama (Foster i Kemp, 2006). Istorijski gledano, GABA i njen najrasprotranjeniji GABA_A receptor bili su ciljno mesto delovanja mnogih lekova, od kojih najvažnije mesto zauzimaju barbiturati i benzodiazepini. Pojava prvih lekova benzodiazepinske strukture, 60–ih godina prošlog veka, u potpunosti je potisnula primenu meprobamata i barbiturata, ali je slična sudbina zadesila i same benzodiazepine tokom poslednje dve decenije, u dobroj meri nezasluženo i bez jasnih dokaza (Berney i sar., 2008).

Snažan napredak molekularne biologije i uspesi u kloniranju podjedinica GABA_A receptora, kao i upotreba transgenih životinja, oživali su interes za sintezom novih supstanci sa selektivnim uticajem na pojedina neuronska kola koja koriste GABA–u kao

neurotransmitter (Möhler, 2006). Iako po svojoj prirodi sofisticiran i rafiniran, ovaj se koncept susreo sa praktičnim problemima koji se, skoro po pravilu, javljaju u razvoju novih lekova (Basile i sar., 2004; Skolnick, 2012). Ipak, farmakološka ispitivanja sa ligandima selektivnim za pojedine podtipove GABA_A receptora, podržana nalazima molekularnih tehnika, i dalje se smatraju racionalnim pristupom u potrazi za novim lekovima sa povoljnijim profilom efikasnosti i bezbednosti, ali i proširenim spektrom terapijskih indikacija.

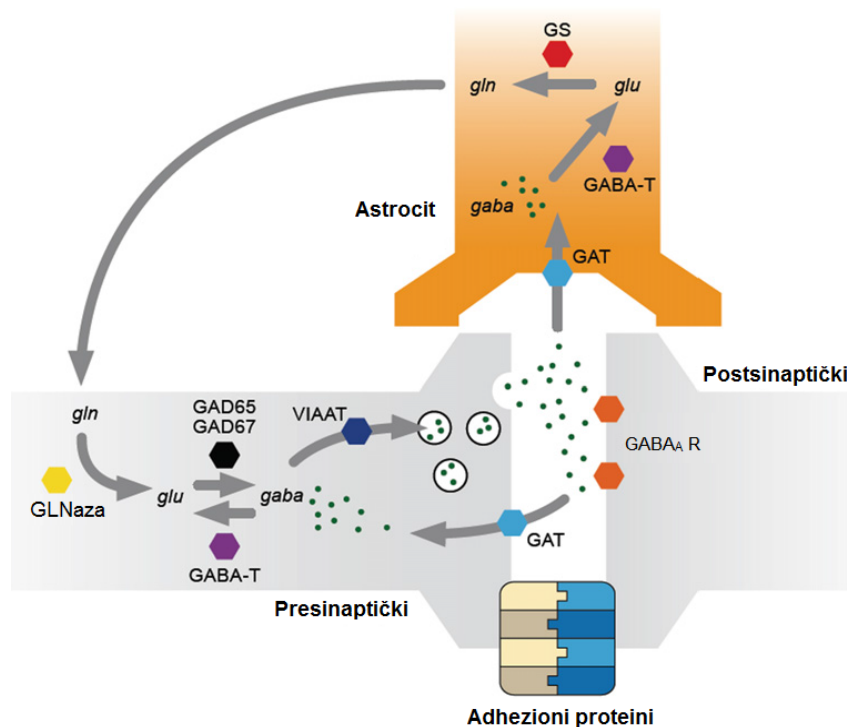
1.1. GABA KAO NEUROTRANSMITER I GABA INTERNEURONI

Iako je jedan od najdominantnijih neurotransmitera u CNS-u, GABA je identifikovana tek 1950. godine od strane dve nezavisne istraživačke grupe (Awapara i sar., 1950; Roberts i Frankel, 1950) u mozgu miševa kao do tada nepoznata ninhidrin-pozitivna supstanca, a da bi se i zvanično proglasila neurotransmiterom, bilo je potrebno još dodatnih 20 godina (Krnjević, 1974; Roberts, 1986a).

Najvažniji put sinteze GABA-e u presinaptičkim terminalima uključuje dekarboksilaciju L-glutamata dejstvom dekarboksilaze glutamatne kiseline (eng. *glutamic acid decarboxylase*—GAD), koja postoji u dve izoforme (65 i 67 kDa) i čija ekspresija odlično korelira sa koncentracijom GABA-e u pojedinim regijama CNS-a (Soghomonian i Martin, 1998; Esclapez i sar., 1994). Upravo je otkriće ovog enzima bilo od ključne važnosti u razotkrivanju činjenice da većina interneurona sadrži GABA-u, kao i da 30–40% svih neurona u CNS-u koriste GABA-u kao svoj primarni neurotransmitter (Bloom i sar., 1971; Roberts, 1986b; Hendry i sar., 1987).

Nakon sinteze iz glutamata kroz katabolički proces katalizovan GAD65 i GAD67 enzimima (Martin i Tobin, 2000), GABA se skladišti u sinaptičke vezikule dejstvom vezikularnog transportera inhibitornih aminokiselina (eng. *vesicular inhibitory aminoacid transporter*—VIAAT) (Gasnier, 2004), odakle se može osloboditi stimulacijom neurona (Slika 1). Nakon otpuštanja u sinaptičku pukotinu kalcijum-posredovanom egzocitozom, GABA aktivira dva tipa receptora (pogledati poglavlje 1.2.), odakle se uklanja preuzimanjem uz pomoć familije specifičnih transportera (GAT), lociranim u nervnim terminalima (GAT1, u manjoj meri i GAT2 i GAT3) (Madsen i sar., 2009). U glijalnim ćelijama, među kojima važno mesto zauzimaju

astrociti, preuzimanje GABA-e se odigrava prevashodno preko GAT3 izoforme (Cherubini i Conti, 2001). Nakon toga, GABA se finalno metaboliše u glutamat dejstvom GABA transaminaze (GABA-T) (Madsen i sar., 2008).



Slika 1. Pojednostavljena ilustracija najvažnijih sinaptičkih puteva odgovornih za sintezu, razgradnju, oslobađanje i ponovno preuzimanje GABA-e (Coghlan i sar., 2012). GABA-T = GABA transaminaza; GLNaza = glutaminaza; GS = glutamin sintetaza.

U CNS-u, inhibitorni neuroni su zaduženi za sintezu i sekreciju GABA-e. Ovi neuroni su uglavnom malih dimenzija i imaju malu površinu projektovanja, iako pojedine populacije dužih GABA projekcija postoje u korteksu (Tamamaki i Tomioka, 2010). Raznolikost je jedna od najvažnijih odlika GABA-ergičkih interneurona. Na osnovu njihove citoarhitekture identifikovani su neuroni koji podsećaju na veoma različite oblike: korpe (eng. *basket*), dekorativne lustere (eng. *chandelier*), dvostruki buket (eng. *double bouquet*) i dr. Prema prisustvu različitih Ca^{2+} -vezujućih proteina mogu se razlikovati parvalbumin-, kalretinin- i kalbindin-pozitivni interneuroni, ali i drugi podtipovi, svaki sa specifičnim elektrofiziološkim i funkcionalnim osobinama (Kubota i Kawaguchi, 1994; De Marco Garcia i sar., 2011 i Fu i sar., 2012). Ovakva raznolikost garantuje da praktično svaki važniji segment tipičnog piramidalnog neurona

(soma, dendriti, inicijalni segmenti aksona) bude gusto inervisan različitim vrstama GABA–ergičkih interneurona (Houser i sar., 1983; Hendry i sar., 1989; Jones, 1993; Freund i Buzsaki, 1996).

1.2. TIPOVI RECEPTORA ZA GABA–U

Sve svoje aktivnosti GABA postiže delovanjem preko dva tipa receptora: jonotropnih GABA_A i metabotropnih GABA_B receptora (Chebib i Johnston, 1999). Iako je identifikovan i treći tip receptora za GABA–u, koji ima svoje farmakološke specifičnosti i uglavnom sadrži ρ podjedinice, naziv „GABA_C receptor” nije dobio širi konsenzus u stručnoj javnosti, a IUPHAR (eng. *The International Union of Basic i Clinical Pharmacology*) je svrstao ove receptore u GABA_A populaciju (Olsen i Sieghart, 2008).

Za razliku od GABA_A receptora, transmembranskih proteina koji formiraju jonski kanal, aktivacijom GABA_B receptora, u zavisnosti od pridruženog G proteina (većinom iz klasa Gi/o), može doći od aktivacije ispravljajčkih K⁺ kanala ili inhibicije voltažno–zavisnih Ca²⁺ kanala, što uključuje i regulaciju signalnih puteva posredovanih cAMP–om ili inozitol–fosfatom (Bowery i sar., 2002; Bettler i sar., 2004). Takođe, GABA_B receptori su osetljivi na baklofen, ali nisu osetljivi na bikukulin i brojne druge supstance koje mogu modulirati GABA_A receptore, pa samim tim ne predstavljaju ni približno tako važnu terapijski metu kao što su to jonotropni receptori za GABA–u.

1.2.1. GABA_A RECEPTORI

Od svih receptora koji posreduju u inhibitornoj neurotransmisiji u CNS–u jonotropni GABA_A receptori imaju najvažniju ulogu. Ovi receptori su prvobitno identifikovani pomoću farmakoloških manipulacija: aktivira ih GABA i specifični agonist muscimol, blokira ih bikukulin i pikrotoksin, a modulišu barbiturati, benzodiazepini i mnogi drugi ligandi (Macdonald i Olsen, 1994; Sieghart, 1995).

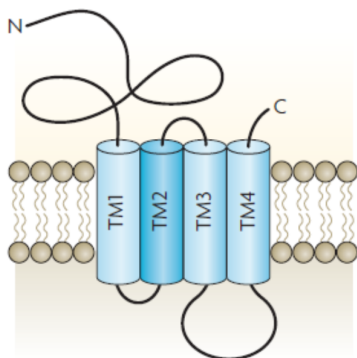
GABA_A receptori pripadaju familiji pentamernih ligand–zavisnih jonskih kanala sa Cis–petljom (eng. *Cys–loop*), koja uključuje i nikotinske receptore (Corringer i sar., 2000), glicinske receptore (Breitinger i Becker, 2002), 5–HT₃ receptore (Thompson i

Lummis, 2006) i jonske kanale koje aktiviraju joni Zn^{2+} (Davies i sar., 2003). Svi $GABA_A$ receptori identifikovani u sisara selektivni su za pojedine anjone. Naime, povećana provodljivost Cl^- jona posredovana ovim receptorima najčešće dovodi do hiperpolarizacije i inhibicije neuronske aktivnosti, budući da je ekvilibrijumski potencijal Cl^- jona blizak potencijalu mirovanja, a koncentracija ovog jona unutar samog neurona znatno je niža od koncentracije u ekstracelularnoj tečnosti (Martin i Olsen, 2000). Međutim, u zavisnosti od ekspresije transportera za Cl^- jon (najviše efluksnog tipa, kao što je K^+-Cl^- kotransporter KCC2), njegova intracelularna koncentracija može se povećati, što posledično dovodi do smanjenja ekvilibrijumskog potencijala. U takvim uslovima, koji se normalno sreću samo u ranom razvoju (Ben-Ari, 2002), aktivacija $GABA_A$ receptora neće izazvati hiperpolarizaciju, već depolarizaciju membrane neurona.

Iako su u većini slučajeva selektivni samo za Cl^- jon, $GABA_A$ receptori mogu provoditi i jedan drugi negativno naelektrisan jon—bikarbonatni jon (HCO_3^-) (Kaila i sar., 1997). Za razliku od Cl^- jona koji može izazvati hiperpolarizaciju ili depolarizaciju, u zavisnosti od stepena razvoja nervnog tkiva i ekspresije KCC2, HCO_3^- jon striktno dovodi do depolarizacije membrane. Značaj provođenja ovog jona zavisi od tkiva i aktivnosti karboanhidraze (najveći značaj ima CAVII izoforma), ali i ekspresije odgovarajućih anjonskih pumpi (Rivera i sar., 2005).

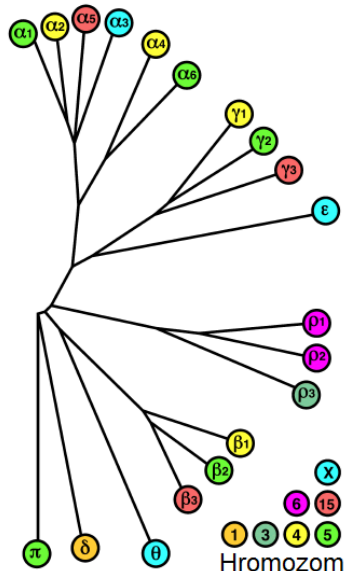
1.2.1.1. STRUKTURA I DISTRIBUCIJA $GABA_A$ RECEPTORA

$GABA_A$ receptori su heteropentamerne strukture, a svaka od pet podjedinica sastoji se od velikog hidrofilnog ekstracelularnog N-kraja, četiri hidrofobna transmembranska domena (TM 1–4), velike intracelularne petlje između TM3 i TM4, i završava se relativno kratkim ekstracelularnim C-krajem (Slika 2) (Nayeem i sar., 1994). Kao i kod ostalih receptora iz ove familije, drugi transmembranski domen podjedinice, uz eventualni doprinos i TM1 domena, direktno učestvuje u formiranju samog kanala (Corringer i sar., 2000; Sine i Engel, 2006).



**Slika 2. Shematski topografski prikaz strukture jedne podjedinice GABA_A receptora (Jacob i sar, 2008).
TM = transmembranski domen.**

Završetkom sekvencioniranja humanog genoma, ali i drugih vrsta kičmenjaka, definitivno se dokazalo da postoji 19 gena za GABA_A receptore (Simon i sar., 2004). Ovi geni kodiraju sintezu 16 podjedinica (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ i π), koje se mogu različito kombinovati prilikom građenja GABA_A receptora, i 3 ρ podjedinice koje učestvuju u građenju prethodno pomenutog „GABA_C receptora” (Slika 3). Raznovrsnost ovih podjedinica dodatno je povećana mogućnošću primarne obrade transkripta (eng. *alternative splicing*) čime se generišu različite forme pojedinih podjedinica, od kojih najveću važnost imaju forme γ_2 podjedinice (γ_{2S} i γ_{2L}) (Whiting i sar., 1990).

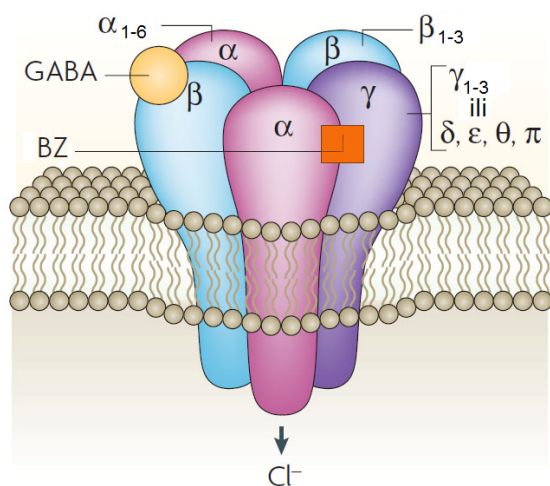


Slika 3. Filogenetsko stablo podjedinica humanih GABA_A receptora i njihova hromozomska lokalizacija (Sigel i Steinmann, 2012).

Prilikom građenja GABA_A receptora dolazi do velike heterogenosti podtipova ovih pentamernih struktura, što predstavlja glavnu odrednicu njihovih farmakoloških

profila (Olsen i Sieghart, 2008). Podtipovi GABA_A receptora razlikuju se po jačini i mestu ekspresije u CNS-u, a samim tim i po funkciji koja je u vezi sa relevantnim neuronskim kolima. Od svih podjedinica, najvažniji diverzitet, sa farmakološke tačke gledišta, obezbeđuje α podjedinica, sa svojih šest izoformi. Neki od ovih receptora koji sadrže α podjedinicu mogu se razlikovati prema ligandima koji se vezuju za benzodiazepinsko mesto GABA_A receptora (Barnard i sar., 1998). Danas je poznato da farmakološku selektivnost nekog liganda određuju priroda, stehiometrija i raspored podjedinica GABA_A receptora.

Velika većina GABA_A receptora sačinjena je od dve kopije iste α podjedinice, dve kopije iste β podjedinice i od jedne kopije drugih podjedinica, kao što su γ , δ i ϵ (Slika 4) (Sieghart i Sperk, 2002; Olsen i Sawyer, 2004). Zbog ograničenja prilikom formiranja jonskog kanala, od 150.000 teorijski mogućih kombinacija samo se oko 500 zaista mogu identifikovati u CNS-u (Sieghart i Sperk, 2002; McKernan i Whiting, 1996), od kojih većina sadrži α , β i γ podjedinice. Receptori ovog tipa mogu se naći u najmanje jednoj od tri varijante: 2 α , 2 β i γ ; 2 α , β i 2 γ ; α , 2 β i 2 γ (Sigel i sar., 2006). Najveći broj $\alpha\beta\gamma$ GABA_A receptora organizovan je na sledeći način: γ - α - β - α - β (Minier i Sigel, 2004).



Slika 4. Heteropentamerna struktura GABA_A receptora sa mogućim kombinacijama različitih podjedinica i sa prikazom veznih mesta za GABA-u i benzodiazepine (BZ) (Jacob i sar., 2008).

Studije sa specifičnim antitelima selektivnim za pojedine podtipove GABA_A receptora pokazale su da je $\alpha_1\beta_n\gamma_2$ struktura najrasprostranjenija u mozgu (Sieghart i Sperk, 2002; McKernan i Whiting, 1996). U miševa sa *knock-out* mutacijom α_1 podjedinice količina ukupnih GABA_A receptora smanjena je za čak 50% (Sur i sar.,

2001). Iako većina populacije ovog podtipa receptora sadrži istu izoformu α podjedinice, identifikovane su i kombinacije α_1 sa α_2 , α_3 , α_5 ili α_6 podjedinicom.

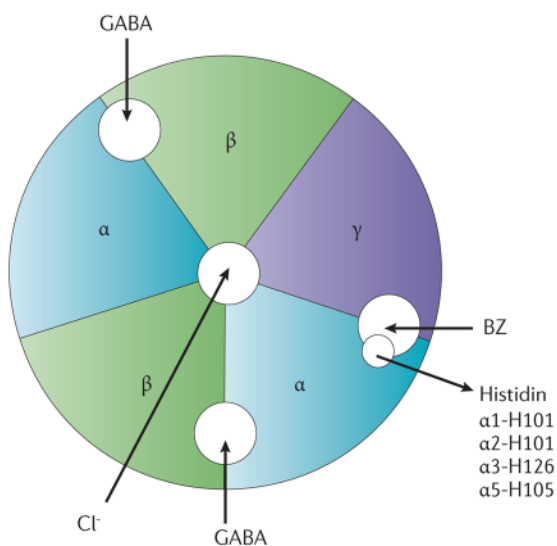
Imunoprecipitacione studije ukazale su na znatno manju rasprostranjenost receptora koji sadrže α_2 (amigdala, nukleus akumbens, strijatum itd.) ili α_3 podjedinicu (korteks, amigdala, talamus itd.), dok se α_5 podjedinica skoro isključivo nalazi u hipokampusu, gde može činiti čak i do 31% svih receptora (Pirker i sar., 2000; Sieghart i Sperk, 2002). Preostale dve α izoforme mogu se prevashodno detektovati u talamusu (α_4) i cerebelumu (α_6). Među β podjedinicama, najrasprostranjenija je β_2 izoforma, β_3 takođe može biti u velikom broju, ali sa diskretnijom lokalizacijom, a najmanje ima β_1 podjedinice. Receptori koji sadrže γ_1 podjedinicu nalaze se u svega nekoliko moždanih regija (gde može zameniti γ_2 podjedinicu), veoma mali broj receptora sadrži γ_3 , a čak 75–80% svih GABA_A receptora sadrži γ_2 podjedinicu (Sieghart i Ernst, 2005). Najveći broj pomenutih podtipova GABA_A receptora zadužen je za brzu postsinaptičku inhibiciju u uslovima visokih, milimolarnih koncentracija GABA–e, poznatiju kao fazna inhibicija (Farrant i Nusser, 2005).

Vrlo značajnu i interesantnu populaciju čine GABA_A receptori koji sadrže δ podjedinicu, jer ovi receptori predstavljaju mesto delovanja različitih neurosteroida, kao endogenih (Belelli i Lambert, 2005), i etanola, kao egzogenog liganda (Glykys i sar., 2007). Ovi se receptori nalaze peri– i ekstrasinaptički u talamusu, pojedinim slojevima kore velikog mozga i drugim strukturama (gde dominantno sadrže i α_4 podjedinicu), dok u granuliranim ćelijama cerebeluma po pravilu sadrže i α_6 podjedinicu (Nusser i sar., 1998; Peng i sar., 2002; Wei i sar., 2003). Specifična lokalizacija i distribucija GABA_A receptora koji sadrže δ podjedinicu određuje njihovu glavnu ulogu u posredovanju tonične inhibicije, dajući tako ritam neuronskim mrežama pri vrlo niskim, nanomolarnim koncentracijama GABA–e (Walker i Semyanov, 2008).

1.2.1.2. BENZODIAZEPINSKO MESTO VEZIVANJA GABA_A RECEPTORA

Od 14 do sada identifikovanih veznih mesta za različite ligande GABA_A receptora, među kojima su poznatija mesta za lorekrezol, barbiturate, neurosteroidne i Zn²⁺ jon (Korpi i sar., 2002a), mesto za vezivanje molekula benzodiazepinske strukture pokazalo se kao najatraktivnija terapijska meta u razvoju novih lekova (Bateson, 2004; D’Hulst i

sar., 2009). Veliki broj GABA_A receptora sadrži vezno mesto za benzodiazepine, a takvi receptori su sačinjeni od β , γ i α_1 , α_2 , α_3 ili α_5 podjedinice u klasičnoj 2:2:1 stehiometriji (Olsen i Sieghart, 2008). Ovo važno mesto vezivanja nalazi se na međupovršini između α i γ podjedinice (Slika 5), dok β podjedinica, iako neophodna za formiranje kanala, ne utiče na osetljivost GABA_A receptora na benzodiazepine (Hadingham i sar., 1993; Korpi i sar., 2002a).



Slika 5. Mesta vezivanja za GABA-u i benzodiazepine (BZ) i pozicije histidina u okviru različitih GABA_A receptora osetljivih na BZ (Rudolph i Knoflach, 2011).

Razvoj tehnika molekularne biologije omogućio je detaljno ispitivanje i detekciju amino kiselina čije je prisustvo od kritičnog značaja za afinitet, selektivnost i intrinzičku aktivnost različitih benzodiazepina. Tako je otkriveno da, na primer, zamena histidina argininom, na položaju 101 u okviru α_1 ili α_2 podjedinice, potpuno onemogućava vezivanje diazepama, kao tipičnog benzodiazepina, za GABA_A receptore koji sadrže ove podjedinice (Korpi i sar., 2002a). Upravo prisustvo arginina na pozicijama 99, odnosno 100, čini α_4 - i α_6 GABA_A receptore neosetljivim na benzodiazepine (Wieland i sar., 1992; Wieland i Lüddens, 1994).

Pored supstanci benzodiazepinske strukture, postoje i drugi ligandi benzodiazepinskog mesta vezivanja sa različitim hemijskim strukturama, a koji zauzimaju značajno mesto, kako u bazičnoj, tako i u kliničkoj farmakologiji (npr. zolpidem, zaleplon, beta karbolini). Zbog uloge u terapiji nesanice, važno je izdvojiti zolpidem, supstancu imidazopiridinske strukture, koja pokazuje jasnu preferenciju za GABA_A receptore koji sadrže α_1 podjedinicu (Langer i sar., 1992; Sanger, 2004). Ovo je bitna razlika u odnosu na klasične benzodiazepine, poput diazepama (Tabela 2), koji

ispoljavaju komparabilan afinitet za sve receptore sa benzodiazepinskim mestom vezivanja (Benke i sar., 1996).

1.3. MODULATORI BENZODIAZEPINSKOG MESTA VEZIVANJA GABA_A RECEPTORA: BIHEJVIORALNI EFEKTI I KLINIČKA UPOTREBA

Ligandi koji deluju preko benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora deluju indirektno tako što alosterno modulišu provodljivost ovog receptorskog kompleksa (Zorumski i Isenberg, 1991). Identifikovani su pozitivni (agonisti), neutralni (antagonisti) i negativni (inverzni agonisti) alosterni modulatori GABA–ergičke transmisije u CNS–u. Među pozitivnim i negativnim modulatorima postoji i jedna grupa liganada koji ne mogu da dovedu do maksimalnog odgovora, pa se stoga nazivaju parcijalnim agonistima, odnosno inverznim agonstima. U kliničkoj praksi, pokazalo se da samo agonisti (parcijalni i puni) mogu biti od koristi za različite terapijske indikacije, dok su inverzni agonisti ispitani samo u ranim fazama kliničkih studija (Nutt i sar., 2007). Jedini antagonist u kliničkoj upotrebi jeste flumazenil, ali se i ova supstanca, prema svom farmakološkom profilu, može svrstati u parcijalne agoniste (Ramerstorfer i sar., 2010).

Kao i u slučaju značajnog broja veoma korisnih lekova, povoljna terapijska svojstva benzodiazepina u lečenju različitih psihijatrijskih bolesti otkrivena su sticajem srećnih okolnosti (Ban, 2006). Uvođenje benzodiazepina u kliničku praksu, iako bez prethodnog znanja o njihovom mehanizmu delovanja, predstavljalo je ogroman napredak u psihofarmakologiji tokom 1960–70, a u prilog tome svedoči i činjenica da je diazepam bio najpropisivaniji lek čitavu deceniju (Valium®). Sâm termin „benzodiazepin” odnosi se na hemijsku strukturu koja se sastoji od fuzije benzenovog i diazepinskog prstena, u kojem se dva azotova atoma nalaze uglavnom na pozicijama 1 i 4 (1,4–benzodiazepini). Kao sedativi i hipnotici, ovi lekovi su zbog značajno povećanog terapijskog indeksa u potpunosti zamenili do tada neprikosnovene barbiturate (Hamlin, 1993), jer je modulacija GABA_A receptora benzodiazepinima, za razliku od barbiturata, samo–ograničavajuća: provodljivost kanala u prisustvu GABA–e i benzodiazepina nije veća od provodljivosti koja se može postići sa visokim koncentracijama GABA–e.

Takođe, benzodiazepini ne mogu otvoriti hloridni kanal u odsustvu GABA-e (Sigel i Steinmann, 2012).

Poznato je da su sinaptički GABA_A receptori odgovorni za indukciju brzih postsinaptičkih inhibitornih struja pri vrlo kratkoj (50 ms) ekspoziciji milimolarnim koncentracijama GABA-e (Cobb i sar., 1995; Farrant i Nusser, 2005). U prisustvu benzodiazepina, afinitet GABA-e za receptor se povećava, što direktno korespondira sa pomeranjem dozno-zavisne krive u levo tj. ista količina GABA-e sada aktivira veći broj receptora, a amplituda odgovora na GABA-u je povećana. U skladu sa povećanim afinitetom, dolazi do produženog trajanja minijaturnih inhibitornih postsinaptičkih struja (eng. *miniature inhibitory postsynaptic currents*—mIPSCs). Međutim, u pojedinim nervnim tkivima amplituda ovih postsinaptičkih struja ostaje nepromenjena, bez obzira na dodatak agoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja, što može sugerisati da određena količina GABA-e („kvantum”) može zasititi sve receptore u sinapsi, tako da se maksimalni odgovor ne može dalje povećati primenom leka. Smatra se da ovaj efekat „plafona” (eng. *ceiling effect*) koji ispoljavaju benzodiazepini leži u osnovi njihovog povoljnog bezbednosnog profila u poređenju sa barbituratima (Möhler, 2011).

Zahvaljujući distribuciji GABA_A receptora osetljivih na benzodiazepine i svom mehanizmu delovanja, benzodiazepini, primenjeni akutno, ispoljavaju sedativni, hipnotički, anksiolitički, antikonvulzivni, miorelaksantni i amnezijski efekat u eksperimentalnih životinja i ljudi. Pojedini efekti mogu se svrstati u poželjne ili neželjene u zavisnosti od terapijskog cilja. Dok se sedacija i kognitivno oštećenje smatraju neželjenim efektom kada se benzodiazepini propisuju kao anksiolitici, ovi efekti su svakako poželjni u hirurškoj premedikaciji (Buffett–Jerrott i Stewart, 2002).

Od trenutka uvođenja u kliničku praksu, benzodiazepini su široko propisivani pre svega kao lekovi za nesanicu i različita anksiozna stanja. Postoji znatna količina podataka o njihovoj efikasnosti u kratkotrajnom lečenju pojedinih psihijatrijskih oboljenja, uključujući nesanicu (Longo i Johnson, 1998), socijalnu fobiju (Sutherland i Davidson, 1995), generalizovani anksiozni poremećaj (Laakmann i sar., 1998) i panični poremećaj (Gould i sar., 1995). U terapiji nesaniče, primena benzodiazepina može pomoći prilikom uspavlivanja i održavanja sna (Anderson i Shneerson, 2009). Njihova efikasnost i bezbednost, međutim, ne mogu se smatrati impresivnim u poređenju sa drugim dostupnim terapijskim opcijama, ili kada se porede tokom dužeg vremena

korišćenja. Nakon produžene terapije benzodiazepinima (od 4 do 8 meseci) čak 40% pacijenata postane zavisno od ovih lekova, naročito ukoliko imaju i određenu predispoziciju za ispoljavanje zavisnosti (Rickels, 1982; Kan i sar., 1997). Još jedan karakterističan primer jeste primena benzodiazepina u lečenju nesanice, gde tolerancija na sedativno dejstvo, koja se razvija tokom vremena, sprečava njihovu dugotrajnu primenu (Longo i Johnson, 1998).

Upotreba benzodiazepina u savremenoj kliničkoj praksi i dalje je značajna, uprkos priličnom padu u propisivanju ovih lekova (Stahl, 2002). Naime, stavovi stručnjaka su se značajno promenili jer je povećana svest i briga o problemima koje dugotrajna terapija benzodiazepinima može indukovati (Lader, 1994; Woods i Winger, 1995). Ova promena „otvorila je vrata” drugim grupama lekova, pa su tako selektivni inhibitori preuzimanja serotonina postali terapija prvog izbora za generalizovani anksiozni poremećaj (Nash i Nutt, 2007), koji u grupi anksioznih poremećaja ima najveću prevalenciju (Wittchen i Hoyer, 2011). Međutim, kako je za pojavu njihovih terapijskih efekata neophodno najmanje 4 nedelje, benzodiazepini se još uvek široko propisuju za brzo otklanjanje simptoma (Stahl, 2002). Stoga je, u modernoj kliničkoj praksi, primena benzodiazepina u terapiji nesanice i anksioznih poremećaja ograničena na najviše 4 nedelje (Ashton, 1994; Lader, 1999; Martin i sar., 2007).

Benzodiazepini se upotrebljavaju u terapiji epilepsije, kako kod dece, tako i kod odraslih (McMullan i sar., 2010), međutim značajnu prepreku predstavlja česta pojava tolerancije na njihov antikonvulzivni efekat. U svakom slučaju, benzodiazepini se i dalje koriste u urgentnim situacijama gde utiču na smanjenje mortaliteta, do koga dolazi usled teških epileptičnih napada (Hollister i sar., 1993). U lečenju mišićnog spazma koji se javlja u različitim mišićnoskeletnim poremećajima, ovi lekovi takođe mogu biti od koristi (Hollister i sar., 1993).

Važno je istaći da se efekti benzodiazepina ne mogu jasno razdvojiti razlikama u doziranju, ni u pretkliničkoj, niti u kliničkoj primeni (Lippa i sar., 1979). Na primer, iako se anksiolitički efekat može postići pri nižim dozama nego sedativni, izražena somnolencija i dalje predstavlja ozbiljan problem prilikom upotrebe benzodiazepina kao anksiolitika tokom dnevnih aktivnosti, tako da bi noviji „anksioselektivni” lekovi svakako bili deo mogućeg rešenja (Rudolph i Knoflach, 2011). Štaviše, razvoj zavisnosti i tolerancije, kao i mogućnost zloupotrebe, sprečavaju dugotrajnu upotrebu

benzodiazepina (Woods i sar., 1992). Svi pomenuti nedostaci podstakli su brojne istraživačke grupe u potragu za supstratima bihejvioralnih efekata benzodiazepina, jer bi se sa pronalaskom selektivnijih supstanci mogao očekivati i poboljšan profil efikasnosti i bezbednosti ove grupe lekova.

1.4. GENSKA TEHNOLOGIJA U RASVETLJAVANJU SUPSTRATA BIHEJVIOALNIH EFEKATA BENZODIAZEPINA

S obzirom da sisari pokazuju veoma visoku homologiju podjedinica GABA_A receptora (71–99% za miševе i ljude), genetski modifikovani miševi su široko upotrebljavani u cilju ispitivanja fizioloških funkcija različitih podtipova GABA_A receptora (Vicini i Ortinski, 2004). Istraživanjima na transgenim miševima omogućeni su neprocenjivi uvidi u ponašanje eksperimentalnih životinja, koje nastaje kao rezultat aktivacije pojedinih podtipova GABA_A receptora.

Delecija kompletne podjedinice GABA_A receptora (*knock-out* strategija) pojavila se kao prva mogućnost, ali su adaptivne kompenzatorne promene tokom razvića i visoka kompleksnost fenotipa, pa čak i smrtni ishod, učinili interpretaciju dobijenih rezultata izuzetno teškom (Rudolph i Möhler, 2004). Zbog ovakvih problema, nastavilo se sa diskretnijim, tačkastim mutacijama u okviru GABA_A receptora, odnosno sa genetskom manipulacijom gde je jedna aminokiselina zamenjena drugom, čineći tako GABA_A receptor neosetljivim na dejstvo benzodiazepina (*knock-in* strategija). Naime, zamenom histidina argininom na pozicijama 101 u okviru α_1 i α_2 , 126 α_3 i 105 α_5 podjedinice značajno je smanjen afinitet diazepama za receptore koji sadrže ove podjedinice (Wieland i sar., 1992; Benson i sar., 1998). U studijama sa *knock-in* miševima nisu zapažene značajnije promene u strukturi receptora (Löw i sar., 2000), za razliku od prethodno spomenutih *knock-out* životinja (Kralic i sar., 2002a), gde su jasno identifikovane promene u gustini i distribuciji GABA_A receptora (Kralic i sar., 2002b; Korpi i sar., 2002a,b). Još važnije, efekti endogenih liganada, kao što su neurosteroidi i GABA, čini se da nisu poremećeni ovim tačkastim mutacijama.

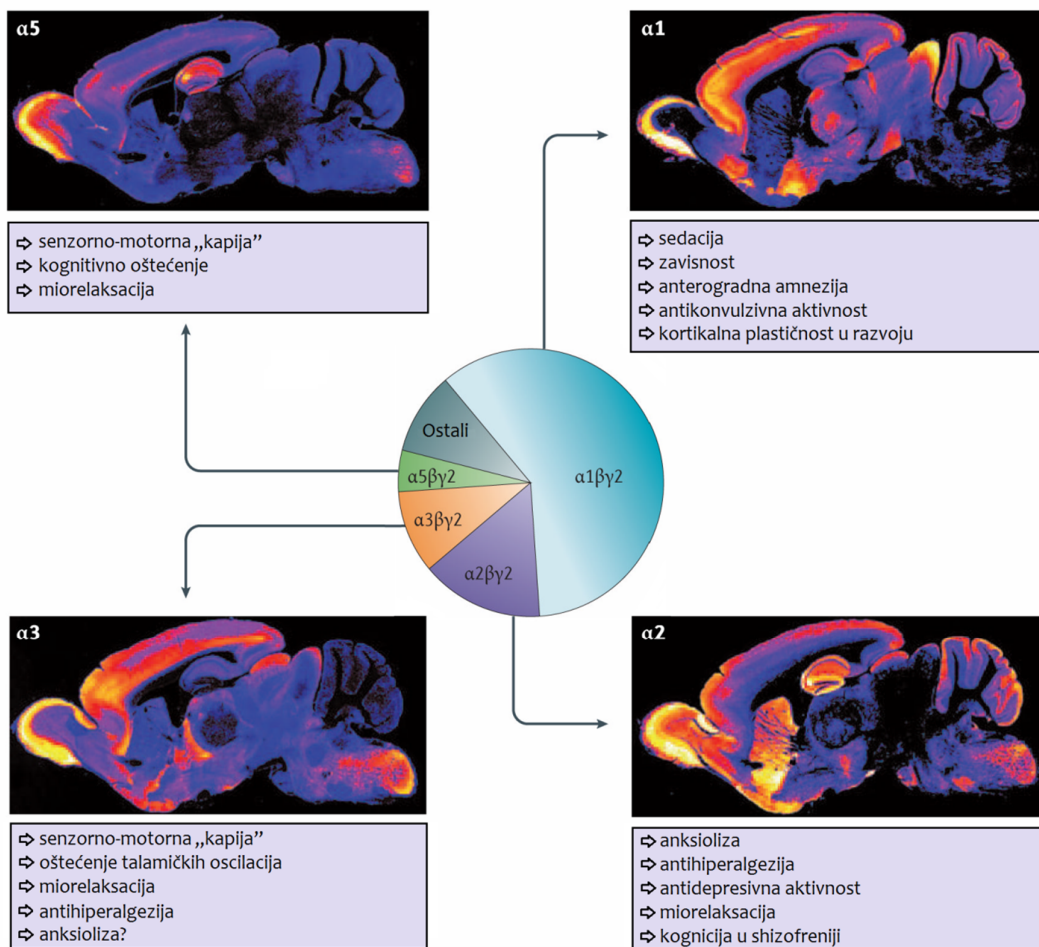
Miševi sa tačkastom H101R mutacijom (histidin zamenjen argininom na poziciji 101) pokazali su potpunu neosetljivost na sedativni i amnezijski, ali samo delimičnu na antikonvulzivni efekat diazepama, dok je ovaj protektivni efekat zolpidema izostao u

potpunosti (Rudolph i sar., 1999; Crestani i sar., 2000; Löw i sar., 2000; McKernan i sar., 2000). Ovaj nalaz bio je u skladu sa farmakološkim profilom zolpidema koji pokazuje jasnu preferenciju u vezivanju za α_1 GABA_A receptore (Crestani i sar., 2001; Dämgen i Lüddens, 1999). Takođe, *knock-in* miševi sa mutacijom α_5 podjedinice ispoljili su poboljšanje kognitivnih funkcija u testu uslovljavanja strahom koji u velikoj meri zavisi od aktivacije hipokampalnih struktura (Crestani i sar., 2002), što upućuje da uticaj diazepama na memorijske procese uključuje i α_5 GABA_A receptore. Ovu hipotezu podržali su i rezultati farmakoloških studija sa inverznim agonistima selektivnim za α_5 GABA_A receptore. Jedan od takvih inverznih agonista poboljšao je izvođenje u vodenom lavirintu, i to u protokolu radne memorije, bez izraženih anksiozenih i prokonvulzivnih osobina, koje se često vezuju za neselektivne inverzne agoniste GABA_A receptora (Dawson i sar., 2006).

Anksiolitički efekat diazepama nije mogao biti registrovan nakon tačkaste mutacije α_2 podjedinice (Löw i sar., 2000). Poznato je da divlji sojevi miševa pod dejstvom diazepama provode više vremena u osvetljenom delu aparata „svetlo–tama”, kao i na otvorenim kracima uzdignutog plus–lavirinta. Međutim, kod sojeva sa mutiranim α_2 GABA_A receptorima, miševi tretirani rastvaračem ili diazepamom provode istu količinu vremena u osvetljenom delu i otvorenim kracima plus–lavirinta. Stoga je zaključeno da α_2 podjedinica ima presudnu ulogu u posredovanju anksiolitičkog dejstva diazepama. Ovaj podtip GABA_A receptora čini se da posreduje i u miorelaksantnom efektu, jer kod α_2 *knock-in* miševa diazepam nije imao efekta u testu povlačenja horizontalne žice koji predstavlja meru mišićnog tonusa (Crestani i sar., 2001). Kod α_3 (H126R) i α_5 (H105R) miševa miorelaksantni efekat diazepama bio je samo smanjen, bez uticaja na sedativne i anksiolitičke efekte (Löw i sar., 2000; Crestani i sar., 2001, 2002).

Eksperimenti sa *knock-in* miševima pokazali su da su sedacija, anterogradna amnezija i, delom, antikonvulzivni efekat diazepama posredovani GABA_A receptorima koji sadrže α_1 podjedinicu, dok je anksiolitički, i u velikoj meri miorelaksantni efekat, posredovan α_2 GABA_A receptorima (Slika 6). Takođe, tolerancija na sedativno dejstvo koja se javlja nakon ponavljane primene benzodiazepina, i tako otežava dužu terapiju ovim lekovima, čini se da je povezana sa aktivacijom α_5 GABA_A receptora (van

Rijnsoever i sar., 2004), dok je njihov adiktivni potencijal pripisan α_1 GABA_A receptorima (Tan i sar., 2010).



Slika 6. Distribucija podtipova GABA_A receptora osetljivih na benzodiazepine i njihova uloga u posredovanju različitih bihevioralnih efekata (Rudolph i Knoflach, 2011).

1.5. RAZVOJ NOVOSINTETISANIH SUPSTANCI ZA BENZODIAZEPINSKO MESTO VEZIVANJA

Hiljade novosintetisanih supstanci prolaze kroz različite faze pretkliničkih i kliničkih ispitivanja, ali samo mali broj na kraju tog puta (eng. *pipeline*) dobije status leka. Uspesni lekovi–kandidati moraju ispuniti kriterijume afiniteta, efikasnosti i selektivnosti za odgovarajuće receptore. Takođe, moraju posedovati određeni stepen bioraspoloživosti (za oralne preparate) i terapijske efikasnosti, uz zadovoljavajući

bezbednosni profil. S druge strane, problemi kao što su prolazak leka kroz krvno–moždanu barijeru i sama kompleksnost CNS–a koja otežava pronalazak adekvatnih terapijskih meta, produžavaju istraživanja lekova–kandidata sa 10–12 na 12–16 godina (Pardridge, 2003; Alavijeh i sar., 2005; Hefti, 2008). Bez obzira na ovako ozbiljne prepreke, sinteza supstanci za benzodiazepinsko mesto vezivanja nije izgubila na svojoj aktuelnosti do današnjeg dana (Rudolph i Knoflach, 2011).

Iako se diazepam pokazao kao benzodiazepinski prototip *par excellence*, ubrzo po njegovom uvođenju u kliničku praksu nastavljeno je sa različitim modifikacijama inicijalne strukture hlordiazepoksida, kako bi se pospešile osobine benzodiazepina i eventualno proširio njihov spektar delovanja (López–Muñoz i sar., 2011).

1.5.1. FARMAKOKINETIČKE I FARMAKODINAMSKЕ MODIFIKACIJE

Uvođenje promena u farmakokinetičkim osobinama benzodiazepina pokazalo se kao zahvalan pristup jer su supstance sličnih farmakoloških aktivnosti prilagođene različitim terapijskim indikacijama. Štaviše, upotreba različitih benzodiazepina kao hipnotika, anksiolitika ili miorelaksanata, određena je prevashodno farmakokinetičkim osobinama, kao što su doza, put primene i prisustvo aktivnih metabolita. Prema brzini eliminacije, važnom farmakokinetičkom parametru, benzodiazepini su podeljeni u tri grupe: kratko–delujući (midazolam i triazolam), srednje–delujući (alprazolam, flunitrazepam, klonazepam, lorazepam, nitrazepam i temazepam) i dugo–delujući (diazepam, hloragepat, hlordiazepoksid i flurazepam). Skraćanjem delovanja postignut je značajan uspeh u terapiji nesanice, jer je na taj način izbegnut osećaj jutarnje pospanosti i omogućeno upravljanje vozilom (Willumeit i sar., 1984; Mendelson, 1992). Međutim, ovakvim tipom modifikacija nisu se mogli rešiti problemi kao što su pospanost, kognitivna oštećenja i gubitak koordinacije, naročito kod starijih osoba.

S obzirom da farmakokinetičke modifikacije nisu dovele do značajnijeg razdvajanja željenih od neželjenih efekata benzodiazepina, sintetisan je veliki broj supstanci različitih farmakoloških profila. Pre otprilike 20 godina, pojavio se koncept sa pretpostavkom da bi benzodiazepini sa nižom efikasnošću na GABA_A receptorima mogli sačuvati koristan anksiolitički efekat klasičnih benzodiazepina, ali bez pratećih neželjenih efekata (Whiting, 2006). Farmaceutski proizvođač Hoffmann La Roche,

inače pionir na polju sinteze molekula benzodiazepinske strukture, razvio je bretazenil, imidazobenzodiazepin koji ne pokazuje *in vitro* selektivnost za pojedine podtipove GABA_A receptora (Haefely, 1984; Martin i sar., 1988; Griebel, 1999). Iako parcijalni agonist ovih receptora, bretazenil se pokazao kao potentan anksiolitik i antikonvulziv, što je jasno dokazano povećanjem odgovora u testovima kažnjavanja prilikom pojenja i hranjenja, povećanog vremena na otvorenim kracima uzdignutog plus-lavirinta, kao i kroz povećanje latencije do pojave epileptičnih napada izazvanih zvukom, pentilentetrazolom ili izonijazidom (Facklam i sar., 1992; Jones i sar., 1994; Martin i sar., 1993; Griebel, 1999). Štaviše, doze neophodne za postizanje anterogradne amnezije, hipolokomocije u testovima aktivnosti, ataksije na rotarodu i relaksacije na testu jačine stiska bile su skoro 10 000 puta veće od onih neophodnih za anksiolitičko i antikonvulzivno dejstvo (Facklam i sar., 1992; Griebel, 1999; Martin i sar., 1993). Iako se anksiolitički efekat bretazenila mogao primetiti i u ispitivanjima na ljudima (Haefely i sar., 1990), kliničke studije su prekinute već u prvoj fazi jer se sedativni efekat bretazenila već pri nižim dozama mogao porediti sa efektima kombinacije diazepama i etanola; ovaj efekat bretazenila bio je toliko izražen da su pojedini ispitanici zaspali prilikom izvođenja rutinskih testova (van Steveninck i sar., 1996).

Dalja istraživanja na polju neselektivnih parcijalnih agonista benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora dovela su do sinteze imidazenila, supstance sa 30–50% nižom efikasnošću od diazepama (Giusti i sar., 1993). Imidazenil ima izražen antikonfliktni profil u testu sa žednim pacovima (Auta i sar., 2010), a 10 puta je potentniji od bretazenila i 100 puta od diazepama u antagonizovanju epileptičnih napada izazvanih bikukulinom ili pentilentetrazolom (Giusti i sar., 1993). Za razliku od diazepama, ovaj parcijalni agonist se odlikuje odsustvom sedacije i ataksije, ali i razvoja tolerancije i zavisnosti (Giusti i sar., 1993; Auta i sar., 1994). Štaviše, u kombinaciji sa diazepamom, imidazenil je antagonizovao sedativne efekte diazepama i ponašao se poput flumazenila. Iako je imidazenil potentniji od bretazenila i praktično bez ikakvog potencijala za izazivanje sedacije u prekliničkim modelima, studije na ljudima bile su bez očekivanih rezultata, ali su skorija istraživanja na polju trovanja organofosfatima oživela interesovanje za imidazenilom kao potencijalnim antidotom (Kadriu i sar., 2011; Wang i sar., 2012). Značajno je spomenuti da imidazenil ima smanjenu efikasnost na α_1 GABA_A receptorima u odnosu na diazepam (Guidotti i sar., 2005), što može biti

jedan od razloga ovako povoljnog farmakološkog profila, ali je i ukazalo na nove mogućnosti u potrazi za kandidatom idealnih osobina.

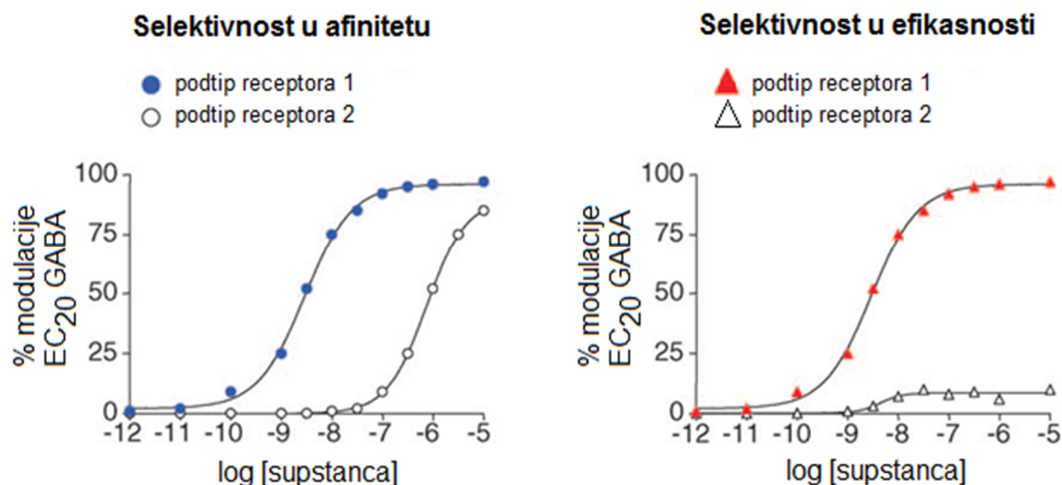
Kao u slučaju bretazenila i imidazenila, pretklinička ispitivanja ocinaplona (DOV 273,547), supstance pirazolopirimidinske strukture, pokazala su značajno razdvajanje anksiolitičkog od sedativnog efekta (Lippa i sar., 2005). Ipak, za razliku od pomenutih supstanci, ovaj povoljan profil ocinaplona zapažen je i u kliničkim studijama u kojima je ukupno testirano oko 200 pacijenata (Czobor i sar., 2010). Ono što dodatno izdvaja ovu supstancu jeste nedostatak *in vitro* selektivnosti za pojedine podtipove GABA_A receptora (Lippa i sar., 2005), podatak koji nije jednostavno povezati sa rezultatima studija sa genetski izmenjenim životinjama, ali koji ukazuje da je moguće postići razdvajanje željenih od neželjenih efekata i u kliničkim uslovima. Nažalost, nije nastavljeno sa sledećom fazom kliničkih studija zbog hepatotoksičnosti ocinaplona, koja je primećena tokom rane faze studija.

Ideja razvoja parcijalnih agonista više nije bila toliko privlačna onog trenutka kada se došlo do zaključka da GABA_A receptor ima više mogućih podtipova. Usled toga se interesovanje za razvoj novih lekova usmerilo ka selektivnim pozitivnim modulatorima pojedinih podtipova GABA_A receptora (Möhler i sar., 2002).

1.5.2. RAZVOJ SUPSTANCI SELEKTIVNIH ZA POJEDINE PODTIPOVE GABA_A RECEPTORA

Razvoj novih lekova koji bi mogli delovati kao anksiolitici, ali bez pratećeg sedativnog dejstva (anksioselektivni anksiolitici) dugo godina nije bio plodonosan jer se nije dokazalo mogu li se ova dva efekta farmakološki razdvojiti. Međutim, nakon značajnih pronalazaka sa genetski izmenjenim miševima (pogledati poglavlje 1.4.) brojne supstance su detaljno ispitane u pretkliničkim studijama u svrhu postizanja ovog terapijskog cilja. Kako je već naglašeno, ovaj cilj bi se mogao postići sintezom supstanci sa smanjenom selektivnošću za α_{1-} , odnosno većim razdvajanjem u aktivnosti na ovom podtipu u odnosu na α_{2-} i α_{3} GABA_A receptore. Važno je spomenuti da se selektivnost teorijski može posmatrati kroz afinitet i efikasnost na pojedinim podtipovima ispitivanih receptora (Slika 7). S obzirom da sinteza supstanci selektivnih u afinitetu za pojedine podtipove GABA_A receptora nije dovela do željenih rezultata,

istraživački napori rezultovali su sintezom velikog broja supstanci sa određenom funkcionalnom selektivnošću (selektivnost u efikasnosti). U tom trenutku kao lider u sintezi novih molekula sa ovakvim farmakološkim profilom promovisan je jedan drugi farmaceutski proizvođač—Merck Sharp & Dohme (MSD).



Slika 7. Grafici supstanci koje se razlikuju po selektivnosti u afinitetu ili efikasnosti na dva podtipa jednog receptora. Na levom grafiku prikazana je supstanca koja ima više od 200 puta veći afinitet za prvi podtip receptora. Druga supstanca (desni grafik) ima komparabilan afinitet za oba podtipa, ali niži procenat modulacije kontrolne struje pri EC₂₀ GABA–e, odnosno nižu efikasnost na drugom podtipu receptora (Whiting, 2006).

Jedna od prototipnih supstanci jeste L–838,417 (parcijalni agonist GABA_A receptora koji sadrže α_2 , α_3 i α_5 podjedinicu i antagonist α_1 GABA_A receptora), čijom primenom je postignut anksiolitički efekat bez prateće sedacije u pacova (McKernan i sar., 2000) i primata (Rowlett i sar., 2005a). Iako se ovaj ligand odlikuje naizgled idealnim farmakološkim karakteristikama, dalja ispitivanja su prekinuta zbog njegovog nepovoljnog farmakokinetičkog profila (Scott–Stevens i sar., 2005).

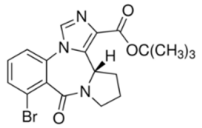
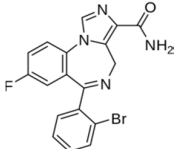
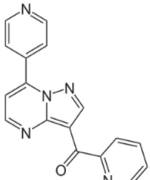
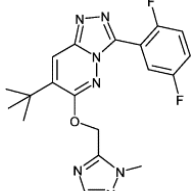
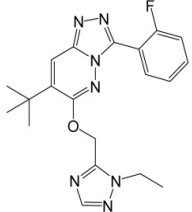
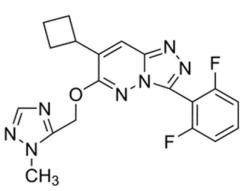
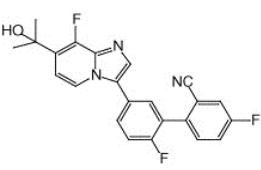
Selektivni agonist α_2/α_3 – i antagonist α_1/α_5 GABA_A receptora—TPA023 (MK–0777), takođe je pokazao znatan anksiolitički, ali ne i sedativni potencijal u glodara, a ispitan je i u pacijenata sa generalizovanim anksioznim poremećajem u tri različite kliničke studije faze II (Atack i sar., 2006). Rezultati ovih studija pokazali su značajno smanjenje na HAM–A skali (eng. *Hamilton Anxiety Rating Scale*—zlatni standard za procenu anksioznosti u kliničkim studijama), a TPA023 nije pokazivao znake sedacije

ni pri okupiranosti receptora većoj od 50% (Atack, 2010). Kliničke studije su, nažalost, prekinute zbog pojave katarakte kod ispitanika, koja se mogla povezati sa produženom terapijom ovom supstancom (Möhler, 2011). Ipak, hipoteza da supstance selektivne za α_2/α_3 GABA_A receptore mogu izazvati relativno izolovan anksiolitički efekat dobila je snažnu potvrdu.

Supstanca slične hemijske strukture—MRK-409 (MK-0343), koja ima nešto veću efikasnost na α_3 GABA_A receptorima, pokazala je anksioselektivni profil u pacova i primata, ali nažalost i sedaciju u ljudi, i to pri relativno niskim nivoima okupiranosti receptora (nižim od 10%) (Atack, 2010). Kako ovaj ligand, u odnosu na hlordiazepoksid, dovodi do potencijacije α_1 GABA_A receptora od 18% (Atack, 2010), čini se da se čak i niski nivoi aktivacije ovog podtipa receptora mogu povezati sa ispoljavanjem sedativnog efekta pozitivnih modulatora benzodiazepinskog mesta vezivanja.

Iako su eksperimenti sa mutiranim miševima pokazali da α_3 podjedinica nije od suštinskog značaja za anksiolitičko dejstvo (pogledati 1.4.), eksperimentalna supstanca TP003, za koju je poznato da ima određenu *in vitro* funkcionalnu selektivnost za GABA_A receptore koji sadrže ovu podjedinicu, u uzdignutom plus-lavirintu pokazala je anksiolitički potencijal u pacova (Dias i sar., 2005), ali i u testu konflikta u majmuna (Fischer i sar., 2011). Kako je anksiolitički efekat TP003 bio izražen tek pri visokim okupiranostima receptora od 75% (Dias i sar., 2005), dok klasični benzodiazepini, poput diazepama, ispoljavaju ovaj efekat pri relativno niskim nivoima okupiranosti (oko 20%) (Facklam i sar., 1992), ipak se čini da α_2 GABA_A receptori igraju najvažniju ulogu u posredovanju anksiolitičkog efekta.

Tabela 1. Izabrani ligandi benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora koji su ispitani u pretkliničkim studijama. Prilagođeno prema Möhler, 2011.

Supstanca	Hemijska struktura	Osnovna farmakološka aktivnost	Interakcija sa rekombinantnim GABA _A receptorima	Referenca
Bretazenil		anksiolitik	komparabilan afinitet za α_1 , α_2 , α_3 i α_5 podtip; parcijalni agonist	Martin i sar., 1988; Knoflach i sar., 1998
Imidazenil		anksiolitik	komparabilan afinitet za α_1 , α_2 , α_3 i α_5 podtip; parcijalni agonist	Giusti i sar., 1993
Ocinaplone		anksiolitik	komparabilan afinitet za α_1 , α_2 , α_3 i α_5 podtip; parcijalni agonist α_2 , α_3 i α_5 i skoro pun agonist α_1 podtipa	Lippa i sar., 2005
L-838417		anksiolitik	komparabilan afinitet za α_1 , α_2 , α_3 i α_5 podtip; parcijalni agonist α_2 , α_3 i α_5 (ali ne i α_1) podtipa	McKernan i sar., 2000
TPA023		anksiolitik	komparabilan afinitet za α_1 , α_2 , α_3 i α_5 podtip; parcijalni agonist α_2 i α_3 , ali bez efikasnosti na α_1 i α_5 podtipu	Atack i sar., 2006
MRK-409		anksiolitik	visok, ali komparabilan afinitet za α_1 , α_2 , α_3 i α_5 podtip; parcijalni agonist sa funkcionalnom selektivnošću za α_2 i α_3 podtip	Atack i sar., 2011
TP003		anksiolitik	komparabilan afinitet za α_1 , α_2 , α_3 i α_5 podtip; parcijalni agonist sa funkcionalnom selektivnošću za α_3 podtip	Dias i sar., 2005

1.5.2.1. LIGANDI BENZODIAZEPINSKOG MESTA VEZIVANJA SINTETISANI U LABORATORIJU PROF. COOK–A

U potrazi za što selektivnijim ligandima, pored farmaceutskih proizvođača, važnu ulogu imaju i istraživački instituti pri akademskim ustanovama, od kojih je grupa sa univerziteta u Viskonsinu (*University of Wisconsin—Milwaukee*, SAD) čiji je lider prof. James M. Cook, jedna od najaktivnijih. Ova grupa je sintetisala i patentirala brojne supstance čiji *in vitro* profili ukazuju, u manjoj ili većoj meri, na selektivnost za pojedine podtipove GABA_A receptore (Rowlett i sar., 2005b; Yin i sar., 2010; Di Lio i sar., 2011).

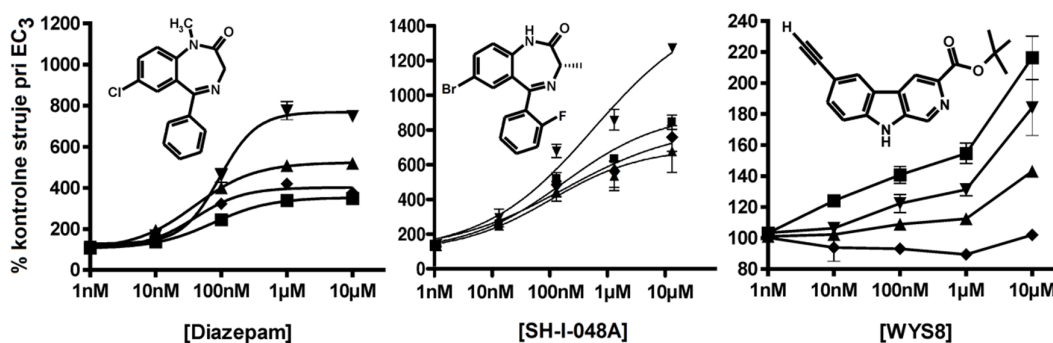
U Tabeli 2 dati su afiniteti na $\alpha_{1-6}\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptorima izabranih supstanci koje su sintetisane u pomenutoj laboratoriji, a na Slikama 8 i 9 prikazani su njihovi profili efikasnosti na GABA_A receptorima osetljivim na benzodiazepine, dok su bihejvioralna ispitivanja na pacovima urađena u našoj laboratoriji. Diazepam, kao reprezentativni benzodiazepin, ovde je predstavljen samo radi poređenja. Afiniteti su dobijeni u *in vitro* uslovima, istiskivanjem ispitivane supstance primenom radioobeležnog liganda (³H] flunitrazepam) u laboratoriji prof. Bryan L. Roth–a (*University of North Carolina at Chapel Hill*, SAD)

Tabela 2. Afiniteti ispitivanih supstanci za benzodiazepinsko mesto vezivanja humanih rekombinantnih $\alpha_x\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptora, izraženi u nM. Merenja su radena u duplikatu, a vrednosti su prikazane u nM. NO = nije određeno. Preuzeto iz: Savić i sar., 2010; Joksimović i sar., 2013; nepublikovani podaci.

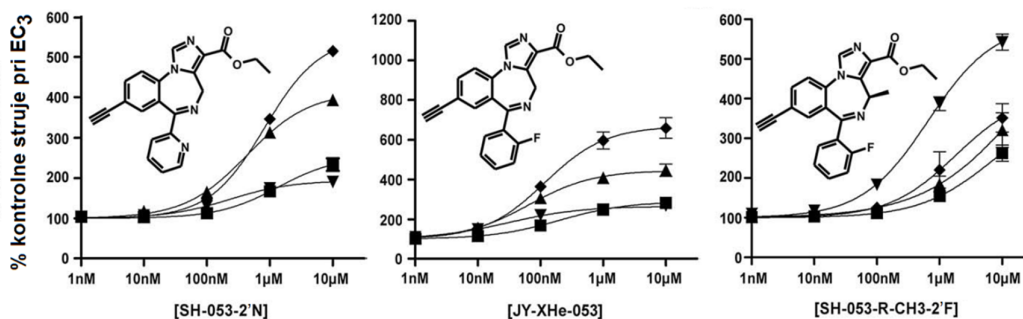
Supstanca	α_1	α_2	α_3	α_4	α_5	α_6
diazepam	14	7,8	13,9	NO	13,4	NO
SH–I–048A	0,77	0,17	0,38	NO	0,11	NO
WYS8	0,972	111	102	2000	208	1980
SH–053–2’N	300	160	527	NO	82	5000
SH–053–2’N ^a	118	148	365	5000	77	5000
JY–XHe–053	22	12,3	34,9	NO	0,7	NO
SH–053–R–CH ₃ –2’F	759,1	948,2	768.8	NO	95,2	NO

^aDrugi nezavisni set eksperimenata sa SH–053–2’N

U legendama slika date su i vrednosti potencijacije pojedinih podtipova receptora pri reprezentativnoj koncentraciji od 100 nM ispitivanih supstanci. Ovi *in vitro* eksperimenti urađeni su u saradničkoj laboratoriji prof. Werner Sieghart-a (*Center for Brain Research, Medical University Vienna, Austrija*) na GABA_A receptorima pacova dobijenim rekombinantnom tehnologijom i eksprimiranim na žabljim oocitima (*Xenopus laevis*).



Slika 8. Krive efikasnosti za diazepam, SH-I-048A i WYS8 na α₁β₃γ₂ (■), α₂β₃γ₂ (▲), α₃β₃γ₂ (▼) i α₅β₃γ₂ (◆) podtipu GABA_A receptora, pri EC₃ GABA. Vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu ± standardna greška na 3–6 oocita iz najmanje 2 serije. Koncentracija od 100 nM diazepam dovela je do potencijacije od 246 ± 10%, 400 ± 22%, 461 ± 34% i 322 ± 7% kontrolne struje na α₁β₃γ₂, α₂β₃γ₂, α₃β₃γ₂ i α₅β₃γ₂ GABA_A receptorima, redom. Ista koncentracija SH-I-048A rezultovala je sa 518 ± 1%, 446 ± 56%, 680 ± 38% i 485 ± 70%, a WYS8 sa 141 ± 5%, 109 ± 2%, 126 ± 7% i bez značajnih promena kontrolne struje na α₁β₃γ₂, α₂β₃γ₂, α₃β₃γ₂ i α₅β₃γ₂ GABA_A receptorima, redom. Sve date vrednosti značajno su različite od kontrolne struje (p<0,05, Student-ov t-test). Preuzeto iz: Savić i sar., 2010; Joksimović i sar., 2013; nepublikovani podaci.

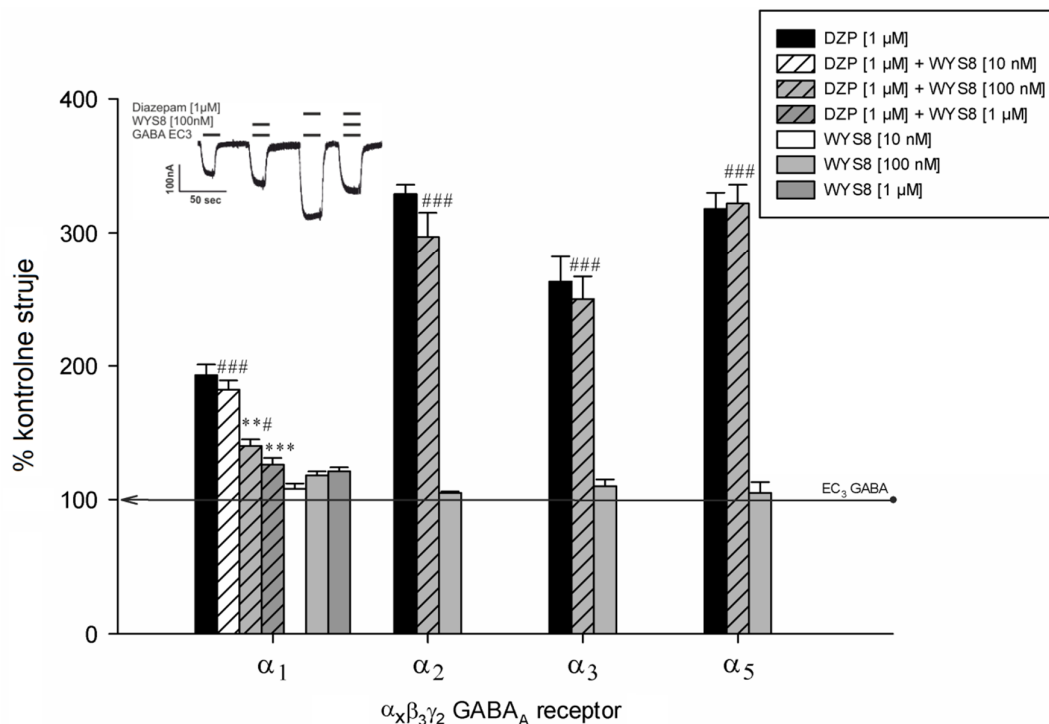


Slika 9. Krive efikasnosti za SH-053-2'N, JY-XHe-053 i SH-053-R-CH3-2'F na α₁β₃γ₂ (■), α₂β₃γ₂ (▲), α₃β₃γ₂ (▼) i α₅β₃γ₂ (◆) podtipu GABA_A receptora, pri EC₃ GABA. Vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu ± standardna greška na 3–6

oocita iz najmanje 2 serije. Koncentracija od 100 nM SH-053-2'N dovela je do potencijacije od $113 \pm 2\%$, $165 \pm 2\%$, $149 \pm 3\%$ i $130 \pm 3\%$ kontrolne struje na $\alpha_1\beta_3\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ i $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptorima, redom. Ista koncentracija JY-XHe-053 rezultovala je sa $169 \pm 10\%$, $307 \pm 14\%$, $345 \pm 26\%$ i $220 \pm 2\%$ a SH-053-R-CH3-2'F sa $111 \pm 2\%$, $124 \pm 9\%$, $125 \pm 8\%$, i $183 \pm 7\%$ kontrolne struje na $\alpha_1\beta_3\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ i $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptorima, redom. Sve date vrednosti značajno su različite od kontrolne struje ($p < 0,05$, Student-ov t-test). Preuzeto iz Savić i sar., 2010.

Kao primer na koji način *in vitro* elektrofiziološke studije mogu biti komplementarne farmakološkim ispitivanjima na eksperimentalnim životinjama, na Slici 10 prikazan je antagonistički potencijal novosintetisanog liganda WYS8, u kombinaciji sa diazepamom, na rekombinantnim GABA_A receptorima osetljivim na benzodiazepine. Ovaj ligand ima veću selektivnost u afinitetu za α_1 GABA_A receptore od svih supstanci publikovanih do danas (Yin i sar., 2010), što je i potvrđeno prikazanim eksperimentom, jer su antagonizovani isključivo oni efekti diazepama koji su posredovani ovom populacijom receptora (Joksimović i sar., u štampi). Bihevioralni efekti ove kombinacije supstanci detaljno su opisani u nastavku disertacije.

Ispitivanja koja uključuju *in vitro* elektrofiziološka merenja i bihevioralnu karakterizaciju supstanci selektivnih za pojedine podtipove receptora, kao i određivanje njihove koncentracije u biološkom materijalu, predstavljaju osnovne elemente pretkliničkih ispitivanja potencijalnih lekova na polju psihofarmakologije. Ovako sveobuhvatan pristup čini se neophodnim kako bi se, u svetlu ispitivanja na genetski modifikovanim životinjama, razotkrili suptilni odnosi između modulacije pojedinih podtipova benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora i različitih efekata njegovih liganada.



Slika 10. Stubičasti dijagram predstavlja efekte diazepama (DZP; 1 μ M), WYS8 (10 nM, 100 nM, 1 μ M) i njihovih kombinacija na $\alpha_x\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptorima, pri EC₃ GABA (aritmetička sredina + standardna greška iz najmanje tri oocita). Koncentracija od 1 μ M diazepama dovela je do potencijacije od 193 ± 8%, 329 ± 7%, 263 ± 19% i 318 ± 12% kontrolne struje na α_1 -, α_2 -, α_3 - i $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptorima, redom. Testirana koncentracija WYS8 (100 nM) dostigla je statističku značajnost samo na α_1 - i $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptorima (118 ± 3% i 110 ± 5%, redom). Kombinacija WYS8 (100 nM) i diazepama (1 μ M) rezultovala je potencijacijom od 140 ± 5%, 297 ± 18%, 250 ± 17% i 322 ± 14% kontrolne struje na α_1 -, α_2 -, α_3 - i $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptorima, redom. Deset puta niža koncentracija WYS8 (10 nM) u kombinaciji sa istom koncentracijom diazepama dovela je do potencijacije od 182 ± 7% kontrolne struje na $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptorima. Na ovoj populaciji receptora, dodatak WYS8 (1 μ M) diazepamu (1 μ M) rezultovao je sa 126 ± 5% kontrolne struje. **p<0,01 i ***p<0,001 u poređenju sa DZP (1 μ M); #p<0,05 i ###p<0,001 u poređenju sa odgovarajućom koncentracijom WYS8. Ubačena slika prikazuje primer elektrofiziološkog ispisa GABA EC₃, WYS8 (100 nM), diazepama (1 μ M) i njihove kombinacije na $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptorima.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

S obzirom da se, na osnovu rezultata studija na transgenim miševima, razvojem novih liganada benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora čini mogućim izbegavanje neželjenih dejstava klasičnih benzodiazepina, sa mogućnošću proširenja njihovog spektra delovanja, cilj ovih istraživanja bio je da se, primenom široko upotrebljavanih testova u oblasti bihejvioralne farmakologije, kao i povezivanjem bihejvioralnih efekata sa dostupnim *in vitro* profilima, utvrdi:

- 1) koncentracija SH-I-048A i WYS8 u plazmi/serumu i moždanom tkivu pacova, i tako pokaže u kojoj meri ovi ligandi nestandardnih *in vitro* profila prolaze krvno-moždanu barijeru;
- 2) mogućnost razdvajanja bihejvioralnih efekata benzodiazepina primenom neselektivnog agoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora (SH-I-048A);
- 3) uticaj parcijalne pozitivne modulacije α_1 GABA_A receptora na ponašanje pacova, primenom veoma selektivnog modulatora ovih receptora (WYS8), samostalno i u kombinaciji sa diazepamom;
- 4) uticaj supstanci sa smanjenim potencijalom aktivacije GABA_A receptora koji sadrže α_1 podjedinicu (SH-053-2'N, JY-XHe-053 i SH-053-R-CH3-2'F) na ponašanje pacova i sagledaju razlike u njihovim bihejvioralnim profilima;
- 5) relativni značaj sva četiri podtipa GABA_A receptora osetljivih na benzodiazepine, sa posebnim osvrtom na α_1 GABA_A receptore, kao najrasprostranjenijeg podtipa, u ispoljavanju efekata ispitivanih supstanci na praćene parametre ponašanja u korišćenim testovima;
- 6) razlike u delovanju neutralnog (β -CCt) i parcijalnog pozitivnog alosternog modulatora α_1 GABA_A receptora (WYS8) na promene praćenih bihejvioralnih parametara izazvanih primenom diazepama;
- 7) razlike u delovanju parcijalnog i punih pozitivnih alosternih modulatora na promene praćenih bihejvioralnih parametara.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. ŽIVOTINJE

Sva bihevioralna ispitivanja, kao i određivanje koncentracije izabranih supstanci u serumu/plazmi i moždanom tkivu, sprovedena su na zdravim albino pacovima *Wistar* soja, muškog pola, starosti 7–9 nedelja, telesne mase 200–250 g, odgajanim na farmi Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Pacovi su držani u standardnim kavezima od pleksiglasa (42 cm × 26,5 cm × 18 cm), u grupi po četiri do šest životinja u kavezu, smeštenih u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta, na konstantnoj temperaturi od 21±1 °C i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (osvetljenje od 6 h do 18 h, intenzitet svetla 120 lx). Uzimanje hrane (Veterinarski institut, Zemun) i česemske vode bilo je *ad libitum*. Negovanje životinja i bihevioralna testiranja sprovedeni su tokom svetle faze ciklusa.

3.2. SUPSTANCE

U eksperimentima su korišćene sledeće supstance:

Supstanca	Hemijski naziv i <i>in vitro</i> profil	Izvor/Referenca
diazepam (DZP)	7-hlor-1-metil-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepin-2(1H)-on (standardni neselektivni benzodiazepin)	Galenika (Beograd)/ Savić i sar., 2009
SH-I-048A	(S,E)-7-bromo-5-(2-fluorofenil)-3-metil-1Hbenzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-on (neselektivni agonist visokog afiniteta i efikasnosti)	University of Wisconsin-Milwaukee
WYS8	8-etinil-β-karbolin-3-karboksilat-t-butil estar (parcijalni agonist visoko selektivan za α ₁ GABA _A receptore)	University of Wisconsin-Milwaukee/ Yin i sar., 2010
SH-053-2’N	etil estar 8-etinil-6-(2’-piridin)-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]jazulen-3-karboksilne kiseline (agonist selektivan za α ₂ i α ₃ GABA _A receptore)	University of Wisconsin-Milwaukee/ Savić i sar., 2010
JY-XHe-053	etil estar 8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]jazulen-3-karboksilne kiseline (agonist selektivan za α ₂ i α ₃ GABA _A receptore)	University of Wisconsin-Milwaukee/ Savić i sar., 2010
SH-053-R-CH3-2’F	etil estar (R) stereoisomera 8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]jazulen-3-karboksilne kiseline (agonist selektivan za α ₅ GABA _A receptore)	University of Wisconsin-Milwaukee/ Savić i sar., 2010
β-CCt	t-butil-β-karbolin-3-karboksilat (antagonist selektivan za α ₁ GABA _A receptore)	University of Wisconsin-Milwaukee/ Savić i sar., 2009
pentilentetrazol (PTZ)	6,7,8,9-tetrahidro-5H-tetrazolo[1,5-a]azepin (prokonvulzivni agens)	Sigma Aldrich/ Löscher i sar., 2011
vehikulum	85% destilovana voda, 14% propilen glikol i 1% Tween 80	Savić i sar., 2004

Sve supstance korišćene za *in vivo*, kao i za *ex vivo* ispitivanja, rastvarane/suspendovane su uz upotrebu ultrazvučnog kupatila, u navedenom vehikulumu, osim PTZ-a koji je

rastvoren u fiziološkom rastvoru. Aktivne supstance, kao i rastvarači u kontrolnim grupama (fiziološki rastvor, vehikulum), primenjivane su intraperitonealno (i.p.), u zapremini od 1 ml/kg telesne mase eksperimentalne životinje, 20 min pre bihevioralnog testiranja, odnosno u odgovarajućem trenutku pre žrtvovanja za određivanje koncentracije u uzorcima seruma/plazme i moždanog tkiva. Sve doze su izražavane kao bazni oblici supstanci. Ukoliko su eksperimenti podrazumevali primenu dve supstance, one su aplikovane na dva različita mesta ubrizgavanja, a svaka životinja je primala ukupnu zapreminu od 2 ml/kg ispitivanih supstanci ili odgovarajućih rastvarača.

U istraživanju je korišćen „međugrupni” dizajn (eng. *between-subject design*), odnosno, različiti tretmani su primenjivani na različitim, nezavisnim grupama životinja. Odabrani broj životinja u grupi u bihevioralnim testovima (6–8 po pojedinačnom tretmanu) prilagođen je povećanoj varijabilnosti rezultata svojstvenoj ovom dizajnu (Kelley, 1993) i predstavlja minimalan broj životinja neophodnih za detektovanje biološki relevantnih efekata i postizanje cilja istraživanja, što smanjuje potrebu za ponavljanjem rezultata eksperimenata (Festing i Altman, 2002).

Opis i broj sprovedenih eksperimenata dat je u svakom od poglavlja koja slede. U svakom eksperimentu korišćena je negativna kontrola (vehikulum), a u pojedinim i standardni neselektivni benzodiazepin—diazepam, kao pozitivna kontrola.

3.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IZABRANIH SUPSTANCI U SERUMU/PLAZMI I MOZGU PACOVA

Kako bi olakšali povezivanje *in vitro* i *in vivo* podataka i da bi utvrdili u kojoj meri pojedini ligandi prolaze krvno–moždanu barijeru, u serumu/plazmi i moždanom tkivu određivali smo koncentraciju dva nova liganda, nestandardnih *in vitro* profila – WYS8 i SH–I–048A, i diazepama, kao tipičnog predstavnika benzodiazepina.

U prvom eksperimentu, pacovi su primali SH–I–048A u dozi od 2, 5 i 10 mg/kg i diazepam (2 mg/kg). U drugom eksperimentu, 24 pacova su podeljena u 6 grupa koje su zatim primale vehikulum (SOL), WYS8 (10 mg/kg) i/ili diazepam (2 mg/kg) jednom dnevno tokom četiri dana, na način prikazan u Tabeli 1. Žrtvovanje pacova za određivanje koncentracija WYS8 i diazepama u biološkom materijalu vršeno je 20 min, a u prvom eksperimentu 20 i 60 min, nakon poslednje injekcije.

Nakon dekapitacije, uzorci krvi su skupljani iz karotidne arterije, zatim centrifugirani na $5000\times g$ 15 min, a supernatant (serum/plazma) je zatim analiziran HPLC metodom. Mozgovi su takođe odmah izvađeni, očišćeni pincetom i isprani fiziološkim rastvorom, odmereni (prosečna masa: 1,53 g) u epruveti, i na kraju homogenizovani u 2 ml metanola rotor–stator blenderom (*T 25 digital Ultra–Turrax*, IKA, Nemačka) na 16000 rpm tokom 2 min. Zatim je homogenat dopunjen do 5 ml metanolom, centrifugiran ($9000\times g$, 15 min) i na kraju analiziran LC–MS analitičkom metodom.

Tabela 3. Raspored primene različitih tretmana prilikom određivanja koncentracije WYS8 i diazepama (DZP) u serumu i mozgu pacova.

tretman	3 dana	SOL	WYS8	SOL	WYS8 + DZP	SOL	DZP
	4. dan	WYS8	WYS8	WYS8 + DZP	WYS8 + DZP	DZP	DZP

Koncentracije odabranih supstanci u serumu i moždanom tkivu određivane su pomoću Waters Alliance 2695, Mass Lynx, Waters ZQ 2000 kvadrapolnog analizatora koji koristi jonizaciju u elektrospreju (eng. *the electrospray ionization interface*, ESI–MS; Waters, Milford, MA, USA), a podaci su dobijeni praćenjem izabranog jona (eng. *selected ion monitoring—SIM*) jonske mase m/z 237 i skeniranjem opsega jonskih masa m/z 100–400 (eng. *full–scan ESI+ mode*). Limiti kvantifikacije u oba eksperimenta bili su 1 $\mu\text{g/l}$ (uzorci seruma/plazme) i 10 $\mu\text{g/l}$ (uzorci moždanog tkiva). Za predpripremu uzoraka korišćena je tečno–čvrsta ekstrakcija (eng. *solid–phase extraction—SPE*) uz pomoć Oasis[®] HLB kertridža (Waters, Milford, MA, USA), prethodno kondicioniranih metanolom i destilovanom vodom. Kao uzorci su nanošeni zakišeljani serum/plazma ili razblaženi zakišeljani supernatant homogenata mozga, a kertridži su ispirani sa 1 ml 5% metanola. Kertridži su zatim sušeni pod vakuumom, a supstance od interesa su eluirane sa 1 ml metanola. Nakon evaporacije ostaci su rekonstituisani u 1 ml mobilne faze, koja se sastojala od smeše: 5 mM amonijum formijat (pH 3,5): acetonitril sa 0,1% mravlje kiseline = 45% : 55% izokratski uslovi; i onda injektovani u LC sistem. Za separaciju jedinjenja korišćena je kolona XTerra RP18 (Waters, Milford, MA, USA). Žrtvovanje i uzimanje uzoraka obavljeno je u namenskim prostorijama vivarijuma Farmaceutskog fakulteta, dok je analitička obrada uzoraka urađena u saradnji sa Katedrom za

farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Eksperiment 1), odnosno Nacionalnim centrom za kontrolu trovanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu (Eksperiment 2).

3.4. BIHEJVIORALNI TESTOVI

U cilju bihejvioralne karakterizacije novosintetisanih supstanci koristili su se sledeći testovi: test spontane lokomotorne aktivnosti, uzdignuti plus-lavirint, Morisov vodeni lavirint, rotarod, test jačine stiska i pentilentetrazolski test. Sva testiranja su sprovedena tokom svetle faze ciklusa sa početkom u 9 h. Celokupno ponašanje životinje u *in vivo* testovima, izuzev rotaroda, testa jačine stiska i pentilentetrazolskog testa, praćeno je digitalnom kamerom povezanom sa *ANY-maze* softverom (Stoelting Co., Wood Dale, IL, SAD) koji omogućava izračunavanje odabranih parametara (varijabli) (Savić i sar., 2008, 2009). Svi *in vivo* eksperimenti sprovedeni su u namenskim prostorijama vivarijuma Farmaceutskog fakulteta.

3.4.1. TEST SPONTANE LOKOMOTORNE AKTIVNOSTI

Ispitivanje opšte motorne i lokomotorne aktivnosti glodara predstavlja jedan od fundamentalnih pristupa prilikom testiranja psihofarmaka (Geyer, 1990). Sam termin „spontana lokomotorna aktivnost” ukazuje da se radi o grupi neuslovljenih, odnosno etoloških testova u kojima nema eksplicitnih uslovljavanja i gde se rutinski prate parametri kretanja, propinjanje, timarenje, grickanje i dr. Mnoge psihotropne supstance se definišu kao stimulansi ili depresivi dominantno na bazi njihovog opšteg uticaja na lokomotornu aktivnost u glodara. Smanjenje aktivnosti u ovom testu može se povezati sa sedativnim efektom koji se javlja nakon primene pojedinih psihotropnih supstanci, npr. benzodiazepina.

Dvadeset minuta nakon primene odgovarajućeg tretmana pacovi su stavljeni u centar polu-prozirnog kaveza od Pleksiglasa veličine 40 cm × 25 cm × 35 cm, koji je smešten u sobu sa prigušenim crvenim svetlom (20 lx). Tokom perioda od 30 ili 45 min, bez prethodne habituacije, praćena je njihova aktivnost uz pomoć *ANY-maze* softvera, koji je povezan sa kamerom postavljenom direktno iznad kaveza. Nakon svake životinje

kavez je čišćen razblaženim rastvorom etanola i papirnom vatom. Za praćenje sedativnog efekta u ovom testu korišćeni su sledeći parametri: ukupni pređeni put i vreme provedeno u imobilnosti (tokom čitavog praćenja testa i tokom petominutnih intervala).

U pojedinim eksperimentima, a u cilju poboljšanja analize procenom eventualnog uticaja supstanci na nivo anksioznosti, definisana je virtuelna centralna zona koja predstavlja 20% čitave površine (200 cm²). Najmanje 70% površine životinje moralo je biti u zoni kako bi softver registrovao ulazak u zonu, dok je 50% moralo da ostane u zoni da se ne bi registrovao izlazak.

U testu spontane lokomotorne aktivnosti sprovedeno je ukupno pet eksperimenata:

- **Eksperiment 1:** Procena efekata rastućih doza SH-I-048A (2, 5 i 10 mg/kg);
- **Eksperiment 2:** Procena efekata WYS8 (0,2, 1 i 10 mg/kg), diazepama (2 mg/kg) i njihovih kombinacija;
- **Eksperiment 3:** Procena uticaja SH-053-2'N (30 mg/kg) i diazepama (1,25 i 2,5 mg/kg);
- **Eksperiment 4:** Procena uticaja rastućih doza JY-XHe-053 (2,5, 5, 10, 20 i 40 mg/kg);
- **Eksperiment 5:** Procena uticaja SH-053-R-CH3-2'F (10, 20 i 30 mg/kg) i diazepama (2 mg/kg).

3.4.2. UZDIGNUTI PLUS-LAVIRINT

Uzdignuti plus-lavirint (eng. *elevated plus-maze*), uveden 1984. godine (Hiley i Mithani, 1984), predstavlja jedan od najkorišćenijih bihejvioralnih modela anksioznosti (Hogg, 1996; Rodgers i Dalvi, 1997; Wall i Messier, 2001), čija se popularnost među testovima za procenu anksiolitičkog dejstva i danas ne smanjuje (Haller i Alicki, 2012). Važno je spomenuti da je ovaj model prvobitno validiran za primenu kod pacova Wistar soja (Pellow i sar., 1985).

Poput testa spontane lokomotorne aktivnosti i ovaj test predstavlja odličan primer modela zasnovanog na ispitivanju neuslovljenog, ili spontanog ponašanja životinje (Rodgers i Dalvi, 1997). U osnovi ovog tipa ponašanja se nalazi biološki fenomen eksploracije—istraživanja, kao bihejvioralne aktivnosti podstaknute

nepoznatom okolinom. Ukoliko nepoznata okolina sadrži kontrast (npr. otvoreni/zatvoreni prostor), aktivira se drugi bazični biološki proces: razdvajanje privlačnih i odbojnih delova nepoznatog prostora. U takvoj situaciji, životinja je suočena sa konfliktom: istraživati sve dostupne delove prostora da bi se pronašao izlaz, ili izbegavati odbojne delove nepoznatog prostora (Belzung, 1999).

U ovom modelu, iskorišćen je konflikt koji se razvija kod glodara suočenih sa kontrastom otvoren/zatvoren prostor: dva kraka lavirinta su zatvorena bočnim zidovima a naspramno su postavljena dva otvorena kraka. Usled fenomena tigmotaksije („lokomotorni odgovor na kontakt ili dodir”), odnosno urođenog odabira oivičenog prostora, glodari češće ulaze i duže borave u zatvorenim kracima lavirinta (Belzung, 1999). Boravak pacova u otvorenim kracima praćen je hormonskim i bihejvioralnim promenama koje upućuju na povećani nivo anksioznosti: povećanjem koncentracije kortikosterona u plazmi, učestalijim prekidima motorne aktivnosti (eng. *freezing*) i defeciranjima (Pellow i sar., 1985).

U našem istraživanju, korišćen je lavirint izrađen od lima, sa podom pokrivenim crnom gumom. Nosači podižu lavirint na visinu od 50 cm. Po dva otvorena (50 cm dužine \times 10 cm širine) i dva zatvorena kraka (50 cm dužine \times 10 cm širine \times 40 cm visine) su naspramno postavljena, u obliku znaka plus, i povezana centralnim prostorom (10 cm \times 10 cm). Osvetljenje eksperimentalne sobe se sastojalo od jedne crvene neonske cevi, koja je na površini krakova davala intenzitet svetla od 10 lx.

Na početku eksperimenta, pacov je postavljan u centralni prostor, okrenut prema jednom od zatvorenih krakova. Ponašanje životinje je praćeno ANY–maze softverom tokom 5 min. Najmanje 80% životinje je moralo biti u zoni kako bi softver registrovao ulazak u zonu, dok je 20% moralo da ostane u zoni da se ne bi registrovao izlazak. Nakon svake životinje, lavirint je čišćen vlažnom i suvom papirnom vatom.

U eksperimentu su praćeni standardni prostorno–vremenski parametri: ukupni pređeni put, ukupan broj ulazaka, broj ulazaka u zatvorene krake, pređeni put na otvorenim kracima, procenat ulazaka u otvorene krake i procenat vremena provedenog na otvorenim kracima lavirinta. Podaci o ponašanju na otvorenim kracima su izražavani kao procenat ukupne aktivnosti (npr. vreme u otvorenim kracima/(vreme u otvorenim + zatvorenim kracima)), da bi se izbegao uticaj eksplorativne aktivnosti životinje u centralnoj zoni plus–lavirinta. Faktorska analiza je pokazala da bihejvioralni parametri

praćeni u ovom modelu daju meru dve nezavisne dimenzije („faktora”) ponašanja, jedne koja odražava anksioznost, i druge koja se može povezati sa motornom aktivnošću. Procenat ulazaka u otvorene krake i vremena provedenog na otvorenim kracima su parametri izrazito zavisni od faktora koji se može povezati sa nivoom anksioznosti eksperimentalne životinje, dok se broj ulazaka u zatvorene krake može smatrati relativno čistim indeksom lokomotorne aktivnosti. Ukupan broj ulazaka u krake je povezan sa faktorom lokomotorne aktivnosti, ali takođe, manje izraženo, i sa faktorom koji odražava anksioznost (Cruz i sar., 1994; Rodgers i Johnson, 1995; Fernandes i File, 1996).

U uzdignutom plus-lavirintu sprovedeno je ukupno pet eksperimenata:

- **Eksperiment 1:** Procena efekata rastućih doza SH-I-048A (2, 5 i 10 mg/kg);
- **Eksperiment 2:** Procena efekata WYS8 (0,2, 1 i 10 mg/kg), diazepama (2 mg/kg) i njihovih kombinacija;
- **Eksperiment 3:** Procena uticaja SH-053-2’N (30 mg/kg) i diazepama (1,25 i 2,5 mg/kg);
- **Eksperiment 4:** Procena uticaja rastućih doza JY-XHe-053 (2,5, 5, 10, 20 i 40 mg/kg);
- **Eksperiment 5:** Procena uticaja SH-053-R-CH3-2’F (10, 20 i 30 mg/kg) i diazepama (2 mg/kg).

3.4.3. MORISOV VODENI LAVIRINT

Vodeni lavirint, koji je u bihevioralnu neuronauku prvi uveo Ričard G. Moris (1984), jedan je od najčešće korišćenih modela za procenu uticaja psihotropnih supstanci na prostornu memoriju (D’Hooge i De Deyn, 2001). Iako je veliki broj studija ispitivao učešće različitih regija mozga u posredovanju efekata psihotropnih supstanci u Morisovom vodenom lavirintu, čini se da je uloga hipokampusa od centralnog značaja (Morris i sar., 1986; Poucet i Benhamou, 1997; Brandeis i sar., 1989; Poucet i sar., 2000). S tim u vezi, u vodenom lavirintu je moguće istraživati dve komponente memorije—proceduralnu (implicitnu) i deklarativnu (eksplicitnu), naravno u meri u kojoj se ovi termini mogu primeniti na eksperimente na glodarima (Izquierdo i sar., 1999, 2006). Takođe, brojni autori su neurofarmakološkim metodama ispitivali uticaje

koje promene u nivou neurotransmitera i aktivacija određenih receptora mogu imati na ovaj tip učenja i pamćenja. Kao dobar primer mogu poslužiti eksperimenti sa različitim ligandima benzodiazepinskog mesta vezivanja u vodenom lavirintu koji su značajno pomogli u otkrivanju uloge GABA_B i GABA_A receptora u memorijskim procesima (Brioni i Arolfo, 1992; McNamara i Skelton, 1991, 1997).

Vodeni lavirint u našoj laboratoriji predstavlja crni cilindrični bazen (prečnik: 200 cm, visina: 60 cm) sa jednoličnom unutrašnjom površinom. Bazen je ispunjen vodom (temperatura 23±1 °C) do visine 30 cm. Na ivicama bazena nalaze se oznake za strane sveta (sever, jug, zapad, istok), na osnovu čega je u *ANY-maze* softveru napravljena virtuelna podela na četiri kvadranta i više regija: centralni deo zauzima 10%, središnji prsten (u kome se nalazi platforma i ciljni region) 40% i periferni prsten 50% celokupne površine bazena (Savić i sar., 2009). Ciljna platforma (10 cm × 15 cm) je potopljena 2 cm ispod površine vode, nalazi se u sredini severo-istočnog kvadranta bazena, i iste je boje kao unutrašnjost bazena, što je čini nevidljivom za pacove (Terry, 2001). U okolini bazena nalaze se mnogi orijentiri (vrata, cevi na zidovima i plafonu, uglovi prostorije, kamera postavljena iznad centra lavirinta), za koje se ne može isključiti da su od pomoći životinji prilikom orijentacije u prostoru. Soba je osvetljena belim neonskim lampama koje su postavljene na zid ispod ravni gornjeg ruba bazena čime je obezbeđeno indirektno osvetljenje.

Pacovi su dobijali tretmane 20 min pre eksperimentalnog bloka, svakog dana, u trajanju od pet dana (akviziciona faza). Svaki eksperimentalni blok sastojao se od četiri pokušaja (svaki je trajao najviše 120 s), sa intervalom od 60 s između dva pokušaja. Pacov se postavljao u vodu glavom okrenut prema ivici bazena u jednu od četiri nasumično odabrane pozicije: sever, zapad, severo-zapad i jugo-istok. U slučaju nalaska platforme pacovu se dozvoljavalo da ostane na njoj 10–15 s. Pokušaj je trajao od trenutka puštanja pacova u bazen do nalaženja platforme. Ukoliko pacov ne uspe da pronađe platformu u roku od 120 s, uzima se u ruku i po površini vode dovodi do platforme. U tom slučaju podrazumeva se da je rezultat maksimalan, odnosno 120 s. Da bi se ispitala referentna memorija, 24 h posle poslednjeg, petog dana, vršio se probni test u trajanju od 60 s, u bazenu bez platforme i bez prethodnog tretmana (Vorhees i Williams, 2006). U tom slučaju pacov se puštao sa jugo-zapadne pozicije, najdalje tačke u odnosu na onu gde se platforma nalazila prethodnih dana.

Kod testa sticanja memorije zavisne promenljive izabrane za praćenje bile su: vreme pronalaženja platforme (trenutak od postavljanja životinje u bazen do trenutka nalaženja platforme), ukupan pređeni (preplivani) put i efikasnost puta (odnos najkraće moguće putanje do platforme i stvarnog pređenog puta životinje). Svi pomenuti parametri mogu se, u manjoj ili većoj meri, povezati sa ponašanjem životinje koje se odlikuje kretanjem ka cilju (Vorhees i Williams, 2006). U toku probnog testa, kao parametri praćenja odabrani su latencija do prvog ulaska u zonu u kojoj se nalazila platforma tokom faze učenja, vreme provedeno u ciljnom regionu i pređeni put u perifernom prstenu. Fenomen tigmotakse (težnja životinje da se kreće duž zidova bazena) predstavlja značajan faktor varijabilnosti u izvođenju u Morisovom vodenom lavirintu, koji bi trebalo da se smanjuje tokom trajanja eksperimenta (Vorhees i Williams, 2006). Smanjenje tigmotakse je u vezi sa proceduralnom komponentom stečene memorije, tako da se u toku probnog testa pređeni put u perifernom prstenu može pratiti kao mera proceduralnog učenja, dok se kroz uticaj na latenciju do prvog ulaska u zonu u kojoj se nalazila platforma tokom faze učenja, kao i na vreme provedeno u ciljnom regionu, može pratiti deklarativna memorija.

U vodenom lavirintu sprovedeno je ukupno tri eksperimenta:

- **Eksperiment 1:** Procena efekata rastućih doza SH-I-048A (0,5, 2 i 10 mg/kg);
- **Eksperiment 2:** Procena efekata WYS8 (0,2, 1 i 10 mg/kg), diazepam (2 mg/kg) i β -CCt-a (5 mg/kg), kao i kombinacija novog liganda sa diazepamom, odnosno β -CCt-om;
- **Eksperiment 3:** Procena uticaja SH-053-2'N (30 mg/kg) i SH-053-R-CH3-2'F (30 mg/kg).

3.4.4. ROTAROD

Pre više od pola veka, pokazano je da se stepen relaksacije skeletne muskulature koju prouzrokuju određeni lekovi može proceniti na osnovu kapaciteta miša ili pacova da ostane na pokretnom valjku (Dunham i Miya, 1956). Brojne laboratorije i danas rutinski koriste ovaj test, ali prvenstveno za procenu uticaja psihotropnih lekova na motornu funkciju jer se ataksija tj. gubitak motorne koordinacije može smatrati dobrim prediktorom sedativnog efekta. Ovo je od naročitog značaja za farmakologiju

benzodiazepina zbog njihovog miorelaksantnog i sedativnog efekta koji se nekada teško mogu jasno razdvojiti u pretkliničkim modelima (Martin i sar., 1993).

Oštećenje motorne funkcije može značajno uticati na ispitivanje učenja i pamćenja, eksploracije, motivacije i drugih fenomena, pa je rotarod test od velikog značaja za istraživače iz različitih oblasti (Rustay i sar., 2003). Takođe, s obzirom da je ataksija jedan od osnovnih znakova mnogih neuroloških poremećaja, kao i moguće intoksikacije lekovima i pokazatelj neurotoksičnosti, regulatorni autoriteti su ovaj test svrstali u bihevioralnu bateriju testova za osnovnu procenu bezbednosti novih lekova (EMA, 2000). Na široku primenjivost rotaroda veliki uticaj imaju i drugi činioci: oprema nije skupa i omogućava lako rukovanje, validacija je prilično jednostavna, a test daje konzistentne i pouzdane rezultate.

Za ispitivanje ataksije u našim uslovima korišćen je rotarod aparat prilagođen pacovima (model 47700; Ugo Basile, Comerio, Italija). U svim eksperimentima, pacovi su trenirani tokom četiri dana, sa tri dvominutna pokušaja svakog dana. Prvog dana treninga brzina je bila fiksirana na 15 rpm (eng. *rounds per minute*), a zatim je primenjeno ubrzanje 15–25 rpm. Pre samog eksperimenta petoga dana, napravljen je konačan izbor: samo oni pacovi koji su mogli da ostanu 120 s na valjku, bez padanja, izabrani su za dalja testiranja.

U rotarod testu sprovedena su dva eksperimenta:

- **Eksperiment 1:** Procena efekata SH-I-048A (10 i 25 mg/kg) u kombinaciji sa β -CCt-om (30 mg/kg);
- **Eksperiment 2:** Procena efekata WYS8 (0,2, 1 i 10 mg/kg), diazepama (0,5 i 2 mg/kg) i njihovih kombinacija.

3.4.5. TEST JAČINE STISKA

Sila kojom pacov svojim prednjim šapama povlači žicu predstavlja meru jačine stiska u istoimenom testu koga su, sa određenim modifikacijama, prvobitno opisali Boissier i Simon (1960). Ovaj test se koristi za procenu miorelaksantnog efekta lekova i toksičnih supstanci, ali je moguće uočiti i promene koje nastaju usled različitih neuroloških oštećenja, oboljenja, pa i starosti. Uticaj benzodiazepina na mišićni tonus može se

ispitati testom jačine stiska sa velikom pouzdanošću, tako da se ove supstance čak mogu koristiti u cilju validacije same metode (Meyer i sar., 1979).

U našim eksperimentima, jačina stiska prednjih šapa pacova testirana je komercijalno dostupnim aparatom (model 47105; Ugo Basile, Milano, Italija). Pacov se pridržavao jednom, dok mu se drugom rukom pomagalo da uhvati trouglastu žicu. Povlačenje pacova za rep, u horizontalnoj ravni, dovodi do njegovog refleksnog hvatanja za žicu, jer životinja želi da se odupre ovom povlačenju unazad. Trouglasta žica je direktno povezana sa transduserom primenjene sile, a aparat zapravo meri maksimalnu silu konstantnog povlačenja (u gramima) koju primenjuje eksperimentator kako bi nadvladao jačinu stiska prednjih šapa pacova. Svaka životinja je imala tri pokušaja (pokušaj je završen tek kada pacov ispusti žicu), a maksimalna vrednost ili medijana su uzimane za dalju statističku analizu.

U testu jačine stiska sprovedena su dva eksperimenta:

- **Eksperiment 1:** Procena efekata rastućih doza SH-I-048A (0,5, 2 i 10 mg/kg);
- **Eksperiment 2:** Procena efekata WYS8 (0,2, 1 i 10 mg/kg), diazepama (0,5 i 2 mg/kg) i njihovih kombinacija.

3.4.6. PENTILENTETRAZOLSKI TEST

Prva faza ispitivanja potencijalnih antiepileptika u savremenim istraživanjima zasniva se na dva različita modela, koji podrazumevaju uvođenje konvulzija elektrošokovima ili hemokonvulzivima (Löscher, 2011). Među hemijskim agensima sa prokonvulzivnim osobinama važno mesto zauzima pentilentetrazol (PTZ) (Bialer i White, 2010).

Pentilentetrazol je nekompetitivni antagonist $GABA_A$ receptora koji, u zavisnosti od primenjene doze i puta primene, dovodi do epileptičnih konvulzija u glodara i to: miokloničnih, kloničnih, toničnih, tonično–kloničnih grčeva, a u pojedinim slučajevima i do smrtnog ishoda. Ipak, čini se da PTZ najbolje oponaša generalizovane mioklonične napade kod ljudi, a vrlo slabo apsans tj. *petit mal* napade (Löscher and Schmidt, 1988; Löscher, 2009). Ovaj model epilepsije se pokazao kao izuzetno dobar prediktor kliničke efikasnosti lekova koji deluju inhibicijom protoka Ca^{2+} kroz kanale T-tipa, kao što su etosuksimid ili valproat, ali i supstanci koje povećavaju protok Cl^- jona kroz $GABA_A$ receptore (benzodiazepini). Ono što posebno izdvaja PTZ–ski test

jeste empirijski nalaz visoke efikasnosti potencijalnih anksiolitika u ovom testu (Lippa i sar., 1979).

U našem eksperimentu, PTZ je primenjen u dozi od 70 mg/kg, 20 min nakon odgovarajućeg tretmana. Ova doza je izabrana jer dovodi do karakterističnih epileptičnih napada u najmanje 80% pacova. Nakon primene PTZ-a, životinje su smeštene u pojedinačne kaveze u kojima smo pratili pojavu epileptičnih napada u periodu od 30 min.

U PTZ-skom testu sproveden je jedan eksperiment:

- **Eksperiment 1:** Procena efekata WYS8 (0,2, 1 i 10 mg/kg), diazepam (2 mg/kg) i njihovih kombinacija.

3.5. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

U svim testovima rezultati ispitivanja su prikazani kao aritmetička sredina + ili \pm standardna greška. Pre obrade analizom varijanse, podaci su testirani na homogenost i normalnu raspodelu. Eksperiment u kojem su određivane koncentracije WYS8 i diazepam u serumu i mozgu pacova obrađeni su dvofaktorskom ANOVA-om, a faktori uticaja bili su nivoi tretmana i vreme primene (jednokratna i ponavljana primena). Parametri praćeni u testu spontane lokomotorne aktivnosti, uzdignutom plus-lavirintu, probnom testu vodenog lavirinta, testu jaćine stiska i rotarodu analizirani su jednofaktorskom ANOVA-om, sa tretmanom kao jedinim faktorom. Jedini izuzetak su bili eksperimenti sa diazepamom i WYS8 gde je korišćena dvofaktorska ANOVA, sa doznim nivoima ova dva liganda kao faktorima. Dvofaktorska ANOVA je izabrana u ovom slućaju jer omogućuje praćenje znaćajnosti uticaja svakog od faktora posebno, kao i njihove interakcije. U slućaju znaćajne interakcije koristili smo ANOVA-e nižeg reda ili Studentove t-testove, kako bi ispitali uticaj jednog, u zavisnosti od pojedinaćnih nivoa drugog liganda. U pentilentetrazolskom testu, prvo je korišćen χ^2 test da bi se uoćila razlika u frekvenciji pojave klonićnih ili tonićnih grćeva zbog prethodnog tretmana sa izabranim supstancama, a zatim smo Fisher-ovim testom poredili pojedine nivoe tretmana.

Za obradu parametara u vodenom lavirintu tokom pet dana ućenja korišćena je dvofaktorska ANOVA, gde su nivoi tretmana i dani ućenja bili faktori. I u ovom slućaju

je izuzetak bio eksperiment sa diazepamom ili β -CCt i WYS8, jer smo želeli da ispitamo uticaj svakog liganda ponaosob u zavisnosti od dana testiranja u MVL, kao i međusobnu interakciju, pa je stoga korišćena trofaktorska GLM ANOVA sa ponavljanim merenjima (eng. *General Linear Model with Repeated Measures – GLM RM*). U ovom eksperimentu postojala su dva nivoa diazepama ili β -CCt i četiri nivoa WYS8, a faktor koji se ponavljao za jedinke (*within-subjects factor*) bili su dani učenja (pet nivoa). Kako bi izbegli fiktivnu inflaciju broja stepeni slobode, za svaki dan testiranja i praćeni parameter izračunali smo srednju vrednost za svakog pacova (ukupni podaci/broj pokušaja). Ova relativno nestandardna analiza je zahtevala prethodnu primenu *Mauchly* testa za ispitivanje sfericiteta ponavljano faktora i ukoliko bi se pokazalo da je njegov uticaj bio značajan, primenjivali smo korekcionu Greenhouse–Geisser faktor za stepene slobode, čije vrednosti stoga više nisu bili celi brojevi (Carli i sar., 2000; Vorhees i Williams, 2006). Značajne interakcije, koje mogu ukazati na određenu distorziju podataka, ispitivali smo dvofaktorskim ANOVA–ma. U cilju kompletne analize ovako složenog eksperimenta, odlučili smo da podatke analiziramo dvofaktorskom ANOVA–om sa ukupnim podacima (faktori WYS8 i diazepam; zavisne promenljive su srednje vrednosti za sve dane sticanja za svakog pacova) i pojedinačno po danima (zavisne promenljive su srednje vrednosti za svaki dan sticanja za svakog pacova).

U svim eksperimentima, razlike na nivou $p < 0,05$ uzimane su kao statistički značajne, dok su razlike $0,1 > p > 0,05$ smatrane trendom. Ukoliko su uticaji faktora bili statistički značajni, *post hoc* poređenja vršili smo Student–Newman–Keuls (SNK) ili Dunnett–ovim testom (u slučaju poređenja sa kontrolnom grupom). Statistička analiza je sprovedena komercijalnim statističkim softverima PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) i Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA).

4. REZULTATI

4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IZABRANIH SUPSTANCI U PLAZMI/SERUMU I MOZGU PACOVA

4.1.1. EKSPERIMENT 1

U oba intervala uzimanja uzoraka (20 i 60 min nakon i.p. injekcije SH-I-048A, u dozi od 0,5, 2 i 10 mg/kg), molarne koncentracije SH-I-048A u plazmi i homogenatu mozga bile su u očekivanim granicama i u direktnoj vezi sa primenjenim dozama supstance.

Tabela 1. Srednje molarne koncentracije SH-I-048A (0,5, 2 i 10 mg/kg) u plazmi i moždanom tkivu pacova nakon 20 i 60 min. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost ± SD za 3 uzorka.

doza (mg/kg)	0,5	2		10	
vreme (min)	20	20	60	20	60
plazma	187,59 ±	818,82 ±	617,87 ±	1591,41 ±	1396,19 ±
(nmol/L)	26,66	57,06	149,35	5,15	492,70
mozak	231,12 ±	750,59 ±	739,37 ±	2096,33 ±	1035,23 ±
(nmol/kg)	52,27	307,14	182,94	858,32	421,19

4.1.2. EKSPERIMENT 2

Molarne koncentracije WYS8 i diazepam u serumu i moždanom tkivu nakon jednokratne ili ponavljane primene u dozi od 10 ili 2 mg/kg, redom, date su u Tabeli 4. Dvofaktorske ANOVA-e nisu pokazale međusobni uticaj ove dve supstance na njihovu kinetiku u serumu ili mozgu, kako nakon jednog, tako i nakon četiri dana tretmana. Rezultati statističke analize za faktore WYS8, trajanje tretmana i njihovu interakciju bili su, redom: $F(1,12)=0,12$, $p=0,735$; $F(1,12)=0,28$, $p=0,609$ i $F(1,12)=0,09$, $p=0,765$, dok su za faktore diazepam, trajanje tretmana i njihovu međusobnu interakciju F vrednosti bile, redom: $F(1,12)=0,79$, $p=0,390$; $F(1,12)=0,42$, $p=0,527$ i $F(1,12)=2,49$, $p=0,141$.

Tabela 4. Analiza WYS8 i diazepama u uzorcima seruma i mozga pacova. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost \pm SD za 4 uzorka. SOL = solvent; WYS8 = WYS8 (10 mg/kg telesne mase pacova); DZP = diazepam (2 mg/kg telesne mase pacova); NP = nema podataka.

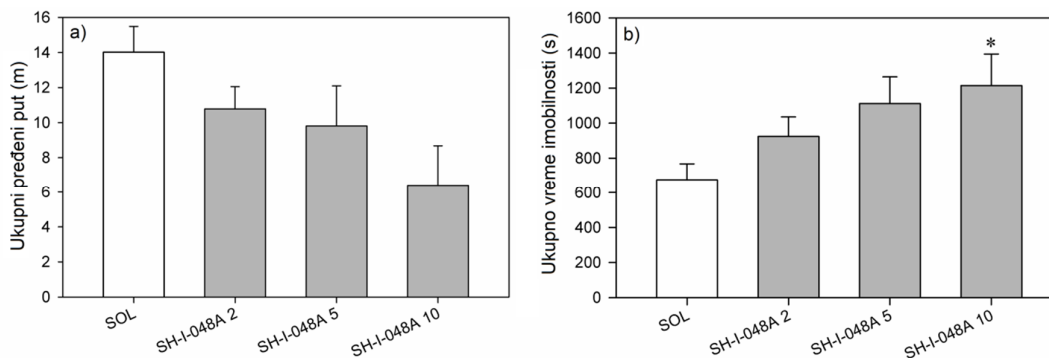
Tretman		WYS8				DZP			
		SOL	WYS8	SOL	WYS8 + DZP	SOL	DZP	SOL	WYS8 + DZP
		WYS8	WYS8	WYS8 + DZP	WYS8 + DZP	DZP	DZP	WYS8 + DZP	WYS8 + DZP
Koncentracija (nmol/L)	Serum	171,26	179,24	147,46	177,77	151,37	284,66	298,98	243,61
		\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
		93,85	31,56	45,27	97,04	82,91	140,24	173,86	21,12
	Mozak	91,36 \pm 29,36	89,94 \pm 24,60	64,77 \pm 15,63	72,33 \pm 16,27	NP	NP	NP	NP

Što se tiče uzoraka moždanog tkiva, F i p vrednosti za iste faktore bile su: $F(1,12)=3,95$, $p=0,070$; $F(1,12)=0,08$, $p=0,787$ i $F(1,12)=0,16$, $p=0,693$, redom. Zbog tehničkih problema, kvantifikacija diazepama u moždanom tkivu nije urađena; ipak, semi-kvantitativna procena bila je u opsegu 50–300 nmol/L, što ne ukazuje na bilo kakvu naznaku promene u koncentraciji diazepama usled prisustva WYS8.

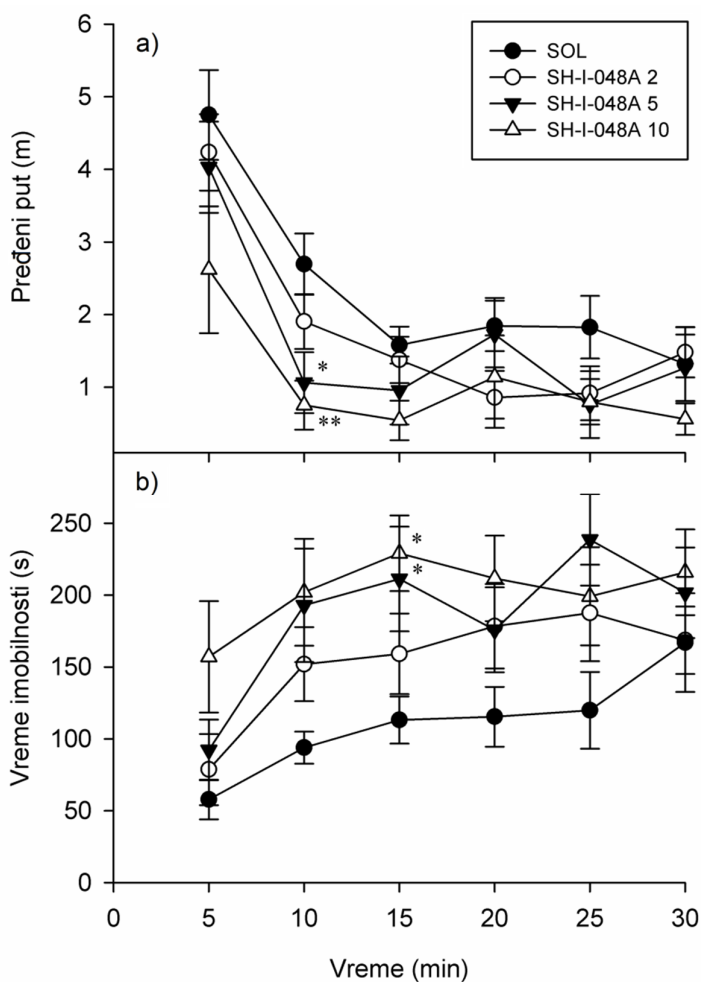
4.2. TEST SPONTANE LOKOMOTORNE AKTIVNOSTI

4.2.1. EKSPERIMENT 1

Uticaj SH-I-048A na spontanu lokomotornu aktivnost pacova procenili smo koristeći parametre ukupnog pređenog puta i procenta vremena provedenog u imobilnosti tokom svih 30 minuta praćenja testa, ali i tokom šest petominutnih intervala. Jednofaktorska ANOVA pokazala je značajno smanjenje vremena imobilnosti ($F(3,28)=3,00$, $p=0,047$; Slika 11b), dok je uticaj tretmana na ukupni pređeni put tokom 30 minuta bio blizu statističke značajnosti ($F(3,28)=2,76$, $p=0,061$; Slika 11a). Kada je ista statistička analiza primenjena na petominutne intervale, negativan uticaj ispitivane supstance na pređeni put bio je značajan samo u periodu od petog do desetog minuta ($F(3,28)=5,00$, $p=0,007$; Slika 12a), a u slučaju vremena imobilnosti tokom trećeg intervala (10–15 min) ($F(3,28)=3,59$, $p=0,026$; Slika 12b).



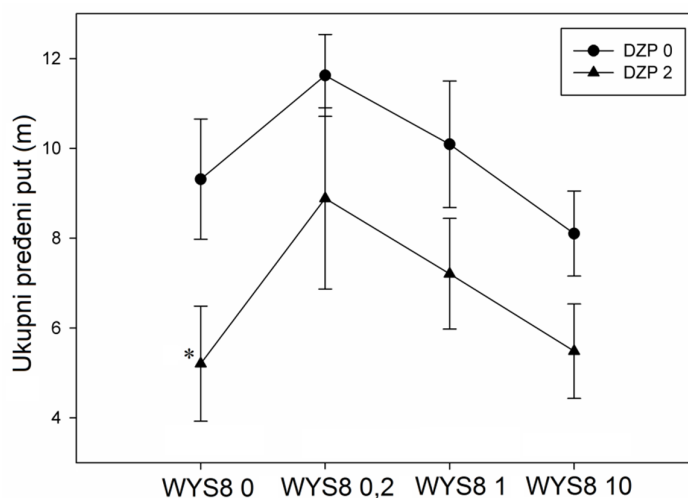
Slika 11. Uticaj SH-I-048A (2, 5 i 10 mg/kg) na a) ukupni pređeni put i b) ukupno vreme imobilnosti pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 30 minuta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.



Slika 12. Uticaj SH-I-048A (2, 5 i 10 mg/kg) na pređeni put (a) i vreme imobilnosti pacova (b) u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom šest petominutnih intervala. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).

4.2.2. EKSPERIMENT 2

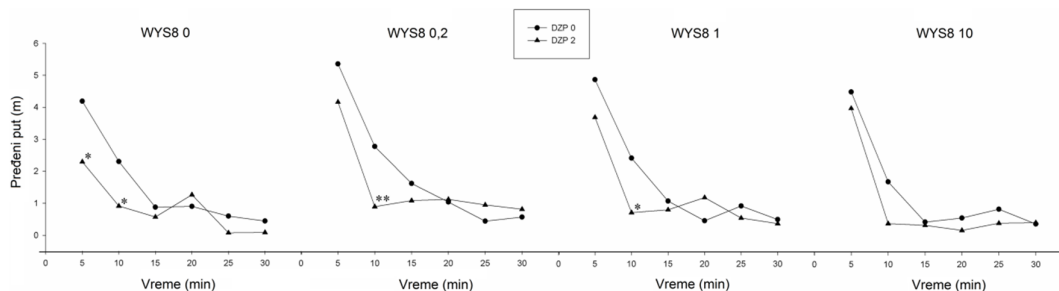
Dvofaktorska ANOVA primenjena na ukupan pređeni put tokom 30 min (Slika 13) otkrila je značajan efekat diazepama kao faktora ($F(1,48)=11,02$, $p=0,002$), dok je uticaj faktora WYS8 bio na granici statističke značajnosti ($F(3,48)=2,81$, $p=0,050$). Interakcija između diazepama i WYS8 nije bila značajna ($F(3,55)=0,14$, $p=0,937$). *Post hoc* SNK test je pokazao da nema značajnih razlika između pojedinačnih nivoa faktora WYS8; najveća razlika (3,462 m) postojala je između doza 0,2 i 10 mg/kg ($p=0,054$). S druge strane, zapažena razlika (3,087 m) između dva nivoa diazepama (2 mg/kg vs. 0 mg/kg, $p=0,002$) bazirala se na razlici u okviru WYS8 0 (4,109 m, $p=0,032$), a kada su međusobna poređenja urađena u okviru ostalih nivoa WYS8 (0,2, 1 i 10 mg/kg), ta razlika je izostala (p vrednosti bile su 0,148, 0,128 i 0,166, redom), što ukazuje da je sedativni efekat diazepama ublažen dodatkom WYS8.



Slika 13. Uticaj WYS8 (0, 0,2, 1 i 10 mg/kg) u odsustvu (DZP 0, ●) i prisustvu 2 mg/kg diazepama (DZP 2, ▲) na ukupni pređeni put pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 30 min. * $p<0,05$ u odnosu na DZP 0 u okviru WYS8 0. Broj životinja u svakoj grupi bio je 7.

Kada je isti statistički pristup primenjen na podatke dobijene iz petominutnih intervala (Slika 14) ispostavilo se da je uticaj diazepama bio značajan samo u prva dva intervala: 0–5 min ($F(1,48)=8,31$, $p=0,006$) i 5–10 min ($F(1,48)=22,99$, $p<0,001$). Dok je sedativni efekat diazepama u prvom intervalu bio očit samo zbog razlike u okviru nivoa WYS8 0 (razlika između srednjih vrednosti bila je 1,90 m, $p=0,025$), značajne razlike u sledećem intervalu (5–10 min) su postojale i u okviru doza 0, 0,2 i 1 mg/kg

WYS8 (razlike u srednjim vrednostima bile su 1,39 m ($p=0,036$), 1,86 ($p=0,06$) i 1,67 m ($p=0,013$), redom).



Slika 14. Uticaj WYS8 (0, 0,2, 1 i 10 mg/kg) u odsustvu (DZP 0, ●) i prisustvu 2 mg/kg diazepama (DZP 2, ▲) na pređeni put pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom šest petominutnih intervala. * $p<0,05$ i ** $p<0,01$ u odnosu na DZP 0 u okviru odgovarajućeg nivoa WYS8.

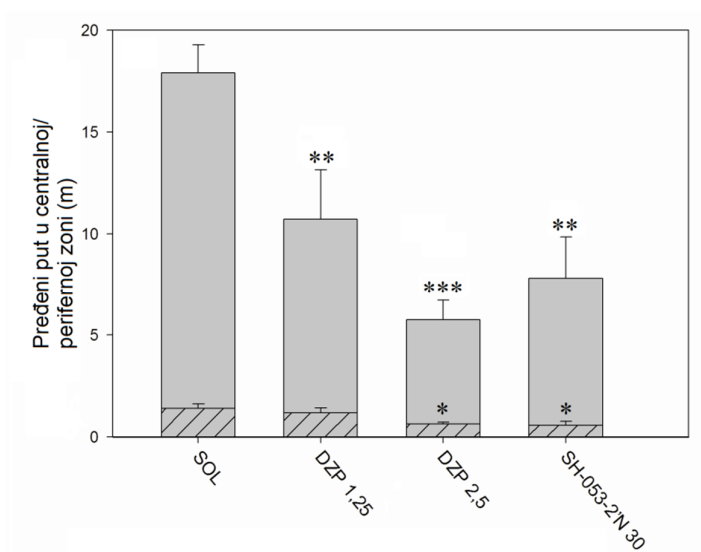
Razlika u okviru najviše doze WYS8 nije dostigla statističku značajnost (1,27 m, $p=0,055$), jer je, u ovoj dozi, i sâm WYS8 pokazao efekat nalik sedaciji. Ova analiza je jasno pokazala da je postojao jedan kratak period u kojem je sedativni efekat diazepama bio i dalje evidentan, bez obzira na dodatak WYS8.

Nasuprot efektima diazepama, uticaj faktora WYS8 bio je značajan samo u trećem intervalu (10–15 min) ($F(3,48)=3,42$, $p=0,024$). *Post hoc* poređenja su pokazala da je značajna razlika postojala između doza 0,2 i 10 mg/kg WYS8 (razlika 0,97 m, $p=0,015$). Kako je ova razlika uočena samo u odsustvu diazepama (DZP 0), može se zaključiti da je u ovom intervalu najviša doza WYS8 pokazala određeni sedativni potencijal. Interakcija dva faktora nije dostigla statističku značajnost niti u jednom od intervala.

4.2.3. EKSPERIMENT 3

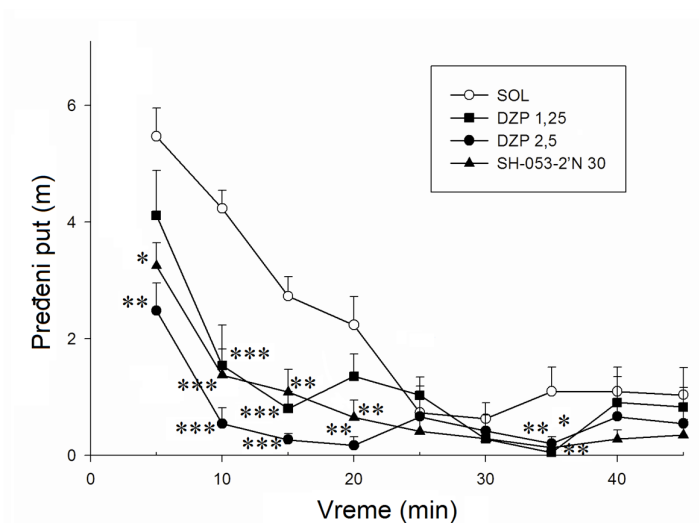
U eksperimentu sa SH-053-2’N (30 mg/kg) i diazepamom (1,25 i 2,5 mg/kg), jednofaktorska ANOVA je pokazala statistički značajan efekat tretmana na ukupni pređeni put tokom 45 min praćenja ($F(3,27)=8,33$, $p<0,001$; Slika 15). *Post hoc* Dunnett–ov test je pokazao statistički značajno smanjenje aktivnosti sva tri tretmana u odnosu na kontrolnu grupu. Ovaj efekat je bio nešto više izražen u perifernoj

($F(3,27)=8,56$, $p<0,001$; značajnosti nisu prikazane), nego u centralnoj zoni ($F(3,27)=4,11$, $p=0,016$; Slika 15).



Slika 15. Uticaj SH-053-2'N (30 mg/kg) i diazepama (1,25 i 2,5 mg/kg) na pređeni put pacova u centralnoj (šrafirani deo) i perifernoj (sivi deo) zoni kaveza za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 45 min (ukupna aktivnost odgovara visini celog stubića). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ i * $p<0,001$, u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL). Broj životinja u grupama: 8, 8, 7, 8.**

Kada je statistička analiza proširena na petominutne intervale (Slika 16), pokazalo se da je hipolokomotorni efekat tretmana bio značajan tokom prvih 20 min praćenja, i opet u periodu od 30–35 min, dok je efekat SH-053-2'N (30 mg/kg) bio negde između efekata dve testirane doze diazepama.

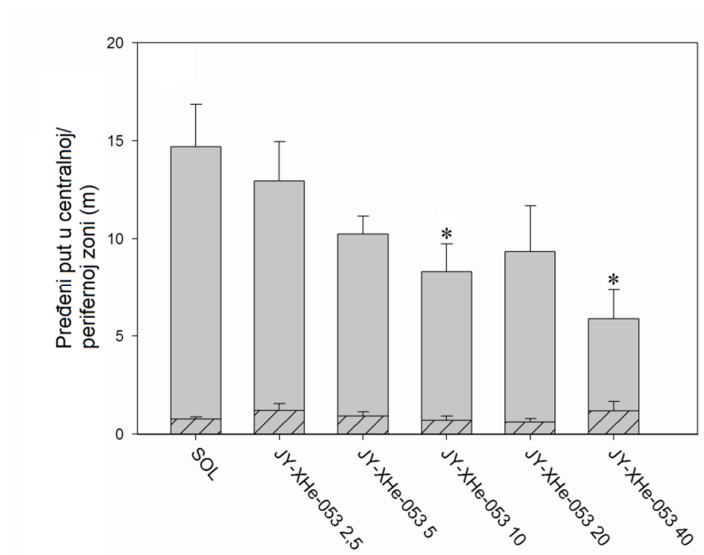


Slika 16. Uticaj SH-053-2'N (30 mg/kg) i diazepama (1,25 i 2,5 mg/kg) na pređeni put tokom devet petominutnih intervala. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i * $p < 0,001$, u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL).**

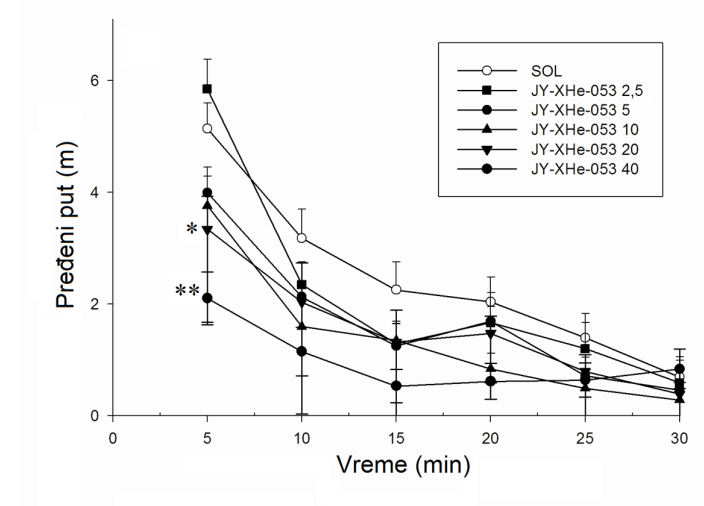
4.2.4. EKSPERIMENT 4

U eksperimentu sa JY-XHe-053, analiza varijanse je pokazala značajan efekat tretmana na ukupnu lokomotornu aktivnost pacova tokom 30 min praćenja testa ($F(5,36)=2,85$, $p=0,029$), pri čemu su jedine efektivne doze bile 10 i 40 mg/kg (Slika 17). Uticaj tretmana na aktivnost u centralnoj zoni nije bio relevantan, dok je analiza pređenog puta u perifernoj zoni otkrila da su tri više doze JY-XHe-053 bile značajno drugačije od kontrole (značajnosti nisu prikazane).

Analiza petominutnih intervala pokazala je statistički značajan efekat JY-XHe-053 (20 i 40 mg/kg) samo u prvom intervalu (0–5 min; Slika 18), ali time pokazajući jasan potencijal ove supstance za izazivanje sedativnog efekta.



Slika 17. Uticaj JY–XHe–053 (2,5, 5, 10, 20 i 40 mg/kg) na pređeni put pacova u centralnoj (šrafirani deo) i perifernoj (sivi deo) zoni kaveza za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 30 min (ukupna aktivnost odgovara visini celog stubića). *p<0,05 u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL). Broj životinja u grupama: 8, 6, 6, 8, 8, 6.

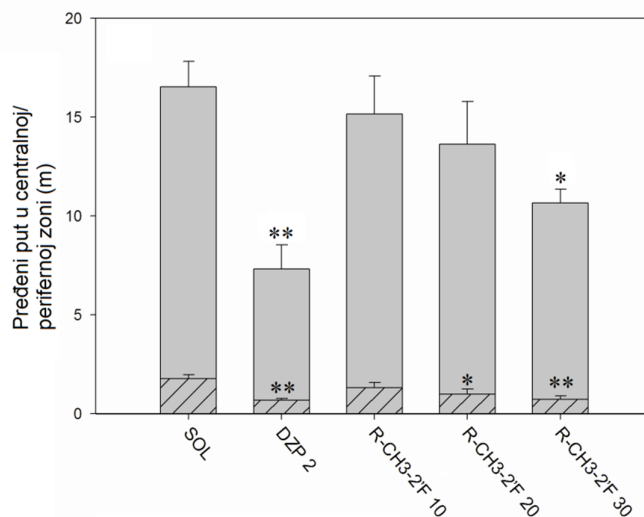


Slika 18. Uticaj JY–XHe–053 (2,5, 5, 10, 20 i 40 mg/kg) na pređeni put tokom šest petominutnih intervala. *p<0,05 i **p<0,01 u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL).

4.2.5. EKSPERIMENT 5

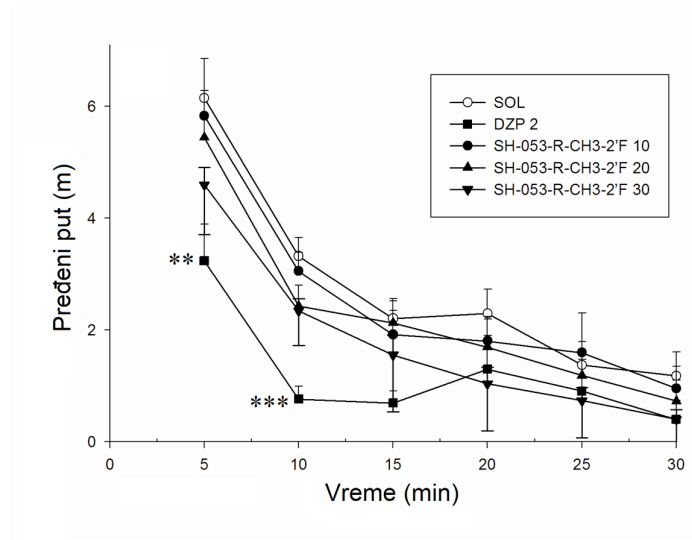
Uticaj tretmana (10, 20 i 30 mg/kg SH–053–R–CH₃–2’F i 2 mg/kg diazepama) na ukupni pređeni put i u ovom eksperimentu bio je statistički značajan (F(4,30)=4,50,

$p=0,006$; Slika 19). *Post hoc* analiza Dunnett–ovim testom pokazala je da su ispitivani ligandi (u najvišoj dozi) i diazepam značajno smanjili motornu aktivnost životinja. Ova konstatacija se odnosi više na aktivnost u centralnoj zoni ($F(4,30)=4,27$, $p=0,007$), nego na periferiji ($F(4,30)=3,74$, $p=0,014$), jer je SH–053–R–CH₃–2'F, u dozama od 20 i 30 mg/kg, smanjio centralnu, a samo u najvišoj dozi i perifernu aktivnost.



Slika 19. Uticaj SH–053–R–CH₃–2'F (10, 20 i 30 mg/kg) i 2 mg/kg diazepama (DZP 2) na pređeni put pacova u centralnoj (šrafirani deo) i perifernoj (sivi deo) zoni kaveza za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 30 min (ukupna aktivnost odgovara visini celog stubića). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ i * $p<0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL). Broj životinja u grupama: 7, 5, 7, 8, 8.**

Analiza petominutnih intervala je pokazala da SH–053–R–CH₃–2'F nije značajno smanjio aktivnost niti u jednom od 6 intervala (Slika 20), za razliku od diazepama (2 mg/kg) koji je izazvao izraženu sedaciju u prvih 10 min posmatranja ponašanja životinje.

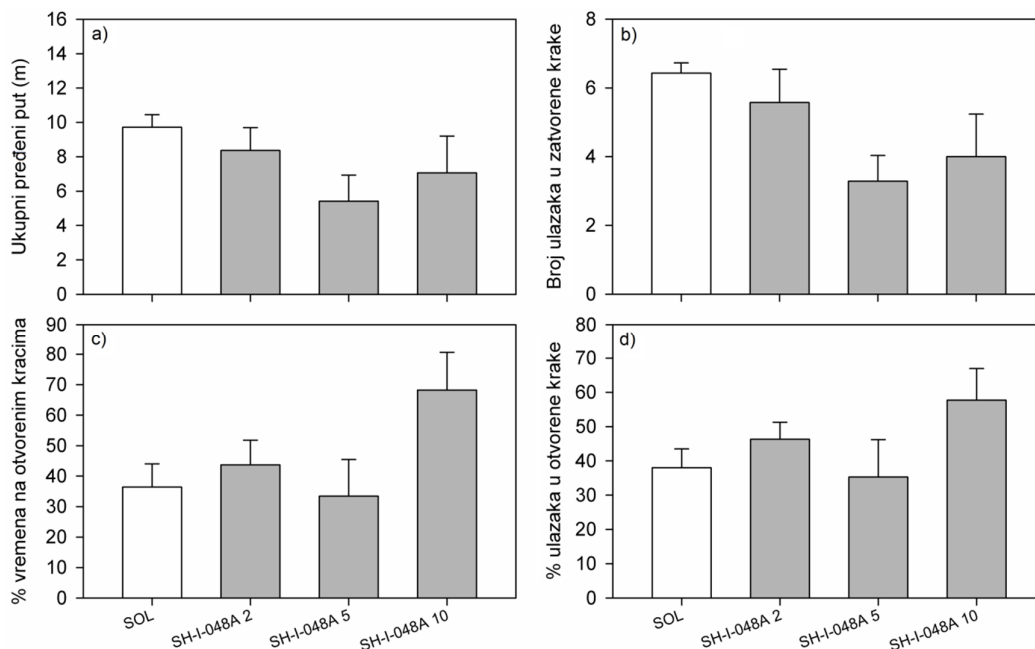


Slika 20. Uticaj SH-053-R-CH₃-2'F (10, 20 i 30 mg/kg) i 2 mg/kg diazepama (DZP 2) na pređeni put tokom šest petominutnih intervala. **p<0,01 i *p<0,001 u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL).**

4.3. UZDIGNUTI PLUS-LAVIRINT

4.3.1. EKSPERIMENT 1

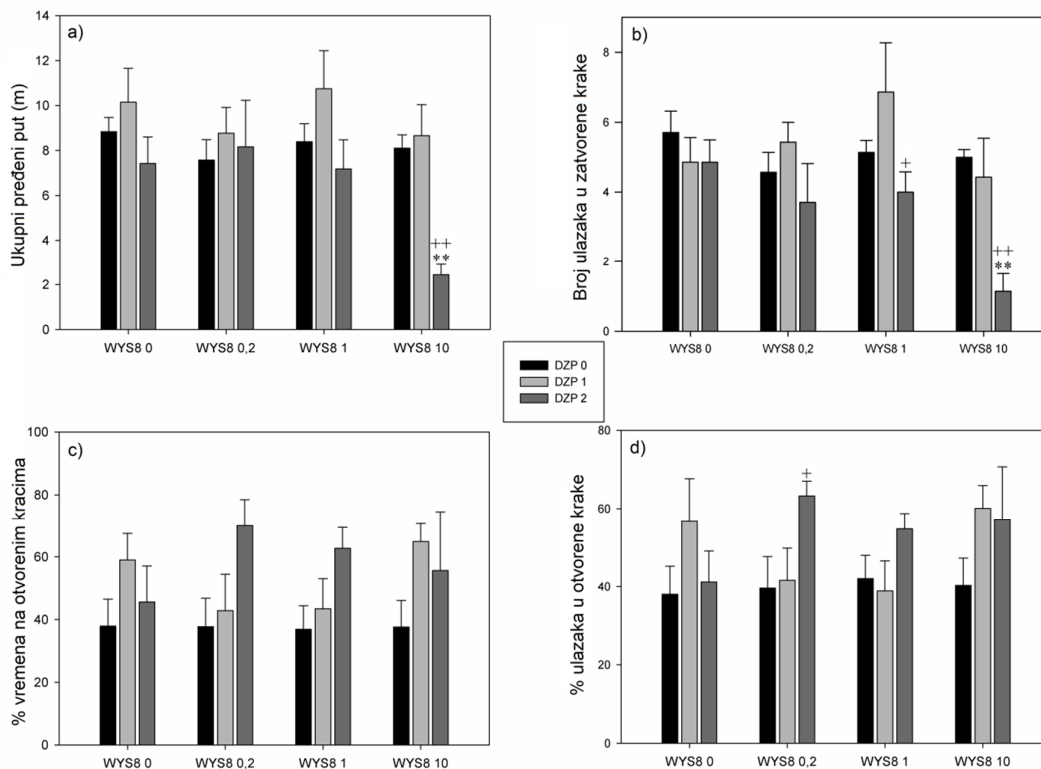
Jednofaktorska ANOVA je pokazala da nije bilo značajnog efekta tretmana na ukupni pređeni put ($F(3,24)=1,46$, $p=0,250$; Slika 21a) i na broj ulazaka u zatvorene krake ($F(3,24)=2,64$, $p=0,072$; Slika 21b), dva parametra koji se mogu povezati sa opštom aktivnošću životinje. Što se tiče uticaja SH-I-048A na parametre koji mogu ukazati na promenu u nivou anksioznosti, ista statistička analiza je dokazala izostanak efekta tretmana na procenat vremena provedenog na otvorenim kracima ($F(3,24)=2,37$, $p=0,095$; Slika 21c), kao i na procenat ulazaka u otvorene krake ($F(3,24)=1,57$, $p=0,223$; Slika 21d). U preliminarnom eksperimentu najniža testirana doza SH-I-048A (0,5 mg/kg) bila je bez ikakvog uticaja na parametre koji se prate u uzdignutom plus-lavirintu (podaci nisu prikazani).



Slika 21. Uticaj SH-I-048A (2, 5 i 10 mg/kg) na ukupni pređeni put (a), broj ulaza u zatvorene krake (b), procenat vremena provedenog na otvorenim kracima (c) i procenat ulazaka u otvorene krake uzdignutog plus-lavirinta (d). Broj životinja u svakoj grupi bio je 7.

4.3.2. EKSPERIMENT 2

Dvofaktorska ANOVA (WYS8 x diazepam) je otkrila statistički značajan efekat faktora diazepam za oba parametra opšte aktivnosti (ukupni pređeni put (Slika 22a): $F(2,72) = 7,20$, $p=0,001$; broj ulazaka u zatvorene krake (Slika 22b): $F(2,72)=7,61$, $p=0,001$) i parametre anksioznosti u uzdignutom plus-lavirintu (procenat vremena provedenog na otvorenim kracima (Slika 22c): $F(2,72)=4,60$, $p=0,013$; procenat broja ulazaka u otvorene krake (Slika 22d): $F(2,72)=3,82$, $p=0,027$). Rezultati ANOVA-e za drugi faktor (WYS8, $F(3,72)$) bili su, redom: za parametre opšte aktivnosti: $F=2,53$ ($p=0,064$) i $F=3,35$ ($p=0,024$); za parametre anksioznosti: $F=0,18$ ($p=0,91$) i $F=0,66$ ($p=0,577$). Interakcija između ova dva faktora nije bila statistički značajna ni za jedan od praćenih parametara.



Slika 22. Uticaj diazepama (DZP; 0, 1 i 2 mg/kg) i WYS8 (0, 0,2, 1 i 10 mg/kg) na ukupni pređeni put (a), broj ulazaka u zatvorene krake (b), procenat vremena na otvorenim kracima (c) i procenat broja ulazaka u otvorene krake uzdignutog plus-lavirinta (d). ** $p < 0,01$ u odnosu na DZP 0 u okviru odgovarajućeg nivoa WYS8; + $p < 0,05$ i ++ $p < 0,01$ u odnosu na DZP 1 u okviru odgovarajućeg nivoa WYS8. Broj životinji u svakoj grupi bio je 7.

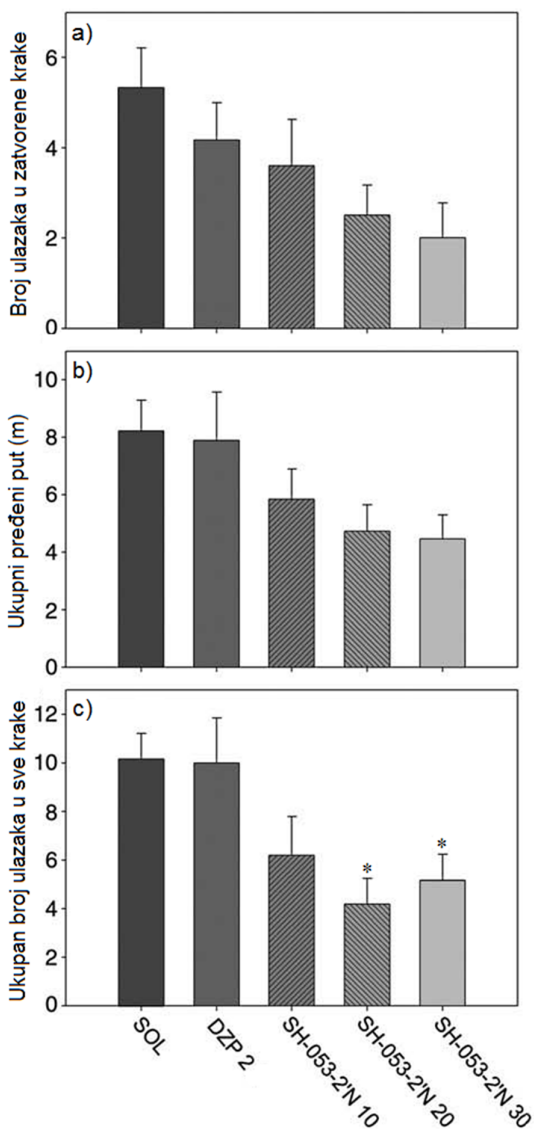
Za oba parametra opšte aktivnosti *post hoc* poređenja su otkrila značajnu razliku između 0 i 2 mg/kg diazepama, kao i doze od 1 mg/kg. Kao što je prikazano na slikama 22a i 22b ova razlika je postojala samo u okviru najviše doze WYS8. U okviru 1 mg/kg WYS8, primena 2 mg/kg diazepama prouzrokovala je smanjen broj ulazaka u zatvorene krake u poređenju sa nižom dozom. Slično, najviša doza WYS8 značajno je smanjila broj ulazaka u zatvorene krake u poređenju sa 0 i 1 mg/kg WYS8. Efekat 10 mg/kg WYS8, u okviru 2 mg/kg diazepama, bio je značajno drugačiji u odnosu na sve druge doze WYS8; ova konstatacija važi i za ukupni pređeni put.

Što se tiče parametara anksioznosti, diazepam u dozi od 2 mg/kg značajno je povećao i procenat vremena na otvorenim kracima i procenat ulazaka u otvorene krake u odnosu na kontrolnu grupu; za poslednje pomenuti parametar, postojala je razlika i

između doze 0 i 1 mg/kg diazepama. Na Slici 22d prikazano je značajno povećanje procenta ulazaka u otvorene krake za diazepam (2 u odnosu na 1 mg/kg), ali samo u okviru najniže doze WYS8 (0,2 mg/kg).

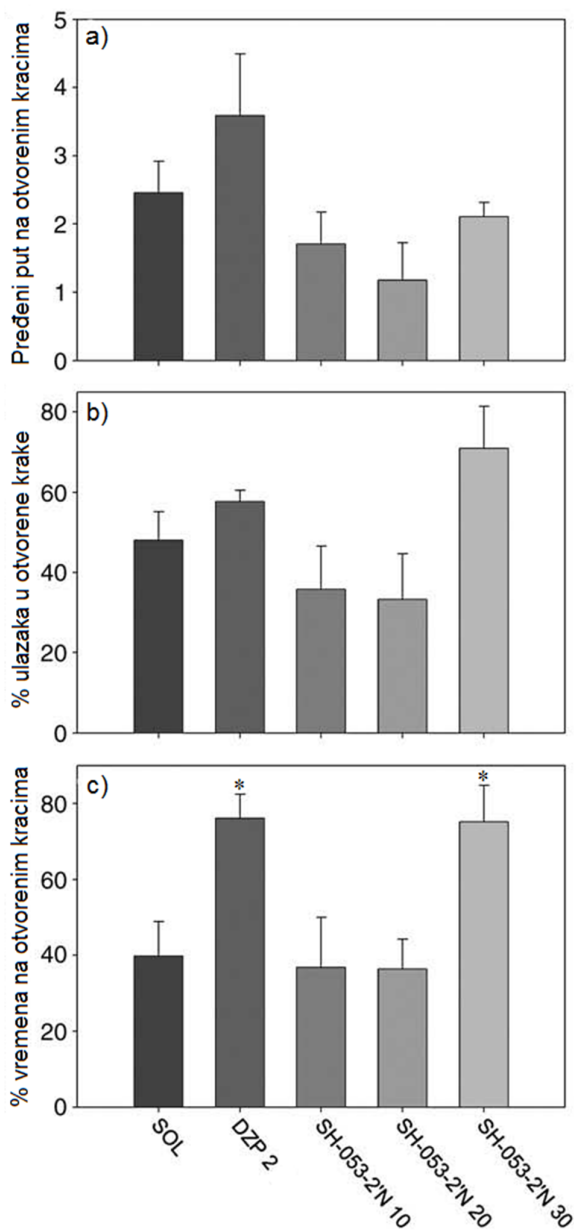
4.3.3. EKSPERIMENT 3

Kada smo analizirali efekte SH-053-2’N na parametre aktivnosti na uzdignutom plus-lavirintu (Slika 23) ukupan efekat tretmana nije dostigao statističku značajnost niti za broj ulazaka u zatvorene krake ($F(4,24)=2,62$, $p=0,060$; Slika 23a) niti za ukupni pređeni put ($F(4,24)=2,33$, $p=0,085$; Slika 23b). Ipak, jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj tretmana na ukupan broj ulazak u sve krake plus-lavirinta ($F(4,24)=4,34$, $p=0,009$). *Post hoc* analiza Dunnett-ovim testom otkrila je signifikantan efekat dve više doze SH-053-2’N, u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,014$ i $0,037$, redom; Slika 23c).



Slika 23. Uticaj 2 mg/kg diazepama (DZP 2) i SH-053-2’N (10, 20 i 30 mg/kg) na a) broj ulazaka u zatvorene krake, b) ukupni pređeni put i c) ukupan broj ulazaka u sve krake plus-lavirinta. * $p<0,05$, u odnosu na kontrolnu grupu (SOL). Broj životinja u grupama: 6, 6, 5, 6, 6.

Na Slici 24 prikazan je uticaj novog liganda na parametre anksioznosti. Za pređeni put na otvorenim kracima nije bilo statističke značajnosti (Slika 24a), ali je primećen određeni statistički trend ($F(4,24)=2,56$, $p=0,065$). Iako je ukupni uticaj tretmana na procenat ulazaka u otvorene krake dostigao statističku značajnost ($F(4,24)=3,04$, $p=0,037$; Slika 24b), *post hoc* analiza je pokazala da nijedna od pojedinačnih doza nije imala značajan efekat. Ipak, uticaj na procenat vremena provedenog na otvorenim kracima bio je signifikantan ($F(4,24)=5,04$, $p<0,001$; Slika 24c), pri čemu su i diazepam, kao pozitivna kontrola, i SH-053-2'N (30 mg/kg) bili efektivni ($p=0,032$ u oba *post hoc* poređenja).



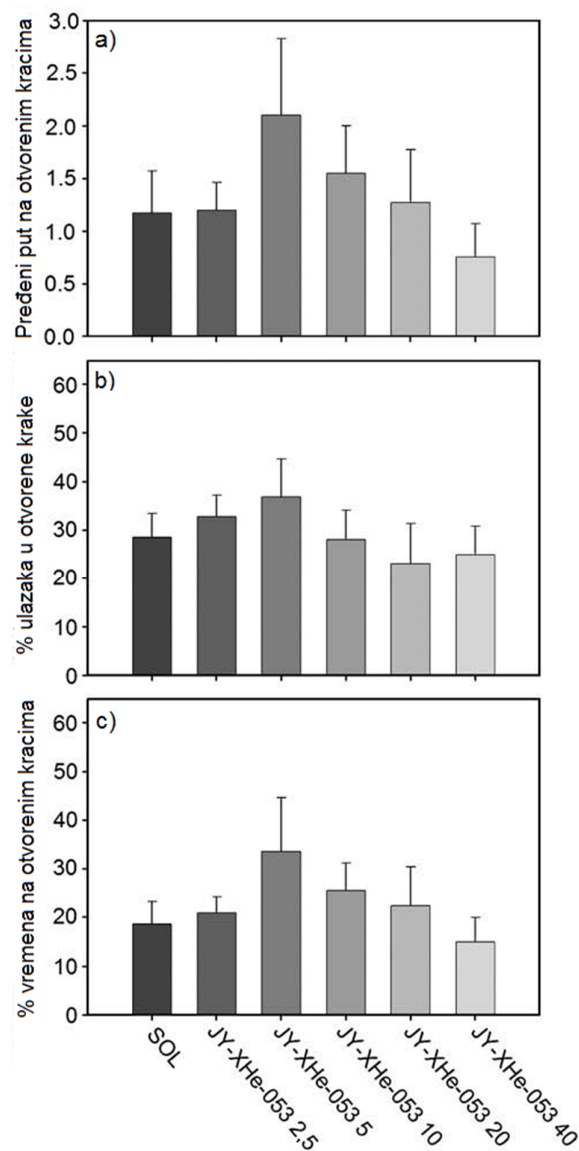
Slika 24. Uticaj 2 mg/kg diazepama (DZP 2) i SH-053-2'N (10, 20 i 30 mg/kg) na ukupni pređeni put na otvorenim kracima (a), procenat ulazaka u otvorene krake (b) i procenat vremena na otvorenim kracima uzdignutog plus-lavirinta (c). * $p<0,05$, u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).

S obzirom da se ukupan broj ulazaka u sve krake lavirinta ne može posmatrati kao jasan pokazatelj lokomotorne aktivnosti tj. mogućeg sedativnog efekta (Cruz i sar., 1994; Rodgers i Johnson, 1995), nije bilo potrebno sprovesti i analizu kovarijanse za parametre anksioznosti, sa ukupnim brojem ulazaka kao kovarijansom (videti Savić i sar., 2004). Stoga smo se odlučili za alternativnu analizu koja nije uključivala diazepam kao pozitivnu kontrolu. Na ovaj način je pokazano da je signifikantan uticaj SH-053-2'N na procenat ulazak u otvorene krake i procenat vremena na otvorenim kracima prisutan i u slučaju kada je broj ulazaka u zatvorene krake uzet kao kovarijansa ($F(3,18)=3,28$, $p=0,045$) i $F(3,18)=6,03$, $p=0,005$, redom). Ovo ukazuje na činjenicu da anksiolitički efekat SH-053-2'N nije bio u direktnoj vezi sa trendom hipolokomocije pacova tretiranih ovim ligandom.

4.3.4. EKSPERIMENT 4

U širokom opsegu doza, JY-XHe-053 je bio praktično bez ikakvog uticaja na ponašanje pacova na plus-lavirintu, što je potvrdila statistička analiza kako parametara vezanih za aktivnost, tako i za nivo anksioznosti eksperimentalne životinje (Slika 25). Uprkos naznakama da postoji aktivnost oblika obrnutog slova „U” i određena bihejvioralna dezinhibicija pri dozi od 5 mg/kg, zapaženije promene u ponašanju pacova nisu primećene.

Slika 25. Uticaj JY-XHe-053 (2,5, 5, 10, 20 i 40 mg/kg) na tri parametra koji se mogu povezati sa nivoom anksioznosti životinje: a) pređeni put na otvorenim kracima, b) procenat broja ulazaka u otvorene krake i c) procenat vremena provedenog na otvorenim kracima uzdignutog plus-lavirinta.



4.3.5. EKSPERIMENT 5

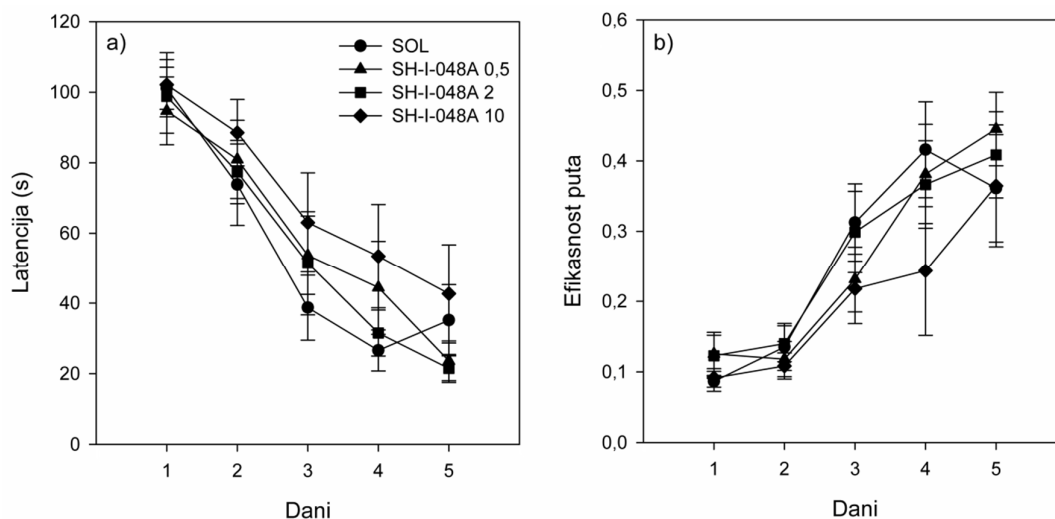
Ligand sa funkcionalnom selektivnošću za α_5 GABA_A receptore (SH-053-R-CH₃-2'F), u dozama do 30 mg/kg, bio je kompletno lišen uticaja na parametre aktivnosti, kao i na one koji se mogu povezati sa anksioznošću životinje na uzdignutom plus-lavirintu (podaci nisu prikazani).

4.4. MORISOV VODENI LAVIRINT

4.4.1. EKSPERIMENT 1

Za oba posmatrana parametra, dvofaktorska ANOVA sa ponavljanim merenjima je pokazala značajan uticaj samo faktora Dani: latencija (faktor Tretman (F(3,24)=0,88, p=0,467); faktor Dani (F(4,96)=46,77, p<0,001) i interakcija Tretman×Dani (F(12,96)=0,59, p=0,843; Slika 26a) i efikasnost puta (Tretman (F(3,24)=0,89, p=0,463); Dani (F(4,96)=28,40, p<0,001) i Tretman×Dani (F(12,96)=0,61, p=0,825; Slika 26b). Takođe, izostao je uticaj novog liganda i na druge posmatrane parametre, kao što su brzina plivanja i procenat vremena u perifernom prstenu (podaci nisu prikazani).

Dodatno, rezultati većeg broja parametara posmatranih tokom probnog testa, obrađenih jednofaktorskom analizom varijanse, ukazuju da nije bilo uticaja SH-I-048A na referentnu memoriju; izdvojena su dva parametra: latencija do prvog ulaska u zonu u kojoj se nalazila platforma tokom faze učenja (F(3,24)=0,11, p=0,951) i pređeni put u perifernom prstenu (F(3,24)=2,68, p=0,070).

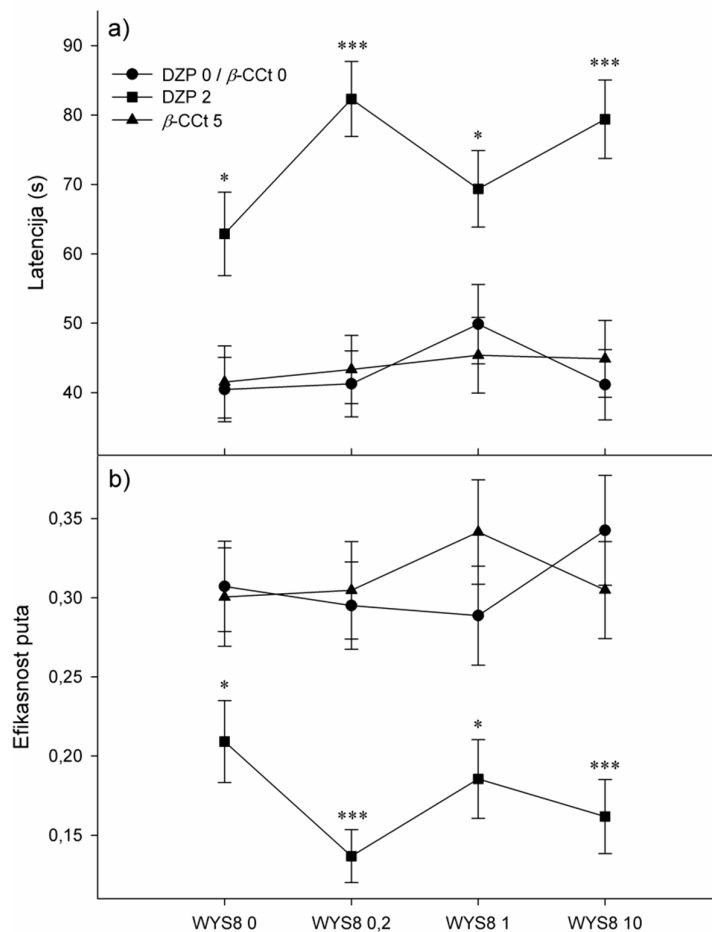


Slika 26. Uticaj SH-I-048A (0,5, 2 i 10 mg/kg) na latenciju nalaska platforme (a) i efikasnost puta (b) tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 7.

4.4.2. EKSPERIMENT 2

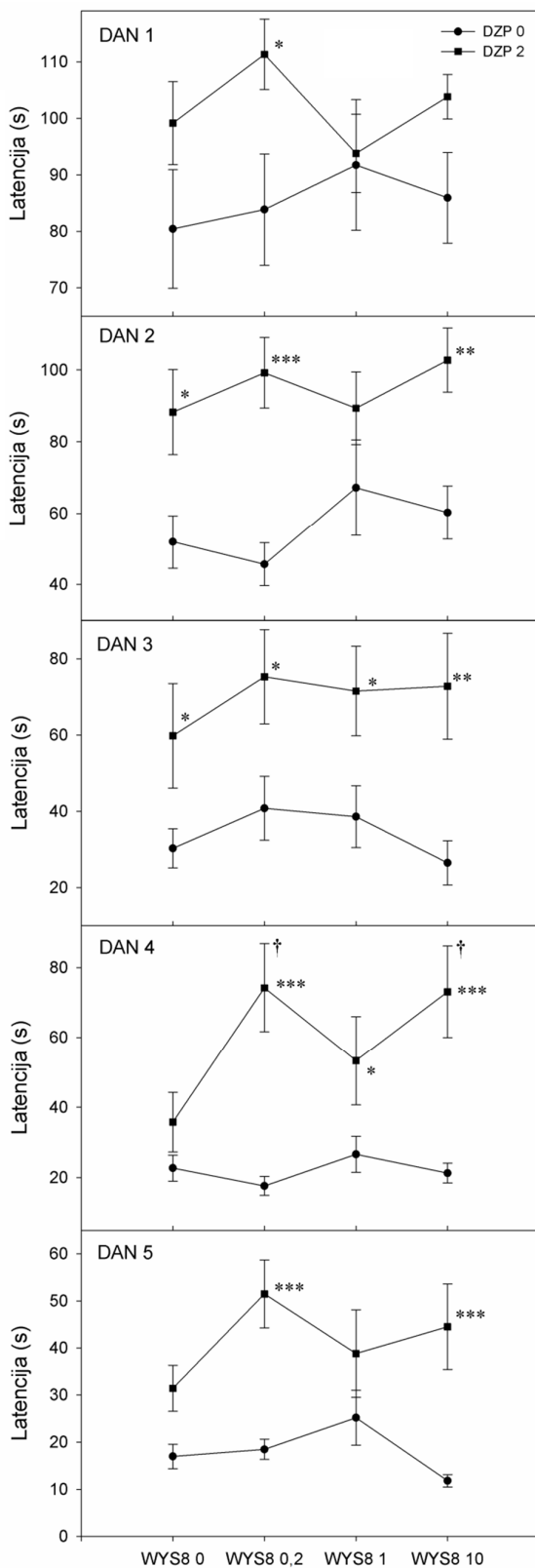
GLM procedura sa ponavljanim merenjima (pogledati poglavlje 3.5. Statistička obrada rezultata) primenjena na podatke za latenciju nalaska platforme tokom pet dana učenja (Slika 27a) pokazala je da ne postoji značajna trofaktorska interakcija ($WYS8 \times \text{diazepam} \times \text{Dani}$; $F(8,786,164,003)=0,78$, $p=0,634$). Ova statistička analiza pokazala je značajan efekat faktora diazepam ($F(1,56)=45,80$, $p<0,001$) i Dani ($F(2,929,164,003)=117,94$, $p<0,001$), ali ne i faktora WYS8 ($F(3,56)=1,03$, $p=0,388$). S obzirom da je interakcija između faktora diazepam i Dani bila statistički značajna ($F(2,929,164,003)=4,15$, $p=0,008$) odlučili smo se da ispitamo ovu interakciju, kako bi došli do prostih glavnih efekata (eng. *simple main effects*). Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanim merenjima (RM ANOVA; $\text{diazepam} \times \text{Dani}$), praćena *post hoc* SNK testom, pokazala je značajan uticaj diazepam, u dozi od 2 mg/kg, tokom svakog od pet dana učenja.

Kada je faktor diazepam zamenjen faktorom β -CCt (Slika 27a) trofaktorska interakcija je i dalje bila bez statističke značajnosti ($WYS8 \times \beta\text{-CCt} \times \text{Dani}$, $F(9,020,168,376)=1,21$, $p=0,293$), a jedino su Dani bili značajan faktor ($F(3,007,168,376)=121,97$, $p<0,001$).



Slika 27. Uticaj WYS8 (0, 0,2, 1 i 10 mg/kg) u odsustvu (DZP 0 / β -CCt 0, ●) i prisustvu 2 mg/kg diazepam (DZP 2, ■) ili 5 mg/kg β -CCt-a (β -CCt 5, ▲) na latenciju nalaska platforme (a) i efikasnost puta (b) tokom pet dana učenja u MVL-u. * $p < 0,05$, * $p < 0,001$ u odnosu na DZP 0 u okviru odgovarajućeg nivoa WYS8. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.**

Dvofaktorska ANOVA (WYS8 \times diazepam) primenjena na ukupne podatke tokom svih pet dana učenja potvrdila je da dodatak WYS8 nema nikakvog uticaja na efekte diazepam. S druge strane, kada je dvofaktorska ANOVA (WYS8 \times diazepam) primenjena na podatke za latenciju tokom svakog dana pojedinačno (Slika 28), primetili smo da su pacovi tretirani diazepamom imali duže latencije od kontrolne grupe tokom drugog i trećeg dana, ali ne i tokom četvrtog i petog dana učenja (p vrednosti bile su 0,01, 0,05, 0,295 i 0,096, redom). Ovaj nalaz bi mogao ukazati na razvoj određenog stepena tolerancije na efekte diazepam u vodenom lavirintu.



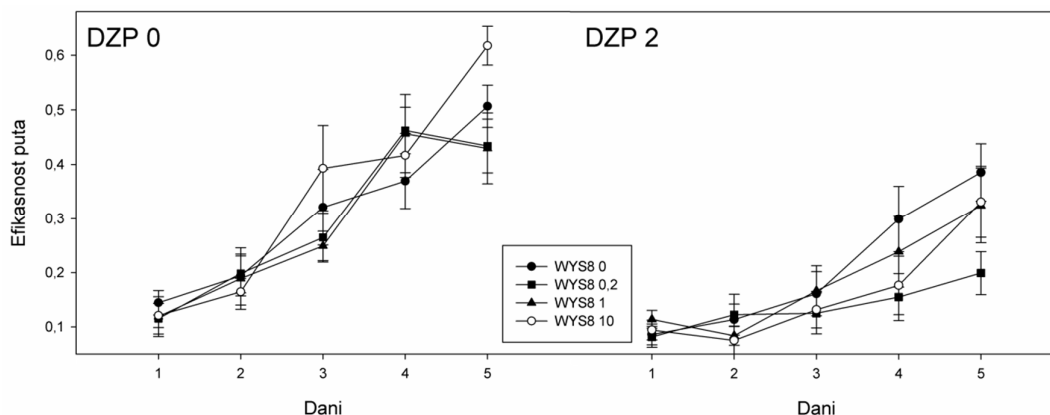
Slika 28. Uticaj WYS8 (0, 0,2, 1 i 10 mg/kg) u odsustvu (DZP 0, ●) i prisustvu 2 mg/kg diazepama (DZP 2, ■) na latenciju nalaska platforme tokom svakog od pet dana učenja u vodenom lavirintu. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na DZP 0 u okviru odgovarajućeg nivoa WYS8; † $p < 0,05$ u odnosu na grupu WYS8 0+DZP 2.

Nasuprot tome, ovaj efekat nije primećen kod pacova koji su primali kombinaciju diazepama i WYS8 (četvrtog dana sve doze WYS8, a petog doze 0,2 i 10 mg/kg). Štaviše, pacovi tretirani kombinacijom diazepama i WYS8 (0,2 i 10 mg/kg) su četvrtog dana imali značajno duže latencije od onih tretiranih samo diazepamom ($p=0,016$ i $p=0,011$, redom).

Trofaktorska interakcija (WYS8×diazepam×Dani) nije bila značajna ni za parametar efikasnosti puta ($F(10,244,191,227)=1,26$, $p=0,251$; Slika 27b). I u ovom slučaju postojao je značajan efekat diazepama ($F(1,56)=45,90$, $p<0,001$) i faktora Dani ($F(3,415,191,227)=78,15$, $p<0,001$), ali ne i WYS8 ($F(3,56)=0,89$, $p=0,451$). Jedina značajna interakcija bila je diazepam×Dani ($F(3,415,191,227)=7,10$, $p<0,001$). Kada smo ovu interakciju ispitali dvofaktorskom RM ANOVA–om pokazalo se da su pacovi tretirani diazepamom, od drugog dana nadalje, imali značajno manje efikasnosti puta u odnosu na kontrolnu grupu.

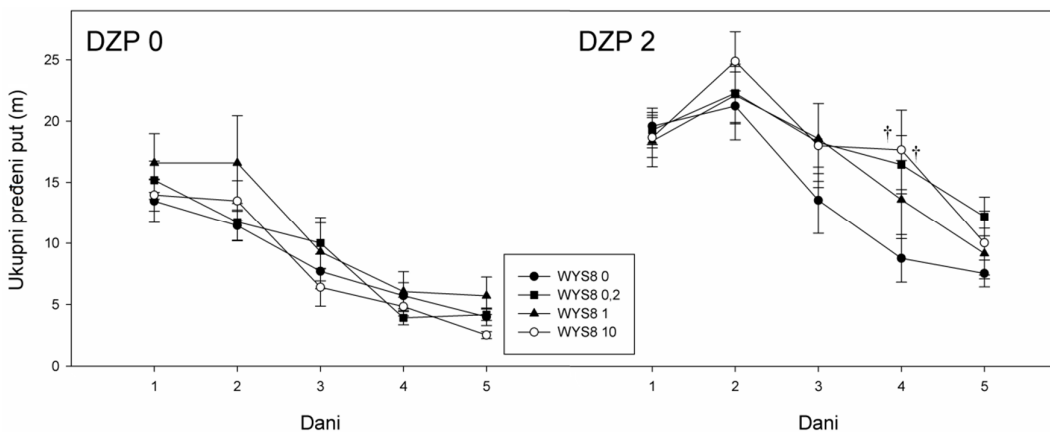
Analogno latenciji, kada je umesto faktora diazepam korišćen β -CCt (Slika 27b) trofaktorska interakcija nije bila značajna (WYS8× β -CCt×Dani, $F(12,224)=1,04$, $p=0,412$), a jedino su Dani bili signifikantan faktor ($F(4,224)=91,98$, $p<0,001$). Ovaj nalaz, kao i prethodni koji se odnosi na latenciju, potvrđuju da niti jedan od ova dva liganda *per se* nemaju uticaja na ponašanje pacova u vodenom lavirintu.

Dvofaktorska ANOVA (WYS8×diazepam) primenjena na ukupne podatke pokazala je statistički značajan uticaj diazepama na efikasnost puta u okviru svih nivoa WYS8. Ova statistička analiza, kao i ona sa podacima za svaki dan učenja pojedinačno, pokazala je da, za ovaj parametar, nije bilo značajne razlike između različitih nivoa WYS8 u okviru istog nivoa diazepama (Slika 29).



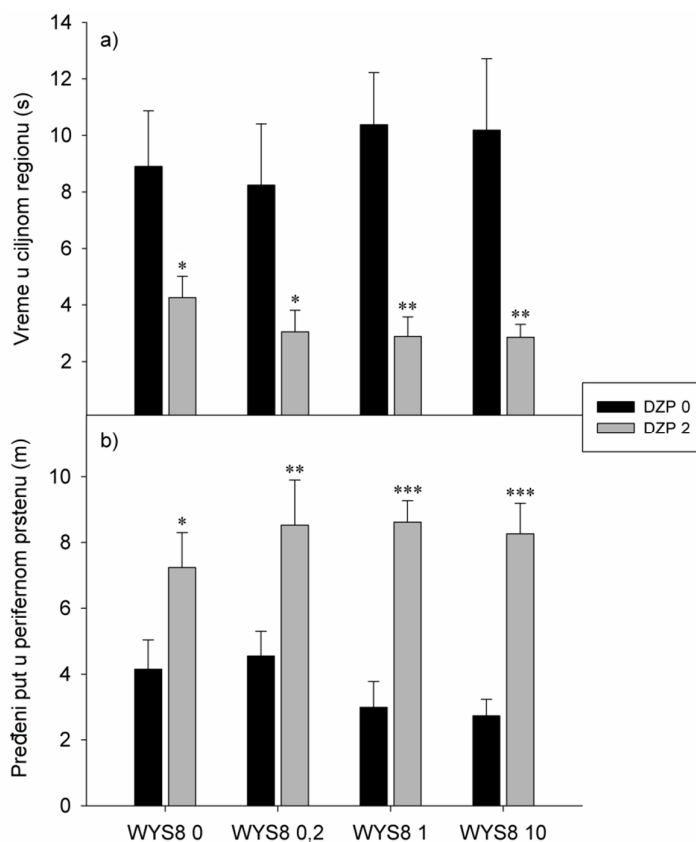
Slika 29. Uticaj WYS8 (0, 0,2, 1 i 10 mg/kg) u odsustvu (DZP 0) i prisustvu 2 mg/kg diazepam (DZP 2) na efikasnost puta tokom pet dana učenja.

Što se tiče ukupnog pređenog (preplivanog) puta tokom faze učenja, GLM RM analiza pokazala je da trofaktorska interakcija nije bila značajna (WYS8×diazepam×Dani, $F(8,684,162,101)=1,02$, $p=0,423$). Opet su značajni faktori bili diazepam ($F(1,56)=53,40$, $p<0,001$) i Dani ($F(2,895,162,101)=65,90$, $p<0,001$), ali ne i WYS8 ($F(3,56)=0,96$, $p=0,416$). Jedina statistički značajna interakcija bila je diazepam×Dani ($F(2,895,162,101)=4,06$, $p=0,009$). Analiza RM ANOVA–om otkrila je da su pacovi tretirani diazepamom (bez obzira na prisustvo WYS8) imali duže preplivane putanje od kontrolne grupe tokom svih pet dana učenja.



Slika 30. Uticaj WYS8 (0, 0,2, 1 i 10 mg/kg) u odsustvu (DZP 0) i prisustvu 2 mg/kg diazepam (DZP 2) na ukupni pređeni (preplivani) put tokom pet dana učenja. † $p<0,05$ u odnosu na WYS8 0+DZP 2.

Dvofaktorska ANOVA sa ukupnim podacima (WYS8×diazepam) otkrila je značajan efekat diazepama na ukupni pređeni put u okviru sva četiri nivoa WYS8. Ova statistička analiza, kao i ANOVA primenjena na svaki dan učenja pojedinačno, nisu otkrile statistički značajne razlike između različitih nivoa WYS8 u okviru istog nivoa diazepama, sa jednim važnim izuzetkom: četvrtog dana pacovi koji su primali diazepam i WYS8, u dozama od 0,2 i 10 mg/kg, imali su duže preplivane putanje od onih tretiranih samo diazepamom ($p=0,030$ i $p=0,019$, redom; Slika 30).



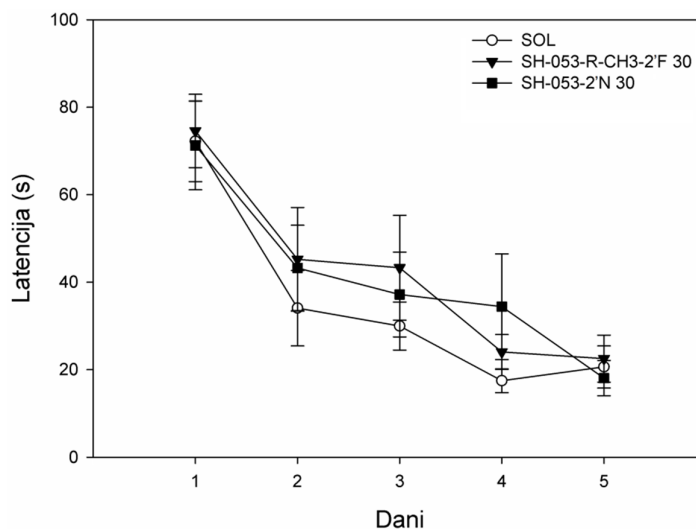
Slika 31. Uticaj WYS8 (0, 0,2, 1 i 10 mg/kg) u odsustvu (DZP 0) i prisustvu 2 mg/kg diazepama (DZP 2) na vreme provedeno u ciljnom regionu (a) i pređeni (preplivani) put u perifernom prstenu (b) tokom probnog testa. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ i * $p<0,001$ u odnosu na DZP 0 u okviru odgovarajućeg nivoa WYS8.**

Dvofaktorska ANOVA za parametre praćene tokom probnog testa (vreme provedeno u ciljnom regionu i pređeni put u perifernom prstenu) pokazala je signifikantan uticaj samo diazepama ($F(1,56)=30,02$, $p<0,001$ i $F(1,56)=50,88$, $p<0,001$, redom). *Post hoc* analiza (SNK test) je pokazala da su pacovi tretirani

diazepamom, *per se* i u kombinaciji sa WYS8, proveli značajno manje vremena u ciljnom regionu (Slika 31a) i iskazali su snažan tigmotaksični efekat, što se može proceniti kroz povećanje pređenog puta u perifernom prstenu (Slika 31b).

4.4.3. EKSPERIMENT 3

U skladu sa rezultatima prethodnog eksperimenta, i u eksperimentu sa ligandima slabe aktivnosti na α_1 GABA_A receptorima (SH-053-R-CH₃-2'F i SH-053-2'N, oba u dozi od 30 mg/kg), samo je faktor Dani, ali ne i faktor Tretman ili interakcija Tretman×Dani, bio statistički značajan za latenciju nalaska platforme (faktor Tretman, $F(2,84)=0,66$, $p=0,526$; faktor Dani, $F(4,84)=20,24$, $p<0,001$; Tretman×Dani interakcija, $F(8,84)=0,36$, $p=0,940$), pređeni put (Tretman, $F(2,84)=0,74$, $p=0,488$; faktor Dani, $F(4,84)=17,40$, $p<0,001$; Tretman×Dani, $F(8,84)=0,20$, $p=0,990$) i efikasnost puta (Tretman, $F(2,84)=0,93$, $p=0,410$; faktor Dani, $F(4,84)=14,75$, $p<0,001$; Tretman×Dani, $F(8,84)=0,54$, $p=0,821$). S obzirom da su rezultati slični za sve ispitivane parametre i pokazuju značajan uticaj samo faktora Dani, na Slici 32 predstavljena je samo latencija nalaska platforme.



Slika 32. Uticaj SH-053-2'N i SH-053-R-CH₃-2'F (oba u dozi od 30 mg/kg) na latenciju nalaska platforme tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu. Broj životinja po tretmanu bio je 8.

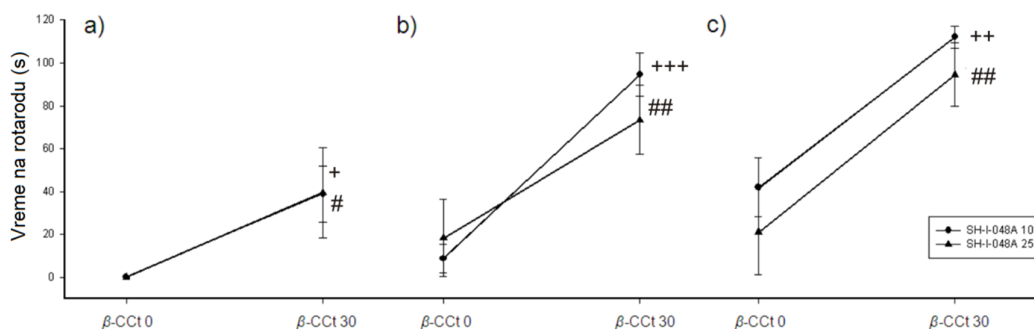
Post hoc poređenja nisu otkrila statistički značajne razlike među različitim nivoima tretmana tokom svakog od pet dana učenja u vodenom lavirintu. Takođe,

vrednosti parametara merenih tokom probnog testa za oba ispitivana liganda bile su bliske kontrolnim vrednostima.

4.5. ROTAROD

4.5.1. EKSPERIMENT 1

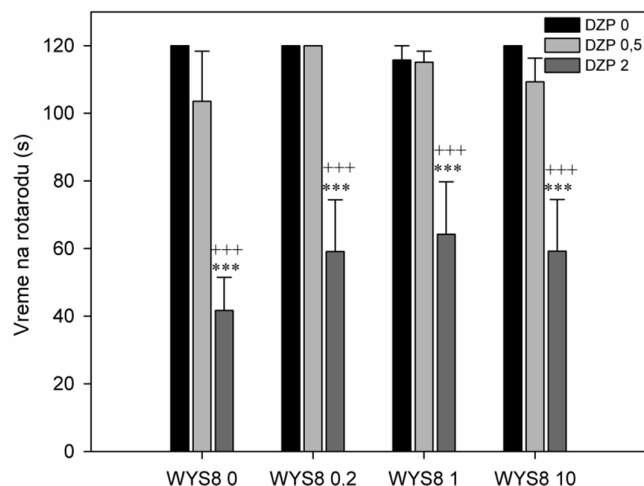
Kada su tri pojedinačne dvofaktorske ANOVA-e (SH-I-048A i β -CCt, kao faktori) primenjene na svaku od vremenskih tačaka, β -CCt je bio jedini statistički značajan faktor: (nakon 30 min: $F(1,24)=9,91$, $p=0,004$; nakon 60 min: $F(1,24)=30,02$, $p<0,001$ i nakon 90 min: $F(1,24)=26,38$, $p<0,001$). *Post hoc* analiza SNK testom pokazala je da je dodatak β -CCt-a svakoj od doza SH-I-048A (10 i 25 mg/kg) produžio vreme provedeno na pokretnom valjku nakon 30 min ($p=0,031$ i $p=0,040$, redom; Slika 33a), 60 min ($p<0,001$ i $p=0,008$, redom; Slika 33b), i konačno nakon 90 min ($p=0,001$ i $p=0,002$, redom; Slika 33c).



Slika 33. Uticaj SH-I-048A (10 i 25 mg/kg) u odsustvu (β -CCt 0) i prisustvu 30 mg/kg β -CCt-a (β -CCt 30) na vreme provedeno na rotarodu: a) 30 min, b) 60 min i c) 90 min nakon tretmana. + $p<0,05$, ++ $p<0,01$ i +++ $p<0,001$ u poređenju sa SH-I-048A 10 + β -CCt 0; # $p<0,05$ i ## $p<0,01$ u poređenju sa SH-I-048A 25 + β CCt 0. Broj životinja po tretmanu bio je 6–8.

4.5.2. EKSPERIMENT 2

Dvofaktorska ANOVA otkrila je statistički značajan uticaj diazepama kao faktora ($F(2,80)=49,75$, $p<0,001$), dok uticaj WYS8, kao i interakcije diazepam \times WYS8, nije bio značajan ($F(3,80)=0,77$, $p=0,530$ i $F(6,91)=0,38$, $p=0,890$, redom) (Slika 34).



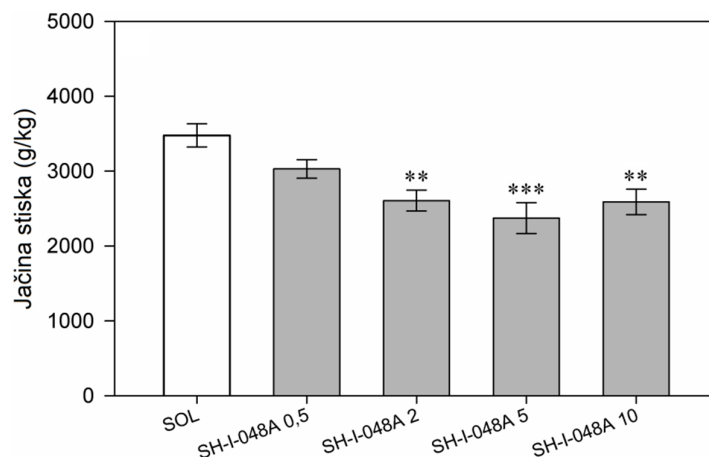
Slika 34. Uticaj diazepam (DZP; 0, 0,5 i 2 mg/kg) i WYS8 (0, 0,2, 1 i 10 mg/kg) na vreme provedeno na pokretnom valjku rotarod aparata. * $p < 0,001$ u odnosu na DZP 0 u okviru odgovarajućeg nivoa WYS8; +++ $p < 0,001$ u odnosu na DZP 0,5 u okviru odgovarajućeg nivoa WYS8. Broj životinja po tretmanu bio je 6–10, ukupno 92.**

Post hoc analiza je pokazala da primena diazepam, u dozi od 2 mg/kg, značajno otežava izvođenje rotarod testa, u poređenju sa druga dva dozna nivoa (0 i 0,5 mg/kg). Ovaj efekat diazepam bio je primetan bez obzira na prisustvo WYS8 (u bilo kojoj dozi) pokazujući na taj način da inkapacitirajući efekat diazepam nije bilo moguće umanjiti dodatkom parcijalnog agoniste sa visokom selektivnošću za α_1 GABA_A receptore.

4.6. TEST JAČINE STISKA

4.6.1. EKSPERIMENT 1

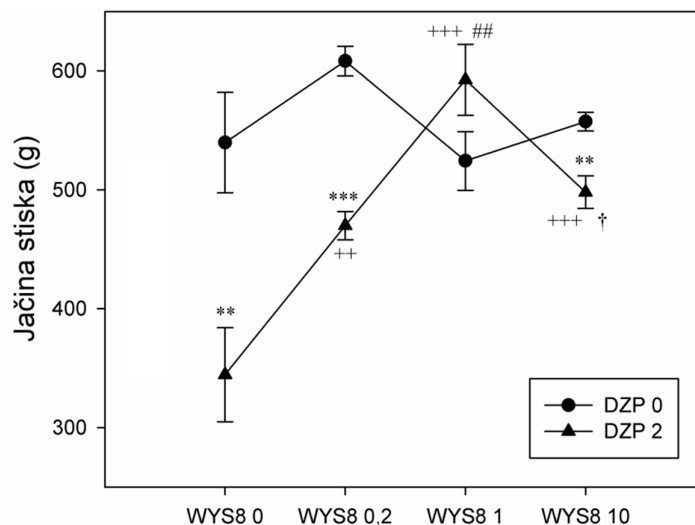
Jednofaktorska ANOVA otkrila je statistički značajan uticaj tretmana na jačinu stiska ($F(4,35)=7,48$, $p < 0,001$; Slika 35). *Post hoc* Dunnett–ov test pokazao je da su pacovi tretirani SH–I–048A (2, 5 i 10 mg/kg) imali izražen miorelaksantni efekat u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,002$, $p < 0,001$ i $p=0,002$, redom).



Slika 35. Uticaj SH-I-048A (0,5, 2, 5 i 10 mg/kg) na mišićni tonus u testu jačine stiska. ** $p < 0,01$ i * $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.**

4.6.2. EKSPERIMENT 2

Dvofaktorska ANOVA je pokazala da su i diazepam ($F(1,45)=22,03$, $p < 0,001$) i WYS8 ($F(3,45)=8,36$, $p < 0,001$) imali značajan uticaj na izvođenje testa jačine stiska (Slika 36). Kako je i interakcija između ova dva faktora bila takođe značajna ($F(3,45)=10,35$, $p < 0,001$), odlučili smo da primenimo jednofaktorske ANOVA-e (za svaki od dva nivoa diazepama) i Studentove t-testove (za svaki od četiri nivoa WYS8) kako bi u potpunosti ispitali glavne proste uticaje oba faktora. Koristeći ovakav pristup, pokazalo se da primena WYS8 ima efekat blizu statističke značajnosti u odsustvu diazepama ($F(3,24)=3,00$, $p=0,050$), ali značajan efekat u okviru 2 mg/kg diazepama ($F(3,21)=15,41$, $p < 0,001$). *Post hoc* analizom otkrivena je značajna razlika između svakog od nivoa WYS8, osim između 0,2 i 10 mg/kg WYS8. Primenom t-testova pokazana je statistički značajna razlika između dva nivoa diazepama u okviru svih nivoa WYS8, osim 1 mg/kg. Ovaj nalaz dokazuje da je moguće u potpunosti otkloniti inkapacitirajući efekat diazepama (2 mg/kg) primenom WYS8, ali samo u dozi od 1 mg/kg.

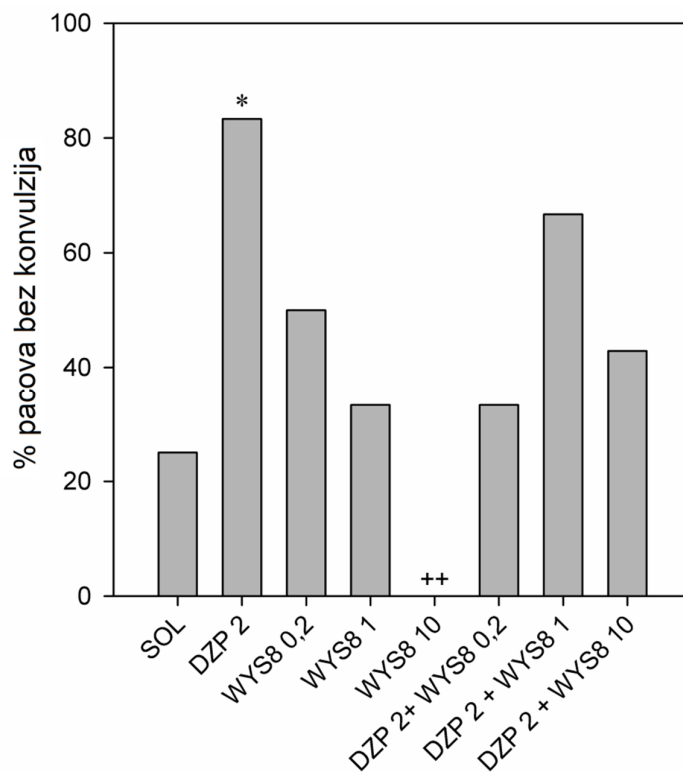


Slika 36. Uticaj WYS8 (0, 0,2, 1 i 10 mg/kg) u odsustvu (DZP 0; ●) i prisustvu 2 mg/kg diazepama (DZP 2, ▲) na mišićni tonus pacova u testu jačine stiska. ** $p<0,01$ i *** $p<0,001$ u odnosu na DZP 0 u okviru odgovarajućeg nivoa WYS8; ++ $p<0,01$ i +++ $p<0,001$ u odnosu na WYS8 0 + DZP 2 grupu; ## $p<0,01$ u odnosu na WYS8 0,2 + DZP 2 grupu; † $p<0,05$ u odnosu na WYS8 1 + DZP 2 grupu. Broj životinja u grupama bio je 6, sa izuzetkom WYS8 0,2 (n=10) i DZP 2 + WYS8 10 grupe (n=7).

4.7. PENTILENTETRAZOLSKI TEST

4.7.1. EKSPERIMENT 1

Primenom χ^2 testa uočena je razlika u frekvenci pojave kloničnih ili toničnih epileptičnih napada ($\chi^2=15,17$, $p=0,034$; Slika 37), dok je Fisher-ovim *post hoc* testom pokazan protektivan efekat diazepama u zaštiti od epileptičnih napada izazvanih pentilentetrazolom ($p=0,019$). S druge strane, WYS8, primenjen samostalno, nije doveo do pouzdane zaštite od ovih napada; štaviše, postojao je dozno-zavisani trend pogoršanja u ovom testu (rezultat Fisher-ovog testa za razliku između 0,2 i 10 mg/kg WYS8 bio je 0,093). Izostanak protektivnog efekta diazepama po dodatku WYS8 upućuje da je neophodna puna pozitivna modulacija GABA_A receptora koji sadrže α_1 podjedinicu za ispoljavanje antikonvulzivnog dejstva diazepama.



Slika 37. Procenat zaštićenih pacova (bez konvulzija) prethodno tretiranih rastvaračem (SOL), diazepamom (DZP; 2 mg/kg) ili WYS8 (0,2, 1 i 10 mg/kg), samostalno i u kombinaciji, u pentilentetrazolskom testu. Tačke predstavljaju srednje vrednosti. * $p < 0,05$ u odnosu na SOL grupu; ++ $p < 0,01$ u odnosu na DZP 2 grupu. Broj životinja u grupama bio je 6–12, ukupno 61.

5. DISKUSIJA

Ubrzo nakon otkrića supstanci benzodiazepinske strukture 60-tih godina prošlog veka, diazepam (Valium®) je postao jedan od najšire upotrebljivanih lekova, što je benzodiazepinima dodelilo glavnu ulogu u fenomenu koji je poznati britanski kliničar Peter Tyrer (1974) nazvao „medikalizacijom i trankvilizacijom svakodnevnog života i društva” (eng. *medicalization and tranquillization of everyday life and society*). Međutim, iako i dalje vrlo popularni lekovi, benzodiazepini se sa pojavom novijih terapijskih alternativa, kao što su selektivni inhibitori preuzimanja serotonina, u modernoj kliničkoj praksi propisuju sa mnogo više predostrožnosti, i može se konstatovati da više nisu lekovi prvog izbora za lečenje različitih anksioznih poremećaja (Argyropoulos i Nutt, 1999; Nash i Nutt, 2007; Bandelow i sar., 2013). Jedan od razloga jeste njihov sedativni potencijal koji se smatra nepoželjnim, ukoliko je terapijski cilj lečenje ovih poremećaja. Takođe, ovi lekovi dovode do fizičke zavisnosti tako da se po prekidu terapije mogu pojaviti znaci sindroma obustave, a poznato je i da benzodiazepini mogu biti lekovi zloupotrebe. Svi ovi nedostaci inspirisali su razvoj supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora, koji bi zadržali profil jednog anksiolitika i antikonvulziva, ali bez pratećih sedativnih i ataksičnih efekata ili mogućnosti razvoja zavisnosti (Iversen, 2004).

Razvoj selektivnih liganada se u velikoj meri oslanjao na rezultate studija na genetski modifikovanim miševima, koji su jasno ukazali na vezu između pojedinih podtipova GABA_A receptora i različitih efekata benzodiazepina. Tako su sedativni, amnezijски, ataksični i delom antikonvulzivni efekat diazepamata pripisani populaciji α_1 GABA_A receptora, anksiolitički α_2 -, a u određenim okolnostima i α_3 GABA_A receptorima, dok u posredovanju miorelaksantnog efekta učestvuju $\alpha_2/\alpha_3/\alpha_5$ GABA_A receptori (Rudolph i Möhler, 2004). Za razvoj tolerancije na sedativni efekat benzodiazepina i uticaj na određene memorijske procese odgovorni su GABA_A receptori koji sadrže α_5 podjedinicu (van Rijnsoever i sar., 2004), a za nastanak zavisnosti na njihovu primenu α_1 GABA_A receptori (Tan i sar., 2010).

Međutim, ovako dogmatski koncept ne oslikava realnu situaciju u složenom biološkom sistemu u kojem jedan efekat može zavisiti od aktivacije različitih podtipova

receptora, što je sigurno imalo uticaja i na izostanak očekivanog uspeha novosintetisanih liganada benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora (Skolnick, 2012). Takođe, poznato je da ovi elegantni eksperimenti funkcionišu po sistemu „sve ili ništa”, tako da inaktivacija čitave populacije jednog podtipa receptora tačkastom mutacijom ne može pomoći u identifikovanju bihejvioralnih efekata koji su rezultat delimične modulacije tog podtipa, niti onih koji su primarno posredovani drugim podtipom receptora (pogledati Morris i sar., 2006). Finu modulaciju moguće je uočiti ukoliko efekti diazepama posredovani određenim podtipom nisu u potpunosti onemogućeni tačkastom mutacijom, već samo inhibirani selektivnim ligandom. Eksperimenti koji predstavljaju osnovu disertacije upravo su usmereni ka ispitivanju bihejvioralnih efekata liganada selektivnih za pojedine podtipove GABA_A receptora, kao i povezivanju ovih *in vivo* efekata sa *in vitro* elektrofiziološkim profilima ispitivanih supstanci.

5.1. SH-I-048A

Nekoliko istraživačkih grupa, uključujući i našu, poslednjih godina publikovalo je rezultate istraživanja sa većim brojem liganada za benzodiazepinsko mesto vezivanja GABA_A receptora koji ispoljavaju *in vitro* selektivnost za jednu ili dve populacije receptora osetljivih na benzodiazepine, i koji po pravilu imaju smanjenu aktivnost na α_1 GABA_A receptorima (Griebel i sar., 2001; Mirza i sar. 2008; Savić i sar. 2010; Atack i sar. 2011). Njihovi *in vivo* profili bili su uglavnom u skladu sa rezultatima studija na genetski–izmenjenim miševima, koji su, kao nalaz od specifične kliničke težine, povezali motornu inkapacitaciju sa aktivacijom GABA_A receptora koji sadrže α_1 podjedinicu (Rudolph i Möhler, 2006). Istovremeno, razvijeno je više supstanci bez jasne selektivnosti u afinitetu ili efikasnosti na GABA_A receptorima (Rabe i sar., 2007; Auta i sar., 2010), ili čak dominantno aktivnih preko receptora koji sadrže α_1 podjedinicu (Lippa i sar., 2005; Popik i sar., 2006), ali koje su i dalje bile bez izraženog potencijala za izazivanje motornih deficita kod eksperimentalnih životinja.

Kako bi rasvetlili ove naizgled kontradiktorne nalaze, izvršili smo farmakološku karakterizaciju SH-I-048A, neselektivnog liganda izuzetno visokog, subnanomolarnog, afiniteta i efikasnosti na sva četiri podtipa GABA_A receptora osetljivih na benzodiazepine. Celokupno gledano, bihevioralna aktivnost ovog liganda bila je slična, ali ne i identična, efektima diazepama u dozi od 2 mg/kg, za koju postoji veliki broj podataka, između ostalih i iz naše laboratorije (npr. Savić i sar., 2009).

Principijelno je prihvaćeno da efekti posredovani određenim receptorima, pored afiniteta i efikasnosti, zavise od slobodne frakcije ispitivanog liganda, koja je dostupna na receptorima u jednom biološkom sistemu (Hammarlund–Udenaes, 2010; Read i Braggio, 2010). U našoj studiji sa SH-I-048A, koristili smo inovativni pristup koji podrazumeva poređenje slobodnih koncentracija u mozgu novog liganda i diazepama i njihovih elektrofizioloških podataka, dobijenih u istim eksperimentalnim uslovima. Procenjeni elektrofiziološki odgovori obe supstance izračunati su u odnosu na slobodnu frakciju, dobijenu iz ukupne koncentracije metodom brze ekvilibrijumske dijalize (neobjavljeni rezultati). Naime, slobodna koncentracija SH-I-048A u moždanom tkivu bila je oko 1,5%, dok je za diazepam iznosila oko 4,5%, što odgovara publikovanim

rezultatima (Dubey i sar., 1989). Na osnovu ove analize, pokazalo se da doza od 2 mg/kg diazepama približno odgovara pet puta većoj dozi SH-I-048A, nakon intraperitonealne primene u *Wistar* pacova. Koristeći ovaj nestandardan pristup, zapažene razlike u *in vivo* profilima mogu se povezati sa različitim procenjenim aktivnostima diazepama i SH-I-048A na rekombinantnim GABA_A receptorima. Najvažnija razlika između ove dve supstance u vezi je sa α_1 - i α_5 GABA_A receptorima, na kojima je SH-I-048A nešto aktivniji od diazepama.

SH-I-048A je, poput diazepama, dozno-zavisno uticao na parametre opšte motorne aktivnosti i koordinacije. Ipak, među parametrima lokomotorne aktivnosti statistička značajnost je postignuta samo za ukupno vreme provedeno u imobilnosti, i to za najvišu ispitivanu dozu od 10 mg/kg (koja približno odgovara dozi od 2 mg/kg diazepama), svedočeći o tome da sedativni potencijal ovog liganda nije izražen. Jačina stiska, koja predstavlja meru mišićnog tonusa, bila je umereno, ali signifikantno smanjena u dozama od 2 do 10 mg/kg. Imajući u vidu izostanak selektivnosti SH-I-048 u vezivanju za različite GABA_A receptore, ne može se sa sigurnošću tvrditi da su ova dva seta podataka u skladu sa postulatima da je aktivacija α_1 GABA_A receptora odgovorna za sedaciju, a α_2 - i α_3 GABA_A receptora za miorelaksantni efekat benzodiazepina (Rudolph i Knoflach, 2011).

Naši skorašnji rezultati pokazali su da je primena β -CCt-a, selektivnog neutralnog modulatora α_1 GABA_A receptora, u potpunosti antagonizovala oštećenje motorne koordinacije pacova u rotarod testu, koje izaziva diazepam (Milić i sar. 2012). Za razliku od ovih rezultata, antagonizujući efekat β -CCt-a na efekte SH-I-048A u istom testu bio je značajan, ali nedovoljan za kompletan oporavak pacova i kontrolu nad motornom koordinacijom. Ovaj nalaz se naročito odnosi na merenje nakon 30 min od primene kombinovanog tretmana, kada su pacovi provodili manje od 40 s na rotirajućem valjku, daleko manje od bazalne vrednosti (120 s). Kako je već naglašeno, pretpostavlja se da postoji sličnost između efekata SH-I-048A i diazepama posredovanih α_2 - i α_3 GABA_A receptorima, što indirektno upućuje da se razlike u bihevioralnim efektima uočene u ovom eksperimentu mogu pripisati populaciji GABA_A receptora koja sadrži α_5 podjedinicu, a koju SH-I-048A intenzivnije moduliše od diazepama.

Diazepam u određenom rasponu umerenih doza ispoljava anksiolitički efekat u uzdignutom plus-lavirintu, dok SH-I-048A, primenjen u širokom rasponu doza (0,5–10 mg/kg), nije značajno uticao na parametre koji se mogu povezati sa nivoom anksioznosti životinje. Važno je razjasniti da se tendencija ispoljavanja anksiolitičkog efekta, primećena nakon primene najviše doze SH-I-048A, nedvosmisleno može povezati sa deficitom u motornoj aktivnosti, uključujući sedaciju. Dakle, uticaj ispitivanog liganda na motorne funkcije, koji nastaje kao posledica pojačane aktivacije α_1 - i/ili α_5 GABA_A receptora (u poređenju sa efektima diazepama), vrlo verovatno je onemogućio ispoljavanje njegovog anksiolitičkog potencijala, posredovanog α_2 - i/ili α_3 GABA_A receptorima (Rudolph i Knoflach, 2011).

Rezultati ispitivanja uticaja SH-I-048A na ponašanje pacova u vodenom lavirintu pokazali su odsustvo tipičnih oštećenja prostorne memorije izazvanih primenom benzodiazepina tokom akvizicione faze i probnog testa. Ovaj nalaz se jasno razlikuje od prethodno objavljenih studija sa diazepamom, u kojima je pokazan njegov inkapacitirajući efekat na ponašanje pacova u vodenom lavirintu (Arolfo i Brioni, 1991; Savić i sar., 2009). Imajući u vidu značajnu aktivnost SH-I-048A na α_1 - i α_5 GABA_A receptorima, dvema populacijama za koje je dokazano da učestvuju u posredovanju efekata diazepama u ovom bihevioralnom modelu (Savić i sar., 2009), izostanak uticaja ispitivanog liganda na prostornu memoriju može se smatrati neočekivanim. Primećeno je da su pacovi tretirani dozom od 10 mg/kg SH-I-048A imali smanjenu reaktivnost, ali su se, po spuštanju u bazen i suočavanju sa zahtevnim i relativno averzivnim zadatkom, vrlo brzo oporavljali, pa stoga njihovo izvođenje nije bilo značajno lošije u poređenju sa kontrolnim životinjama. Iako naizgled neobjašnjiv u svetlu rezultata studija na transgenim miševima (Rudolph i Knoflach, 2011), izostanak bihevioralne aktivnosti SH-I-048A u vodenom lavirintu može se povezati sa skorašnjim nalazom da potencijacija α_5 GABA_A receptora povećava frekvencu okidanja kortikalnih neurona tokom perioda povećane neuronske aktivnosti (eng. *up states*) (Drexler i sar., 2013), koja se može očekivati prilikom izvođenja ovakvog tipa kognitivnog zadatka. S tim u vezi, ne može se isključiti da je izraženija aktivnost SH-I-048A na α_5 GABA_A receptorima, u poređenju sa diazepamom, doprinela nekoj vrsti kompenzacije deficita nastalog aktivacijom populacija receptora koje sadrže α_1 i α_5 podjedinicu, što je

konačno rezultovalo normalizacijom ponašanja pacova u vodenom lavirintu, zapaženom u našoj studiji.

U zaključku, čini se da male razlike u nivoima potencijacije pojedinih podtipova GABA_A receptora mogu prouzrokovati primetne razlike u bihevioralnim profilima benzodiazepina. Naime, s naše strane predloženo tumačenje razlika u elektrofiziološkim merenjima između SH-I-048A (10 mg/kg) i diazepama (2 mg/kg) odnosi se na potencijaciju α_1 i α_5 GABA_A receptora, što je očigledno bilo dovoljno da se ispolji jasna razlika u njihovim uticajima na ponašanje pacova u pojedinim testovima. Kao nalaz od posebnog značaja za profil SH-I-048A, ističemo izostanak anksiolitičkog efekta u uzdignutom plus-lavirintu i memorijskog deficita u vodenom lavirintu. Obe ove osobenosti mogle bi se povezati sa relativno većom aktivnošću ispitivanog liganda na α_1 i/ili α_5 GABA_A receptorima.

5.2. WYS8

Populacija GABA_A receptora koji sadrže α_1 podjedinicu procenjuje se na oko 50% svih GABA_A receptora (Olsen i Sieghart, 2008). Iako su studije sa genetski modifikovanim miševima, koristeći diazepam kao farmakološku alatku, dokazale dominantnu ulogu ovih receptora u procesima koji kontrolišu sedaciju, motornu koordinaciju i, delom, antikonvulzivni efekat (Rudolph i Möhler, 2004), rezultati ovih studija ne mogu se smatrati dovoljnim za objašnjenje kompleksnih nalaza dobijenih upotrebom nosintetisanih supstanci, praktično inaktivnih na α_1 GABA_A receptorima (Skolnick, 2012). Kako bi se ovo pitanje dalje razjasnilo čini se da je neophodno primeniti i selektivnu modulaciju efekata standardnih benzodiazepina na ovim receptorima koristeći divlje sojeve pacova.

Eksperimenti u kojima su određivane koncentracije WYS8 i diazepama u serumu i moždanom tkivu pokazali su da WYS8, primenjen u dozi od 10 mg/kg 20 min pre žrtvovanja životinje, dostiže koncentracije u mozgu od približno 100 nM, dok diazepam, u dozi od 2 mg/kg, dostiže 10 puta veće koncentracije (oko 1 μ M), što predstavlja vrednost uporedivu sa prethodno publikovanim rezultatima (Hironaka i sar.

1984; Friedman i sar. 1986). Dodatno, na osnovu rezultata statističke analize može se zaključiti da nije bilo međusobnog uticaja WYS8 i diazepama na njihovu kinetiku u serumu ili mozgu, kako nakon jednog, tako i nakon četiri dana tretmana.

Rezultati *in vitro* studija pokazali su da se WYS8 može smatrati slabim parcijalnim agonistom visoko selektivnim za α_1 GABA_A receptore (pogledati 1.5.2.1.). Stoga, iako zaravnjenje krivâ efikasnosti onemogućava precizno izračunavanje EC₅₀ vrednosti, neophodne su približno 10–100 puta veće koncentracije WYS8 za dostizanje ekvivalentnih efekata na α_3 – u poređenju sa α_1 GABA_A receptorima pri nižim koncentracijama (10–100 nM), što odgovara i odnosu njihovih afiniteta (oko 105 puta niži afinitet za α_3 nego za α_1 GABA_A receptore; Yin i sar., 2010). Dodatni eksperimenti otkrili su da WYS8 nema značajnu aktivnost na α_4 – i α_6 GABA_A receptorima, kao i da se potencijacija rekombinantnih $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptora ne razlikuje značajno od α_1 GABA_A receptora koji sadrže β_1 ili β_2 podjedinicu (Joksimović i sar., u štampi). Ovim su potvrđeni prethodni nalazi da β podjedinica nema presudan uticaj na efekte benzodiazepina posredovane GABA_A receptorima (Hadingham i sar. 1993).

Iako je potpuno jasno da se na osnovu ukupne koncentracije u moždanom tkivu ne može predvideti okupiranost receptora (Watson i sar., 2009), koncentracije dobijene nakon primene najviše doze WYS8 (10 mg/kg) sugerišu da se ova supstanca nije mogla značajnije vezati za druge podtipove GABA_A receptora, osim naravno onih koji sadrže α_1 podjedinicu. Naime, odnosi između ukupne koncentracije WYS8 u moždanom tkivu (približno 100 nM) i njegovih *in vitro* dobijenih afiniteta za α_2 –, α_3 – i α_5 GABA_A receptore (K_i vrednosti, redom: 111, 102 i 208 nM; Yin i sar., 2010) konzistentno su niži od vrednosti 1. Poznato je da su tako niske vrednosti pomenutih odnosa povezane sa niskim nivoima okupiranosti, ne samo receptora za benzodiazepine (daleko ispod 50%; Scott–Stevens i sar., 2005), već i D₂ receptora (Watson i sar., 2009), kao i transportera za preuzimanje serotonina i dopamina (Liu i sar., 2009).

Elektrofiziološki eksperimenti, osmišljeni sa ciljem ispitivanja efekata kombinacije WYS8 i diazepama, otkrili su da je WYS8 u koncentraciji od 100 nM u potpunosti inhibirao povećanje protoka negativno naelektrisanih jona kroz $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ GABA_A receptore, koje je indukovano primenom diazepama (Joksimović i sar., u štampi; Slika

10). Sličan efekat je identifikovan i nakon primene 10 puta veće (1 μ M), ali ne i 10 puta niže koncentracije WYS8 (10 nM), što ukazuje da antagonizujući efekat WYS8 očekivano zavisi od koncentracije ispitivane supstance. Posmatrajući *in vitro* rezultate u celini, čini se da funkcionalni profil WYS8 (efikasnost) potkrepljuje vrednosti njegovih afiniteta (Yin i sar. 2010), potvrđujući tako da se radi o najselektivnijem ligandu za α_1 GABA_A receptore.

U testu spontane lokomotorne aktivnosti WYS8 je pokazao samo naznake sedativnog efekta, i to u najvišoj primenjenoj dozi (10 mg/kg). Uzimajući u obzir dobijene koncentracije WYS8 u moždanom tkivu pacova i *in vitro* profil ove supstance, može se zaključiti da se blagi stepen sedacije može povezati sa relativno niskom potencijacijom α_1 GABA_A receptora. S druge strane, komparabilan stepen aktivacije ovih receptora jednim drugim parcijalnim agonistom (MRK-409) najverovatnije jeste uticao na pojavu sedacije u ljudi, što predstavlja nalaz koji nije primećen prethodno, tokom studija na eksperimentalnim životinjama (Atack i sar., 2011).

U kombinaciji sa diazepamom, WYS8 je jasno pokazao sposobnost atenuacije hipolokomotornog (sedativnog) efekta diazepama, barem kada se posmatra ukupna aktivnost tokom 45 min praćenja testa. Naime, postojao je interval (između 5. i 10. min od početka testa) kada je sedacija bila primetna bez obzira na prisustvo WYS8. Za razliku od WYS8, njegov hemijski analog β -CCt u potpunosti je antagonizovao efekte diazepama u istom testu, bez značajnijih efekata *per se* (Savić i sar., 2009), što, ukupno uzev, ukazuje na jasnu razliku između efekata neutralne i parcijalne pozitivne modulacije α_1 GABA_A receptora.

U skladu sa povećanom averzivnošću uzdignutog plus-lavirinta i pretpostavljenom višom bazalnom aktivnošću eksperimentalnih životinja u poređenju sa testom spontane lokomotorne aktivnosti (Hogg, 1996), diazepam nije izazvao značajniji uticaj na parametre aktivnosti. Međutim, kada je primenjen sa WYS8, naročito u najvišoj dozi od 10 mg/kg, došlo je do značajnog smanjenja lokomotorne aktivnosti. Iako *in vitro* podaci nesumnjivo pokazuju da WYS8 može značajno smanjiti potencijaciju α_1 GABA_A receptora koju izaziva diazepam, čini se da primena WYS8, u zavisnosti od

bihevioralnog testa i vremenskog intervala, može povećati, smanjiti ili biti bez uticaja na sedativni efekat diazepama.

U ranijim ispitivanjima pokazano je da selektivni antagonist α_1 GABA_A receptora β -CCt može potencirati anksiolitički efekat midazolama u uzdignutom plus-lavirintu (Savić i sar., 2004). Ipak, postoje i oprečni nalazi koji ukazuju da β -CCt uspešno antagonizuje ove efekte benzodiazepina (Griebel i sar., 1999; Belzung i sar., 2000). Sadašnji rezultati pokazuju da primena najniže testirane doze WYS8 (0,2 mg/kg) može razotkriti anksiolitičku aktivnost veće doze diazepama, dok je u kombinaciji sa nižom dozom efekat bio suprotan: početna blaga hiperlokomocija i primetno, ali ne i statistički značajno, povećani parametri povezani sa anksiolitičkim efektom svedeni su pri primeni kombinacije na kontrolni nivo. Efekti WYS8 bi se mogli objasniti smanjenjem ukupne aktivnosti na α_1 GABA_A receptorima kroz kompeticiju za ista vezna mesta, kao i relativnim smanjenjem receptora okupiranih punim agonistom, kakav je diazepam. Ovaj nalaz ukazuje da efekti posredovani α_1 GABA_A receptorima (sedacija je najverovatnije dominantan uticaj) mogu otežati ispoljavanje anksiolitičkog efekta diazepama, koji je posredovan drugim podtipovima receptora. Dodatno, ne može se isključiti mogućnost da određena aktivacija samih α_1 GABA_A receptora može direktno doprineti anksiolitičkom dejstvu benzodiazepina (pogledati Lippa i sar., 2005).

Iako se Morisov vodeni lavirint odlikuje relativno jednostavnom procedurom izvođenja, on zapravo uključuje širok spektar sofisticiranih memorijskih procesa i predstavlja zahtevan zadatak za glodare (Terry, 2001). Koristeći ovaj bihevioralni model, naša grupa je pokazala da se oštećenje učenja koje izaziva diazepam može u potpunosti antagonizovati primenom visoko selektivnog antagoniste β -CCt-a (Savić i sar., 2009). Novosintetisana supstanca (WYS8), hemijski srodna pomenutom antagonisti, ali sa još većom selektivnošću za α_1 GABA_A receptore (Yin i sar., 2010), nije ispoljila slične efekte u kombinaciji sa diazepamom.

Kao što je i očekivano, diazepam (2 mg/kg) je izazvao deficit učenja u vodenom lavirintu: doveo je do povećanja latencije nalaska platforme i ukupnog preplivanog puta, kao i smanjenja efikasnosti puta tokom pet dana učenja (akviziciona faza). Opšte je poznata činjenica da benzodiazepini, pa tako i diazepam, ispoljavaju snažnu anterogradnu amneziju u vodenom lavirintu (McNamara i Skelton, 1991; Savić i sar.,

2009). Verzija vodenog lavirinta korišćena u našim eksperimentima omogućava izučavanje proceduralne, ali i deklarativne memorije, koja veoma zavisi od aktivacije hipokampusa (Izquierdo i sar., 2006). Uprkos činjenici da se ove dve komponente memorije teško mogu razdvojiti, naši rezultati pokazuju da diazepam oštećuje i proceduralnu (može se proceniti parametrom kao što je vreme provedeno u perifernom prstenu) i deklarativnu memoriju (može se proceniti parametrom efikasnosti puta).

Kombinovanje parcijalnih i punih agonista ne može se smatrati novim konceptom u bihevioralnoj neurofarmakologiji benzodiazepina. Kao najbolji primer može se navesti antagonizovanje različitih efekata punih agonista benzodiazepinskog mesta vezivanja ko-aplikacijom neselektivnog parcijalnog agoniste bretazenila (Griebel i sar., 1999; Auta i sar., 1995; Smith i sar., 2004). Slična konstatacija može se primeniti i na flumazenil koji se već dugi niz godina koristi kao antagonist u kliničkim uslovima, ali zapravo poseduje određenu parcijalno-agonističku aktivnost na α_2 - i α_3 GABA_A receptorima (Ramerstorfer i sar., 2010). Primenjen samostalno, WYS8 nije ispoljio značajnije efekte u vodenom lavirintu, što je u saglasnosti sa rezultatima njegovog hemijskog srodnika, β -CCt-a. Međutim, dok je β -CCt skoro u potpunosti otklonio negativan uticaj diazepama na prostorno učenje u vodenom lavirintu (Savić i sar., 2009), kombinovanje WYS8 i diazepama generalno nije uticalo na bihevioralne efekte diazepama, dokazujući izrazitu razliku između uticaja antagoniste i parcijalnog agoniste, oba veoma selektivna za α_1 GABA_A receptore, na efekte koje diazepam ispoljava u vodenom lavirintu.

Parametri mereni tokom poslednja dva dana učenja (latencija i efikasnost puta) pokazali su da je došlo do razvoja jedne vrste tolerancije tj. određenog smanjenja uticaja diazepama na ponašanje pacova u vodenom lavirintu. S druge strane, McNamara i Skelton (1997) su otkrili da se tolerancija na efekte diazepama u vodenom lavirintu nije razvila niti nakon 15 dana primene; ova diskrepancija mogla bi se delom objasniti razlikom u primenjenim dozama, kao i samim protokolima testova. Opšte posmatrano, tolerancija koja se javlja nakon ponavljane primene benzodiazepina pre se može povezati sa promenom u broju GABA_A receptora nego sa njihovom kinetikom (Bateson, 2002). Ipak važno je istaći da se termin „ponavljana primena” u farmakologiji često veoma različito interpretira. Na primer, nakon samo 7 dana primene flurazepama, vezivanje radioobeležnog zolpidema je smanjeno za 23% u cerebelumu i 14% u

hipokampusu, što upućuje na brzo smanjenje broja α_1 GABA_A receptora u mozgu pacova (Wu i sar., 1995). Na osnovu utroška glukoze u mozgu pacova Pratt i sar. (1998) su pokazali da se parcijalna ili čak kompletna tolerancija može javiti u različitim regionima mozga nakon svega tri dana primene diazepama. Konačno, za određene bihejvioralne parametre opisan je i fenomen brze tolerancije nakon primene tri (File i Fernandes, 1994) ili samo jedne doze benzodiazepina (Khanna i sar., 1998).

Kompleksni efekti kombinacije WYS8 i diazepama u vodenom lavirintu ne mogu se jednostavno objasniti. Ipak, može se pretpostaviti da je diazepam (2 mg/kg) pojačao ne samo inhibiciju primarnog (piramidalnog) neurona, uzrokujući na taj način pogoršanje izvođenja ovog testa, već i inhibiciju inhibitornog neurona, smanjujući tako ukupnu inhibiciju primarnog neurona i izazivajući dalje pogoršanje efikasnosti učenja. Ova hipoteza može objasniti zašto svi parametri pokazuju da je kombinacija diazepama i WYS8 (0,2 mg/kg) najsnažnije uticala na ponašanje pacova u vodenom lavirintu. Umesto da dovede do smanjenja efekata punog agoniste, barem u maloj meri, ova doza parcijalnog agoniste ih je potencirala. Jedno od objašnjenja ovog neočekivanog efekta može biti da niske koncentracije WYS8 nisu bile dovoljne za drastično smanjenje efekata diazepama na primarnom neuronu (najverovatnije zbog više nego dovoljne stimulacije receptora kojih ima u većoj gustini), ali ipak dovoljne da smanje inhibiciju inhibicije, time prouzrokujući potencijaciju ukupnog efekta glavnog neurona. U dozi od 1 mg/kg WYS8, direktni efekat diazepama na glavni neuron je najverovatnije delimično smanjen, na šta ukazuju značajno smanjene latencije u poređenju sa druge dve kombinacije WYS8 i diazepama. Konačno, povećanje latencije uzrokovano primenom kombinacije diazepama i najviše doze, a koje prevazilazi efekte samog diazepam, moglo bi se objasniti značajnim parcijalno–agonističkim dejstvom WYS8 na α_1 GABA_A receptorima, na taj način dovodeći do povećane inhibicije glavnog neurona i dodavajući tako na efekte samog diazepama na ostale podtipove GABA_A receptora. Ovi dodatni receptori koji su od značaja za GABA–ergičku modulaciju najverovatnije pripadaju populaciji koja sadrži α_5 podjedinicu (Collinson i sar., 2006; Savić i sar., 2010). Teško je očekivati da je ovaj podtip GABA_A receptora bio značajno aktiviran čak ni kada je WYS8 primenjen u dozi od 10 mg/kg, što može objasniti zašto je ova doza WYS8 *per se* bila bihejvioralno neaktivna, u odnosu na kombinaciju sa diazepamom.

Analiza parametara merenih tokom probnog testa pokazala je da su pacovi tretirani, kako samim diazepamom, tako i kombinacijom diazepama i WYS8, pokazali izrazito oštećenje prostornog učenja i pamćenja. Suprotno efektima novog liganda, β -CCt je u najmanju ruku prevenirao deficite u vodenom lavirintu koje izaziva diazepam, makar tokom probnog testa (Savić i sar., 2009). Kako je diazepam, bez obzira na prisustvo WYS8, značajno uticao i na vreme provedeno u ciljnom regionu i pređeni put u perifernom prstenu (procenjeno aktivnošću na periferiji bazena), čini se da je oštećenje proceduralne komponente memorije značajno uticalo na opštu bihevioralnu aktivnost u probnom testu vodenog lavirinta. Dakle, pacovi koji su se naizgled adaptirali na inkapacitane efekte diazepama tokom poslednje faze akvizicione faze, nisu bili u stanju da pronađu originalnu poziciju platforme u probnom testu. Objasnjenje ove činjenice može se pronaći u efektima benzodiazepina na strategiju plivanja u probnom testu (Cain, 1998), kao i razlici u samoj prirodi probnog testa i akvizicionih sesija (Vorhees i Williams, 2006).

Ovi rezultati dokazuju da su GABA_A receptori koji sadrže α_1 podjedinicu od najvećeg značaja u posredovanju efekata benzodiazepina na ponašanje pacova u vodenom lavirintu. Dok se deficiti u prostornom učenju koje izaziva diazepam mogu antagonizovati primenom α_1 selektivnog antagonist, parcijalni agonist na istim receptorima bio je bez sličnih efekata. Stoga, jasno je da suptilna razlika u stepenu aktivacije α_1 GABA_A receptora može značajno uticati na prostorno učenje u vodenom lavirintu.

Rotarod predstavlja jedan od najkorišćenijih testova za procenu uticaja psihotropnih supstanci na motornu koordinaciju u pacova. Studije na majmunima (Licata i sar., 2009; Platt i sar., 2002) i *knock-in* miševima (McKernan i sar., 2000) pokazale su da je gubitak motorne koordinacije, izazvan primenom diazepama, prevashodno posredovan aktivacijom α_1 GABA_A receptora. Naši rezultati su pokazali da β -CCt može u potpunosti antagonizovati ataksično dejstvo diazepama, ali i zolpidema (Milić i sar., 2012). Step en pozitivne modulacije α_1 GABA_A receptora koji izaziva WYS8, primenjen samostalno, nije dovoljan za izazivanje ataksije, dok u kombinaciji sa diazepamom nije dovoljan čak ni za blagu korekciju ovog efekta diazepama. Izostanak barem slabog antagonističkog efekta WYS8 pomalo je iznenađujući, naročito imajući u vidu *in vitro*

rezultate prema kojima je WYS8 značajno smanjio aktivaciju α_1 GABA_A receptora izazvanu diazepamom. Ovi dokazi pokazuju da neki drugi podtipovi GABA_A receptora, pored onih koji sadrže α_1 podjedinicu, mogu doprineti ataksiji, naročito u slučaju kada postoji umeren nivo aktivacije α_1 GABA_A receptora.

Studija sa primenom β -CCt-a kod majmuna (Licata i sar., 2009) indirektno je podržala zaključke studije sa *knock-in* miševima da su α_2 - i, u manjoj meri, α_3 GABA_A receptori predominantno uključeni u posredovanje miorelaksantnog efekta benzodiazepina (Crestani i sar., 2001). U našim rezultatima testa jačine stiska, WYS8 nije pokazao efekat *per se*, ali je, naročito u dozi od 1 mg/kg, umanjio miorelaksantni efekat diazepama (2 mg/kg); ovaj nalaz sličan je efektima β -CCt-a u istom testu (Milić i sar., 2012). Rezultati nešto drugačijeg testa u miševa (eng. *loaded grid test*) pokazali su da β -CCt može značajno smanjiti miorelaksantni efekat diazepama primenjenog u srednjoj dozi od 3 mg/kg, ali ne u dozama od 1 mg/kg ili 10 mg/kg (Griebel i sar., 1999). Imajući sve ove nalaze u vidu, naši rezultati potvrđuju da miorelaksacija jeste posredovana α_2 - i α_3 GABA_A receptorima, ali takođe i da je na određeni način regulisana aktivacijom α_1 GABA_A receptora, što najverovatnije zavisi od nivoa aktivacije sva tri podtipa GABA_A receptora.

Rezultati pentilentetrazolskog testa otkrili su da antikonvulzivni efekat diazepama iščezava u trenucima kada je aktivacija α_1 GABA_A receptora smanjena dodatkom WYS8. Štaviše, WYS8, primenjen u najvišoj dozi od 10 mg/kg, pokazao je čak i naznaku prokonvulzivnog efekta. U svojoj studiji sa miševima, Griebel i sar. (1999) su pokazali da β -CCt nije uticao na protektivni efekat diazepama na konvulzije izazvane pentilentetrazolom. Uzimajući u obzir rezultate o antikonvulzivnoj aktivnosti pojedinih supstanci sa smanjenom efikasnošću na α_1 GABA_A receptorima (Atack i sar., 2006; Rivas i sar., 2009), čini se da α_1 GABA_A receptori mogu imati određeni permisivan uticaj na antikonvulzivnu aktivnost benzodiazepina, koja je posredovana drugim podtipovima GABA_A receptora: efekat može biti prisutan kada su ovi receptori potencirani snažno ili nisu potencirani uopšte, pre nego u slučaju parcijalnog efekta.

5.3. SH-053-2'N, JY-XHE-053 I SH-053-R-CH3-2'F

Veliki broj podataka iz studija sa genetski izmenjenim životinjama (Rudolph i Möhler, 2006), kao i farmakoloških eksperimenata (npr. Savić i sar., 2009), podržava dalju potragu za novom generacijom pozitivnih alosternih modulatora GABA_A receptora, oslobođenih tereta neželjenih efekata benzodiazepina u kliničkoj praksi. Smatra se da su GABA_A receptori koji sadrže α_1 podjedinicu, u skladu sa svojom širokom distribucijom (Sieghart i Sperk, 2002), najodgovorniji za većinu neželjenih dejstava benzodiazepina, tako da se eventualno smanjenje aktivnosti ovih receptora pokazalo kao najprivlačniji i najracionalniji pristup (Whiting, 2006). Naši eksperimenti fokusirani su na novosintetisane supstance (SH-053-2'N, JY-XHE-053 i SH-053-R-CH3-2'F), koji kao zajedničku osobinu upravo imaju nizak afinitet i slabu parcijalno-agonističku aktivnost na α_1 GABA_A receptorima. Takođe, pozitivna modulacija ovih receptora manje je izražena u poređenju sa drugim podtipovima GABA_A receptora osetljivim na benzodiazepine. Ne uzimajući u obzir međusobne suptilne razlike u *in vitro* i *in vivo* farmakološkim profilima ovih supstanci, naša istraživanja su pokazala da čak i kod liganada sa smanjenom efikasnošću na α_1 GABA_A receptorima sedativni potencijal nije u potpunosti nestao. Takođe, poremećaji učenja i pamćenja u vodenom lavirintu, koji se uobičajeno mogu zapaziti kod klasičnih benzodiazepina, u potpunosti su izostali, što predstavlja veoma važan nalaz sprovedenih studija.

Sve tri ispitivane supstance sa smanjenom aktivnošću na α_1 GABA_A receptorima ispoljile su određeno smanjenje lokomotorne aktivnosti, što se može objasniti na dva načina. Prvo, kako nedostatak podataka o *ex vivo* okupiranosti pojedinih receptora onemogućava donošenje definitivnih zaključaka o aktivnosti na GABA_A receptorima koji sadrže α_1 podjedinicu – a koji su, prema genetskim (Rudolph i sar., 1999) i farmakološkim studijama (Savić i sar., 2009), dominantno uključeni u posredovanje sedativnog efekta – ne može se isključiti mogućnost da verovatna slaba do umerena pozitivna modulacija ovih receptora može biti dovoljna za ispoljavanje sedacije (uporediti sa Grimwood i Hartig, 2009). Drugo, postoje neuroanatomski dokazi koji ukazuju na moguću ulogu α_5 GABA_A receptora u kontroli motorne aktivnosti (Bohlhalter i sar., 1996; Pirker i sar., 2000; Yamada i sar., 2007).

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da postoji određena funkcionalna povezanost između α_5 GABA_A receptora i onih koji sadrže α_1 podjedinicu. Naša grupa je prethodno pokazala da se promena u lokomotornoj aktivnosti, koju indukuju ligandi sa značajnom efikasnošću na α_5 GABA_A receptorima, može povezati sa ovim podtipom receptora (Savić i sar., 2008). Važno je pomenuti da je kod miševa sa *knock-in* mutacijom na α_5 podjedinici otežan razvoj tolerancije na sedativni efekat diazepama nakon ponavljane primene (van Rijnsoever i sar., 2004). Štaviše, primena antagonist selektivnog za α_5 GABA_A receptore (XLI093), u dozi koja najverovatnije prouzrokuje kompletan antagonizam efekata diazepama, potencirala je njegov sedativni efekat (Savić i sar., 2009). Stoga se može pretpostaviti da pozitivna modulacija α_5 GABA_A receptora može imati dvojne efekte: da limitira sedativne efekte koji su posledica supra-fiziološke stimulacije α_1 GABA_A receptora (npr. punim agonistima), i suprotno, da pojačava slabu aktivaciju ovih receptora (npr. parcijalnim agonistima), i, na taj način, indukuje slabu sedaciju (Savić i sar., 2009). Ovakav vid modulacije može se postići ukoliko su neuroni uključeni u sedativne efekte snažno modulirani α_1 i nešto slabije α_5 GABA_A receptorima, i ukoliko je sinapsa ili neuron, koji posreduje u modulaciji α_1 GABA_A receptora, istovremeno blago regulisan α_5 GABA_A receptorima. Direktnom aktivacijom prvih α_5 GABA_A receptora bi se tako mogla povećati relativno niska aktivacija α_1 GABA_A receptora na istom neuronu, dok bi pojačana aktivacija drugih α_5 GABA_A receptora indirektno smanjila snažan sedativni efekat uzrokovan aktivacijom α_1 GABA_A receptora. Ovakav scenario bi, barem delom, objasnio neočekivani nalaz na miševima sa nedostatkom α_1 podjedinice (*knock-out*) koji su pokazali povećanu osetljivost na hipolokomotorni efekat i gubitak refleksa uspravljanja nakon primene diazepama (Kralic i sar., 2002).

Razlike u ispoljavanju anksiolitičkog efekta koje smo uočili nakon primene supstanci testiranih u ovim eksperimentima ne mogu se jednoznačno posmatrati. Sa svoje strane, studije na genetski modifikovanim životinjama su jasno pokazale da je u posredovanju anksiolitičkog efekta benzodiazepina uloga GABA_A receptora koji sadrže α_2 podjedinicu od presudnog značaja (Löw i sar., 2000). Dodatno, rezultati sa relativno selektivnim ligandom za α_3 GABA_A receptore pokazali su da ovaj podtip receptora takođe učestvuje u modulaciji anksiolitičkih uticaja, naročito pri visokim nivoima

okupiranosti (Dias i sar., 2005). U skladu sa pomenutim studijama, supstanca sa određenom selektivnošću u efikasnosti na α_5 GABA_A receptorima (SH-053-R-CH3-2'F) bila je bez primetnog potencijala za ispoljavanje anksiolitičkog efekta, što je, nešto ranije, pokazano i sa drugom supstancom sličnog profila—SH-053-R-CH3 (Savić i sar., 2008). Ipak, JY-XHe-053, supstanca sa relativno visokim afinitetima i efikasnostima na α_2 i α_3 GABA_A receptorima, takođe je bila bez merljivog uticaja na nivo anksioznosti eksperimentalne životinje. Zbog poređenja rezultata ove supstance sa SH-053-2'N i ranije publikovanom supstancom SH-053-S-CH3-2'F (pogledati Savić i sar., 2008), mora se konstatovati da JY-XHe-053 ima veći afinitet za α_1 -, i naročito α_5 GABA_A receptore, sa značajnom potencijacijom ovih receptora već pri koncentraciji od 100 nM (169%, odnosno 220%). S obzirom da je JY-XHe-053 izazvao hipolokomotorni efekat u dozama (10 mg/kg i više) nižim nego što je to bio slučaj sa SH-053-2'N ili SH-053-S-CH3-2'F (30 mg/kg), postoji mogućnost da je njegova aktivnost na α_1 - i α_5 GABA_A receptorima maskirala očekivani anksiolitički efekat, posredovan primarno α_2 - i α_3 GABA_A receptorima. U poređenju sa diazepamom, jasno je da JY-XHe-053 pokazuje veći afinitet za podtip GABA_A receptora koji sadrži α_5 podjedinicu. Samim tim, određeni prioritet u aktivaciji α_5 GABA_A receptora očigledno je uticao na sveukupnu bihejvioralnu aktivnost ove supstance, u poređenju sa diazepamom. Konačno, važno je spomenuti da je inhibitorski uticaj JY-XHe-053 na lokomotornu aktivnost u istoimenom testu bio očigledan samo prilikom analize aktivnosti u perifernoj, ali ne i u centralnoj zoni, što se može smatrati čistim nalazom sedativnog efekta (pogledati Savić i sar., 2006, 2008). Nasuprot tome, hipolokomocija izazvana primenom SH-053-R-CH3-2'F posledica je inaktivnosti u centralnoj, a ne perifernoj zoni, što sugerise da se sedativni efekti posredovani α_1 - i α_5 - (JY-XHe-053), odnosno pretežno α_5 GABA_A receptorima (SH-053-R-CH3-2'F) i kvalitativno razlikuju.

Dosadašnji rezultati sa zolpidemom, selektivnim agonistom α_1 GABA_A receptora sa slabije izraženom aktivnošću na α_2 i α_3 GABA_A receptorima i vrlo slabim afinitetom za α_5 GABA_A receptore, pokazali su da njegov anksiolitički efekat izgleda da zavisi od pratećeg smanjenog broja ulazaka u zatvorene krake uzdignutog plus lavirinta, pa je samim tim „opterećen” opštim promenama u aktivnosti pacova, odnosno, nespecifičan (Savić i sar., 2004). Analiza kovarijanse u eksperimentu sa SH-053-2'N

nije otkrila sličnu zavisnost anksiolitičkog efekta od jasnih znakova sedacije. Ipak, može se očekivati da razdvajanje željenog anksiolitičkog od neželjenog sedativnog efekta bude nešto teže za SH-053-2'N nego za SH-053-S-CH3-2'F, jer je ova supstanca bila bez uticaja na parametre aktivnosti u uzdignutom plus lavirintu (pogledati Savić i sar., 2008).

Finalno, bitno je istaći da su studije sa značajnom prediktivnom vrednošću u kontekstu razvoja novih anksiolitika, a koje koriste konfliktnu proceduru sa rebus majmunima, pokazale da JY-XHe-053 i SH-053-2'N, slično diazepamu, povećavaju pozitivno potkrepljujuće ponašanje, inače suprimirano električnim šokom (Fischer i sar., 2010). Suprotno ovim dvema supstancama, uticaj SH-053-R-CH3-2'F nije dostigao statističku značajnost. Za pretpostaviti je da korišćenje različitih eksperimentalnih životinja i procedura koje su korišćene za detekciju sedativnog i/ili anksiolitičkog efekta potencijalnih anksiolitika mogu dovesti do određenih razlika u rezultatima i zaključcima.

Zaključak da GABA_A receptori koji sadrže α_1 podjedinicu imaju najznačajniju ulogu u posredovanju efekata benzodiazepina u vodenom lavirintu (Savić i sar., 2009) podstaknut je i dokazima da zolpidem, supstanca selektivna za α_1 GABA_A receptore, sa malim afinitetom za α_5 podjedinicu, izaziva vrlo slično oštećenje učenja u ovom modelu kao i diazepam. Takođe, tri novosintetisane supstance, sve sa smanjenom efikasnošću na najrasprostranjenijem podtipu GABA_A receptora, bile su bez značajnijih uticaja u standardnom protokolu vodenog lavirinta. Dakle, značajna aktivacija α_1 GABA_A receptora je neophodna ukoliko se želi postići oštećenje učenja i pamćenja u vodenom lavirintu, i obrnuto. Pozitivna modulacija α_5 GABA_A receptora najverovatnije može doprineti inkapacitirajućem efektu u vodenom lavirintu, nastalom usled aktivacije α_1 GABA_A receptora, ali nije niti neophodna (zolpidem) niti dovoljna (SH-053-R-CH₃-2'F) za jasnu promenu u ponašanju eksperimentalne životinje.

5.4. OPŠTA DISKUSIJA

Eksperimenti sa SH-I-048A dokazali su da se novosintetisane supstance, bez selektivnosti u afinitetu za α_1 -, α_2 -, α_3 - i α_5 GABA_A receptore, mogu razlikovati od klasičnih benzodiazepina, u slučaju da postoje čak i relativno male razlike u potencijaciji određenih podtipova GABA_A receptora. Naime, suptilne razlike između SH-I-048A i diazepama u potencijaciji α_1 - i α_5 GABA_A receptora dovele su do jasnih razlika u pojedinim bihevioralnim efektima, a naročito u onim koji direktno zavise od aktivnosti tih receptora. Ovi rezultati u dobroj meri podržavaju nalaze drugih istraživačkih grupa, koje su pokazale da se značajno poboljšanje bihevioralnih profila može postići i sa neselektivnim ligandima, aktivnim na sva četiri podtipa GABA_A receptora osetljivih na benzodiazepine (Rabe i sar., 2007; Auta i sar., 2010).

Parcijalna aktivacija α_1 GABA_A receptora, koja nastaje kao posledica primene WYS8, može indukovati samo zanemarljive bihevioralne promene u ponašanju pacova. Međutim, u kombinaciji sa diazepamom, WYS8 se pokazao kao izuzetna farmakološka alatka, jer je značajno uticao na smanjenje sedacije, mišićne relaksacije i antikonvulzivne aktivnosti diazepama, dok je ataksija ostala nepromenjena, a anksiolitički efekat više doze diazepama (2 mg/kg) bio je razotkriven. Interesantno, anksiolitička i miorelaksantna aktivnost, iako verovatno nedostižne bez pozitivne modulacije α_2/α_3 GABA_A receptora, podložne su promenama u oba pravca u zavisnosti od nivoa modulacije α_1 GABA_A receptora. S druge strane, iako se čini da se antikonvulzivni, pa čak i ataksični efekat, mogu postići bez značajne modulacije α_1 GABA_A receptora, snažna aktivacija ovih receptora verovatno je neophodna za punu manifestaciju pomenutih efekata. Dodatno, pokazano je da memorijski deficiti u vodenom lavirintu koje izaziva diazepam zavise, u najvećoj meri, od stepena aktivacije α_1 GABA_A receptora. Imajući u vidu određene razlike u odnosu na rezultate studija na transgenim miševima (Rudolph i Knoflach, 2011), može se zaključiti da nalazi naših eksperimenata doprinose razjašnjenju kompleksnih odnosa između modulacije pojedinih podtipova GABA_A receptora i različitih bihevioralnih efekata benzodiazepina.

Na osnovu rezultata studija na miševima sa tačkastim mutacijama jedne od podjedinica GABA_A receptora odgovornih za dejstvo klasičnih benzodiazepina definisana je strategija razvoja supstanci sa nižom aktivnošću na α_1 GABA_A receptorima, čime bi se izbegli neki od već pomenutih neželjenih efekata (Dawson i sar. 2005; Rudolph i Knoflach, 2011). Međutim, ovaj koncept nije dobio pravu potvrdu u kliničkim uslovima, jer su ligandi, iako sa slabom aktivnošću na α_1 GABA_A receptorima, i dalje izazivali sedaciju kod pacijenata (Skolnick, 2012). Ovi neuspesi uticali su na smanjenje početnog entuzijazma, tražeći značajno pojašnjenje čitavog koncepta u pretkliničkim ispitivanjima.

Iako su eksperimenti na transgenim sojevima miševa odredili ulogu genetski-izmenjenog podtipa GABA_A receptora koji sadrži određenu α podjedinicu u ispoljavanju bihejvioralnog efekta benzodiazepina u slučaju izostanka efekta diazepama, ne može se u potpunosti isključiti doprinos drugih α podjedinica. Dobar primer jeste α_1 (H101R) soj miševa kod kojih izostaje sedativni efekat diazepama (Rudolph i sar., 1999), što indirektno upućuje da α_{2-} , α_{3-} i α_5 GABA_A receptori ne učestvuju u sedativnom efektu. Međutim, nikako se ne može isključiti mogućnost da jedan od ova tri podtipa receptora ima sedativni, a drugi stimulatívni efekat, pa se na taj međusobno isključuju i konačno daju neutralan bihejvioralni odgovor (Rudolph i Knoflach, 2011).

Naši rezultati i prethodno navedeni zaključci mogli bi značajno uticati na „dogmu” o funkciji individualnih podtipova GABA_A receptora, koja dominira naučnom zajednicom već više od 10 godina (Rudolph i Möhler, 2006). Primetno je da rezultati farmakoloških studija, koji čine osnovu ove disertacije, oslikavaju realniju situaciju u biološkom sistemu, gde više od jednog podtipa GABA_A receptora moduliše isti bihejvioralni parametar. S tim u vezi, predlažemo jednu oglednu hipotezu koja se bazira na postojanju finog ekvilibrijuma između α_{1-} i α_5 GABA_A receptora s jedne, i α_{2-} i α_3 GABA_A receptora s druge strane, u smislu uticaja pozitivne alosterne modulacije na značajne bihejvioralne parametre koji se mogu povezati, pre svega, sa sedacijom, anksiolizom i/ili amnezijom, kao efektima sa najvećim terapijskim potencijalom. Uticaj pozitivne modulacije α_1 GABA_A receptora na pojavu sedacije i amnezije na neki način je koordinisan aktivacijom α_5 GABA_A receptora, dok je za anksiolitički efekat presudna aktivacija α_{2-} i/ili α_3 GABA_A receptora. Drugi par receptora, koji primarno nije

uključen u posredovanje navedenog efekta, može se suprotstaviti, maskirati ili na bilo koji drugi način suprimirajuće kontrolisati aktivnost para odgovornog za taj efekat.

Anksioselektivni anksiolitici se već dugi niz godina smatraju idealom, koji je poznati istraživač u ovoj oblasti Phil Skolnick (2012) nazvao Svetim gralom (eng. *Holy Grail*). Brzo i efikasno uklanjanje simptoma anksioznosti bez ugrožavanja dnevnih aktivnosti, kao što su upravljanje vozilom i različitim mašinama, minimiziranje uticaja na koordinaciju i s tim u vezi mogućih padova i preloma, naročito kod starijih osoba, smanjen potencijal za zloupotrebu, kao i izostanak sindroma obustave, predstavljaju ozbiljne terapijske prednosti ne samo nad klasičnim benzodiazepinima, već i nad drugim, alternativnim grupama lekova (Skolnick, 2012).

U našim eksperimentalnim uslovima, supstance sa sniženom aktivnošću na GABA_A receptorima koji sadrže α_1 podjedinicu ispoljile su skroman anksiolitički potencijal, odnosno u slučaju SH-053-2'N slabo izraženo razdvajanje sedativnog i anksiolitičkog efekta. Nedvosmisleno je pokazano da su za anksiolitički efekat dominantno odgovorni α_2 GABA_A receptori (Löw i sar., 2000), što specifična lokalizacija ovih receptora i potkrepljuje. Naime, iako čine samo oko 15% svih GABA_A receptora osetljivih na benzodiazepine, α_2 GABA_A receptori su eksprimirani uglavnom u amigdali i pojedinim delovima korteksa i hipokampusa, sa naročito visokom gustinom na inicijalnim segmentima neuronskih aksona, dajući im tako važnu ulogu u modulaciji prenosa akcionih potencijala (Nusser i sar., 1996; Fritschy i sar., 1998). Stoga, regulacija aktivnosti amigdale, strukture čija je uloga u kontroli straha i nivoa anksioznosti jasno ustanovljena (Davis, 1992), kao i inhibicija kortikalnih i hipokampalnih neurona, čine se najvažnijim mehanizmima anksiolitičkog efekta benzodiazepina (Möhler, 2008). Imajući u vidu da se praktično sve ispitivane supstance sa afinitetom za benzodiazepinsko mesto vezivanja publikovane do danas, uključujući i supstance sintetisane u laboratoriji prof. Cook-a, ne odlikuju istaknutom selektivnošću u afinitetu i/ili efikasnosti na α_2 GABA_A receptorima, postizanje selektivnog anksiolitičkog efekta, čak i u animalnim modelima, potvrđuje se kao kompleksniji zadatak nego što se to prvobitno pretpostavljalo.

Eventualno poređenje pretkliničkih profila selektivnih supstanci razvijenih u laboratorijama farmaceutskih proizvođača, od kojih je najaktivniji bio MSD (L-838417,

TPA023, MRK-409 itd.), i onih sintetisanih u laboratoriji prof. Cook-a, znatno je otežano razlikama u protokolima *in vitro* elektrofizioloških eksperimenata. Naime, najveći broj farmaceutskih proizvođača sprovodio je ove eksperimente pri koncentraciji GABA-e koja dovodi do 10 ili 20% maksimalnog odgovora, dok laboratorija prof. Sieghart-a koristi višestruko niže koncentracije (EC_3 GABA). Pri ovako niskoj koncentraciji, merenja u okviru i između dana su reproducibilnija, a efekti ispitivanih supstanci (procenti potencijacije) izraženiji nego pri višim koncentracijama, doprinoseći tako preciznosti rezultata. Supstance koje deluju preko benzodiazepinskog mesta vezivanja ne mogu znatnije pojačati kontrolnu struju pri EC_{10} i EC_{20} GABA, već samo produžavaju njeno trajanje. Ovaj efekat antagonizuje brza desenzitizacija receptora, koja se simultano odigrava i otežava pouzdanost merenja. Dakle, eventualne niske, ali statistički značajne, potencijacije pojedinih podtipova $GABA_A$ receptora mogle su ostati neprimećene, pa stoga biti tretirane kao neutralna alosterna modulacija, što rezultati nepublikovanih istraživanja i potvrđuju (Sieghart i sar., lično saopštenje).

Iako su naša ispitivanja usmerena na bihevioralne efekte novih supstanci, koji su posredovani $GABA_A$ receptorima, ne može se u potpunosti isključiti mogućnost da je deo posmatranih efekata posredovan i nekim drugim receptorima. Ovo je ipak malo verovatno, imajući u vidu da su sve supstance sintetisane u laboratoriji prof. Cook-a ispitane na brojnim ciljnim mestima lekova u sklopu PDSP inicijative (eng. *Psychoactive Drug Screening Program*; <http://pdsp.med.unc.edu>). Takođe, može se pretpostaviti da podjedinice koje formiraju jonski kanal eksprimiran na ćelijskim linijama ne mogu u potpunosti reprodukovati sve karakteristike receptora na neuronima (Birbir i Korpi, 2007), pa se stoga nativni $GABA_A$ receptori mogu ponašati nešto drugačije nego receptori dobijeni rekombinantnom tehnologijom (pogledati Helms i sar., 2012). Ovu hipotezu, nažalost, nije moguće ispitati, budući da za sada nedostaju metodologije za jasnu i visoko specifičnu elektrofiziološku i farmakološku karakterizaciju individualnih podtipova receptora *in situ*, koje bi nedvosmisleno identifikovale i merile potencijale pojedinačnih kanala u moždanom tkivu (Sieghart, lično saopštenje).

Pored razvoja anksioselektivnih anksiolitika, istraživanja na polju modulacije GABA-ergičke neurotransmisije usmerena su i ka potencijalnom lečenju određenih aspekata

shizofrenije, depresije, hroničnog bola i kognitivnih oštećenja (Rudolph i Knoflach, 2011). S obzirom da je signalni put GABA-e kompromitovan kod pacijenata obolelih od shizofrenije, o čemu svedoči značajno smanjenje ekspresije GAD67 i gubitak parvalbumin-pozitivnih interneurona u prefrontalnom korteksu (Guidotti i sar., 2000), postoji mogućnost da bi pozitivna modulacija α_2 - i/ili α_3 GABA_A receptora dovela do poboljšanja simptoma shizofrenije, a naročito onih koji se mogu povezati sa kognitivnim propadanjem. S tim ciljem je ispitivan i TPA023 (MK-0777), koji je pokazao određeno poboljšanje kognitivnih funkcija (Lewis i sar., 2008), ali u ponovljenoj studiji, sa većim brojem pacijenata, ovaj povoljan efekat nije potvrđen (Buchanan i sar., 2011). Interesantno, SH-053-R-CH₃-2'F, supstanca sa određenom funkcionalnom selektivnošću za α_5 GABA_A receptore, u jednom od animalnih modela shizofrenije pokazala je efekte slične antipsihoticima (Gill i sar., 2011). Što se tiče razvoja potencijalnih analgetika, više supstanci selektivnih za pojedine podtipove GABA_A receptora, kao što je SH-053-2'N (HZ-166), ispoljilo je antihiperalgezijsko dejstvo u modelima inflamatornog i neuropatskog bola, bez značajne sedacije i motorne inkapacitacije, kao i razvoja tolerancije posle ponavljane primene (Knabl i sar., 2008, Di Lio i sar., 2011).

Iako smo u poslednjoj deceniji svedoci veoma značajnih otkrića i napretka u neuronaukama, uključujući mapiranje neuronskih kola i neurohemijskih mehanizama, kao i identifikaciju relevantnih genskih lokusa (Insel i sar., 2013), u prethodnih nekoliko godina sve veći broj farmaceutskih proizvođača ne nalazi više svoj interes u polju istraživanja psihofarmaka (Miller, 2010; Nutt i Goodwin, 2011). Ovo potencijalno predstavlja ozbiljnu prepreku jer sredstva ovih kompanija pomažu rad i akademskih ustanova širom sveta, pa samim tim utiču na interesovanje naučne zajednice za određene istraživačke probleme. Kako bi se realno sagledala perspektiva određenog leka-kandidata i smanjio rizik eventualnog neuspeha tokom ispitivanja u skupim kliničkim studijama, stiče se utisak da je neophodno tražiti adekvatnije terapijske mete, razvijati animalne modele koji će bolje predvideti efekte u humanoj populaciji, biti apsolutno nepristrasan prilikom obrade i publikovanja rezultata, ali i podstaći publikovanje neafirmativnih studija (Nutt i Goodwin, 2011; Skolnick, 2012, 2013).

U zaključku, naši rezultati ukazuju na potrebu za primenom integrativnijeg pristupa, koji će najverovatnije indukovati ponovnu interpretaciju kontradiktornih podataka različitih istraživačkih grupa, ali što će i olakšati potragu za novim ligandima benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora. U tom smislu, uspostavljanje snažnijih veza između *in vitro* i *in vivo* podataka je od presudnog značaja, kako bi se jasnije definisali kriterijumi za proglašavanje selektivnosti ili neselektivnosti liganada benzodiazepinskog mesta vezivanja, što čini jedan od preduslova za njihov terapijski uspeh. Što se tiče razvoja novih supstanci poželjnih farmakoloških profila, kao što su anksioselektivni anksiolitici, čini se da je važnije uspostaviti odgovarajući balans između aktivacije pojedinih podtipova GABA_A receptora, nego ciljano aktivirati samo određene populacije ovih receptora.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu ispitivanja bihevioralnih efekata diazepama, SH-I-048A, WYS8, SH-053-2'N, JY-XHe-053 i SH-053-R-CH3-2'F, kao i tumačenja njihovih *in vitro* elektrofizioloških profila, a u cilju utvrđivanja značaja modulacije pojedinih podtipova GABA_A receptora u ispoljavanju ovih efekata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- 1) Koncentracije SH-I-048A i WYS8, čiji se *in vitro* profili znatno razlikuju od svih do sada publikovanih supstanci, u plazmi/serumu i homogenatu mozga bile su u očekivanim granicama i u direktnoj korelaciji sa primenjenim dozama, svedočeci o jasnoj vezi između postignutih koncentracija u mozgu pacova i identifikovanih bihevioralnih efekata.
- 2) Rezultati eksperimenata sa supstancom bez selektivnosti u afinitetu za GABA_A receptore osetljive na benzodiazepine (SH-I-048A), dokazali su da je moguće postići selektivan uticaj na određene bihevioralne efekte, samo ako postoje čak i relativno male razlike u potencijaciji pojedinih podtipova GABA_A receptora. Nalaz od posebnog značaja predstavlja izostanak bihevioralne aktivnosti u vodenom lavirintu, koji najverovatnije nastaje kao posledica kompleksnog odnosa između efekata posredovanih α_1 - i α_5 GABA_A receptorima.
- 3) WYS8, parcijalnom aktivacijom α_1 GABA_A receptora, može indukovati samo zanemarljive promene u ponašanju pacova. Međutim, u kombinaciji sa diazepamom, WYS8 je značajno uticao na smanjenje sedacije, mišićne relaksacije i antikonvulzivne aktivnosti diazepama, dok je ataksija ostala nepromenjena, anksiolitički efekat više doze diazepama (2 mg/kg) bio je razotkriven, a uticaj diazepama u vodenom lavirintu bio je potenciran, ističući jasnu razliku u odnosu na β -CCt. U svetlu rezultata studija na transgenim životinjama, nalaz da α_1 GABA_A receptori imaju regulatornu ulogu u efektima, kao što su miorelaksantni i antikonvulzivni, pa čak i anksiolitički, a presudnu u memorijskim deficitima u vodenom lavirintu, predstavlja značajan doprinos u razjašnjenju povezanosti modulacije pojedinih podtipova GABA_A receptora i različitih bihevioralnih efekata benzodiazepina.
- 4) U našim eksperimentalnim uslovima, supstance sa sniženom aktivnošću na α_1 GABA_A receptorima ispoljile su skroman anksiolitički potencijal, a u slučaju SH-053-

2'N bilo je nemoguće razdvojiti sedativni od anksiolitičkog efekta. Supstanca sa određenom selektivnošću u efikasnosti na α_5 GABA_A receptorima (SH-053-R-CH3-2'F) bila je bez primetnog potencijala za ispoljavanje anksiolitičkog efekta, ali je dozno-zavisno ispoljila hipolokomotorni efekat, što je u skladu sa pretpostavljenom ulogom ovih receptora u posredovanju sedativnog efekta. Ovi nalazi, inače u suprotnosti sa pojedinim rezultatima dobijenim sa supstancama sličnih profila, pokazuju da postizanje selektivnog anksiolitičkog efekta, čak i u pretkliničkim ispitivanjima, predstavlja izuzetno težak zadatak.

5) S obzirom da rezultati farmakoloških studija, u poređenju sa studijama na genetski modifikovanim životinjama, oslikavaju realniju situaciju u biološkom sistemu, gde više od jednog podtipa GABA_A receptora moduliše isti bihevioralni parametar, predlažemo jednu oglednu hipotezu koja se bazira na postojanju finog ekvilibrijuma između α_1 - i α_5 GABA_A receptora s jedne, i α_2 - i α_3 GABA_A receptora s druge strane, u smislu uticaja pozitivne alosterne modulacije na ispoljavanje značajnih bihevioralnih efekata.

6) U potrazi za supstancama optimizovanih farmakoloških profila, stiče se utisak da je odgovarajući balans između aktivacije pojedinih podtipova GABA_A receptora važniji od ciljane aktivacije samo određenih populacija ovih receptora, kako je predloženo studijama na transgenim miševima.

ZNAČAJ REZULTATA

Dobijeni rezultati su u mnogim aspektima proširili nalaze studija na transgenim životinjama, podstičući tako potrebu za sveobuhvatnijim pristupom, kojim bi se uz pomoć poznavanja dostupnosti ispitivanih supstanci u biofazi jasno korelisali njihovi *in vitro* i *in vivo* profili, a rezultati studija na genetski modifikovanim životinjama koristili kao jedna od osnovnih, ali ne nužno i određujućih informacija. Imajući u vidu perspektive koje pruža modulacija GABA-ergičke transmisije posredovana GABA_A receptorima – od poznatih indikacija, kao što su nesanica i anksioznost, do potencijalnih, kao što su shizofrenija i analgezija – dalje rasvetljavanje uloga pojedinih podtipova GABA_A receptora predstavlja jedan od prioriteta moderne psihofarmakologije.

7. LITERATURA

Alavijeh MS, Chishty M, Qaiser MZ, Palmer AM. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx* 2005; 2: 554-71.

Anderson KN, Shneerson JM. Drug treatment of REM sleep behavior disorder: the use of drug therapies other than clonazepam. *J Clin Sleep Med* 2009; 5: 235-9.

Argyropoulos SV, Nutt DJ. The use of benzodiazepines in anxiety and other disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 1999; 9 (Suppl. 6): S407-12.

Arolfo MP, Brioni JD. Diazepam impairs place learning in the Morris water maze. *Behav Neural Biol* 1991; 55: 131-6.

Ashton, H. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. *Drugs* 1994; 48: 25-40.

Atack JR, Wafford KA, Tye SJ, Cook SM, Sohal B, Pike A, Sur C, Melillo D, Bristow L, Bromidge F, Ragan I, Kerby J, Street L, Carling R, Castro JL, Whiting P, Dawson GR, McKernan RM. TPA023 [7-(1,1-dimethylethyl)-6-(2-ethyl-2H-1,2,4-triazol-3-ylmethoxy)-3-(2-fluorophenyl)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazine], an agonist selective for α_2 - and α_3 -containing GABAA receptors, is a nonsedating anxiolytic in rodents and primates. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 410-22.

Atack JR. GABAA Receptor α_2/α_3 Subtype-Selective Modulators as Potential Nonsedating Anxiolytics. *Curr Top Behav Neurosci* 2010; 2: 331-360.

Atack JR, Wafford KA, Street LJ, Dawson GR, Tye S, Van Laere K, Bormans G, Sanabria-Bohórquez SM, De Lepeleire I, de Hoon JN, Van Hecken A, Burns HD, McKernan RM, Murphy MG, Hargreaves RJ. MRK-409 (MK-0343), a GABAA receptor subtype-selective partial agonist, is a non-sedating anxiolytic in preclinical species but causes sedation in humans. *J Psychopharmacol* 2011; 25: 314-28.

Auta J, Giusti P, Guidotti A, Costa E. Imidazenil, a positive allosteric modulator of GABAA receptors exhibits low tolerance and dependence liabilities. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270: 1262-9.

Auta J, Faust WB, Lambert P, Guidotti A, Costa E, Moerschbaecher JM. Comparison of the effects of full and partial allosteric modulators of GABA(A) receptors on complex behavioral processes in monkeys. *Behav Pharmacol* 1995; 6: 323-32.

Auta J, Costa E, Davis JM, Guidotti A. Imidazenil: an antagonist of the sedative but not the anticonvulsant action of diazepam. *Neuropharmacology* 2005; 49: 425-9.

Auta J, Kadriu B, Giusti P, Costa E, Guidotti A. Anticonvulsant, anxiolytic, and non-sedating actions of imidazenil and other imidazo-benzodiazepine carboxamide derivatives. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 95: 383-9.

- Awapara J, Landua AJ, Fuerst R, Seale B. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem* 1950; 187: 35–9.
- Ban TA. The role of serendipity in drug discovery. *Dialogues Clin Neurosci* 2006; 8: 335–44.
- Bandelow B, Boerner JR, Kasper S, Linden M, Wittchen HU, Möller HJ. The diagnosis and treatment of generalized anxiety disorder. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110: 300–10.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 291–313.
- Basile AS, Lippa AS, Skolnick P. Anxiolytic anxiolytics: can less be more? *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 441–51.
- Bateson AN. Basic pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 5–21.
- Bateson AN. The benzodiazepine site of the GABAA receptor: an old target with new potential? *Sleep Med* 2004; 5: S9–15.
- Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABAA receptor. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 565–75.
- Belzung C. Measuring rodent exploratory behavior. In: Crusio WE, Gerlai RT, editors. *Handbook of molecular-genetic techniques for brain and behavior research*. Elsevier Science BV, Amsterdam, 1999. pp. 738–49.
- Belzung C, Le Guisquet AM, Griebel G. Beta-CCT, a selective BZ-omega1 receptor antagonist, blocks the anti-anxiety but not the amnesic action of chlordiazepoxide in mice. *Behav Pharmacol*. 2000; 11: 125–31.
- Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 728–39.
- Benke D, Honer M, Michel C, Mohler H. GABAA receptor subtypes differentiated by their gamma-subunit variants: prevalence, pharmacology and subunit architecture. *Neuropharmacology* 1996; 35: 1413–23.
- Benson JA, Löw K, Keist R, Möhler H, Rudolph U. Pharmacology of recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated alpha-subunits. *FEBS Lett* 1998; 431: 400–4.
- Berney P, Halperin D, Tango R, Daeniker-Dayer I, Schulz P. A major change of prescribing pattern in absence of adequate evidence: benzodiazepines versus newer antidepressants in anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* 2008; 41: 39–47.

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

Bialer M, White HS. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 68–82.

Birnir B, Korpi ER. The impact of sub-cellular location and intracellular neuronal proteins on properties of GABA(A) receptors. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 3169–77.

Bloom FE, Iversen LL. Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature* 1971; 229: 628–30.

Bohlhalter S, Weinmann O, Möhler H, Fritschy JM. Laminar compartmentalization of GABAA-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 1996; 16: 283–97.

Boissier JR, Simon P. L'utilisation du test de la traction, (Test de JULOU-COURVOISIER) pour l'étude des psycholeptiques. *Thérapie* 1960; 15: 1170–4.

Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 247–64.

Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci* 1989; 48: 29–69.

Breitinger HG, Becker CM. The inhibitory glycine receptor—simple views of a complicated channel. *Chembiochem* 2002; 3: 1042–52.

Brioni JD, Arolfo MP. Diazepam impairs retention of spatial information without affecting retrieval or cue learning. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 41: 1–5.

Buchanan RW, Keefe RS, Lieberman JA, Barch DM, Csernansky JG, Goff DC, Gold JM, Green MF, Jarskog LF, Javitt DC, Kimhy D, Kraus MS, McEvoy JP, Mesholam-Gately RI, Seidman LJ, Ball MP, McMahon RP, Kern RS, Robinson J, Marder SR. A randomized clinical trial of MK-0777 for the treatment of cognitive impairments in people with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2011; 69: 442–9.

Buffett-Jerrott SE, Stewart SH. Cognitive and sedative effects of benzodiazepine use. *Current Pharmaceutical Design* 2002; 8: 45–58.

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

Buzsaki, G., Draguhn, A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 2004; 304: 1926–9.

Cain DP. Testing the NMDA, long-term potentiation, and cholinergic hypotheses of spatial learning. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 22: 181–93.

Carli M, Balducci C, Samanin R. Low doses of 8-OH-DPAT prevent the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal scopolamine through 5-HT(1A) receptors in the dorsal raphe. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 375–81.

Chambers MS, Atack JR, Broughton HB, Collinson N, Cook S, Dawson GR, Hobbs SC, Marshall G, Maubach KA, Pillai GV, Reeve AJ, MacLeod AM. Identification of a novel, selective GABA(A) α_5 receptor inverse agonist which enhances cognition. *J Med Chem* 2003; 46: 2227–40.

Collinson N, Atack JR, Laughton P, Dawson GR, Stephens DN. An inverse agonist selective for α_5 subunit-containing GABA_A receptors improves encoding and recall but not consolidation in the Morris water maze. *Psychopharmacology* 2006; 188: 619–28.

Chebib M, Johnston GA. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 937–40.

Cherubini E, Conti F. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci* 2001; 24: 155–62.

Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 1995; 378: 75–8.

Coghlan S, Horder J, Inkster B, Mendez MA, Murphy DG, Nutt DJ. GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms. *Neurosci Biobehav Rev* 2012; 36: 2044–55.

Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; 40: 431–58.

Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Blüthmann H, Möhler H, Rudolph U. Trace fear conditioning involves hippocampal α_5 GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8980–5.

Crestani F, Löw K, Keist R, Mandelli M, Möhler H, Rudolph U. Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 442–5.

Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49: 171–6.

Czobor P, Skolnick P, Beer B, Lippa A. A multicenter, placebo-controlled, double-blind, randomized study of efficacy and safety of ocinaplon (DOV 273,547) in generalized anxiety disorder. *CNS Neurosci & Ther* 2010; 16: 63–75.

Dämgen K, Lüddens H. Zaleplon displays a selectivity to recombinant GABAA receptors different from zolpidem, zopiclone and benzodiazepines. *Neurosci Res Commun* 1999; 25: 139-48.

Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 1992; 15: 353-75.

Davies PA, Wang W, Hales TG, Kirkness EF. A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn^{2+} . *J Biol Chem* 2003; 278: 712-7.

Dawson GR, Maubach KA, Collinson N, Cobain M, Everitt BJ, MacLeod AM, Choudhury HI, McDonald LM, Pillai G, Rycroft W, Smith AJ, Sternfeld F, Tattersall FD, Wafford KA, Reynolds DS, Seabrook GR, Atack JR. An inverse agonist selective for $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors enhances cognition. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1335-45.

De Marco Garcia NV, Karayannis T, Fishell G. Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature* 2011; 472: 351-5.

D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 36: 60-90.

D'Hulst C, Atack JR, Kooy RF. The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discov Today* 2009; 14: 866-75.

Dias R, Sheppard WF, Fradley RL, Garrett EM, Stanley JL, Tye SJ, Goodacre S, Lincoln RJ, Cook SM, Conley R, Hallett D, Humphries AC, Thompson SA, Wafford KA, Street LJ, Castro JL, Whiting PJ, Rosahl TW, Atack JR, McKernan RM, Dawson GR, Reynolds DS. Evidence for a significant role of $\alpha 3$ -containing GABAA receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. *J Neurosci* 2005; 25: 10682-8.

Di Lio A, Benke D, Besson M, Desmeules J, Daali Y, Wang ZJ, Edwankar R, Cook JM, Zeilhofer HU. HZ166, a novel GABAA receptor subtype-selective benzodiazepine site ligand, is antihyperalgesic in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2011; 60: 626-32.

Docherty M, Bradford HF, Wu JY, Joh TH, Reis DJ. Evidence for specific immunolysis of nerve terminals using antisera against choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase. *Brain Res* 1985; 339: 105-13.

Drexler B, Zinser S, Huang S, Poe MM, Rudolph U, Cook JM, Antkowiak B. Enhancing the function of $\alpha 5$ -subunit-containing GABA_A receptors promotes action potential firing of neocortical neurons during up-states. *Eur J Pharmacol* 2013; 703: 18-24.

Dubey RK, McAllister CB, Inoue M, Wilkinson GR. Plasma binding and transport of diazepam across the blood-brain barrier. No evidence for in vivo enhanced dissociation. *J Clin Invest* 1989; 84: 1155-9.

Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharmaceut Assoc* 1957; 46: 208–10

Engel AK, Fries P, Singer W. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 704–16.

Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* 1994; 14: 1834–55.

Facklam M, Schoch P, Bonetti EP, Jenck F, Martin JR, Moreau JL, Haefely WE. Relationship between benzodiazepine receptor occupancy and functional effects in vivo of four ligands of differing intrinsic efficacies. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261: 1113–21.

Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 215–29.

Fernandes C, File SE. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54: 31–40.

Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J* 2002; 43: 244–58.

File SE, Fernandes C. Dizocilpine prevents the development of tolerance to the sedative effects of diazepam in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 47: 823–6.

Fischer BD, Licata SC, Edwankar RV, Wang ZJ, Huang S, He X, Yu J, Zhou H, Johnson EM Jr, Cook JM, Furtmüller R, Ramerstorfer J, Sieghart W, Roth BL, Majumder S, Rowlett JK. Anxiolytic-like effects of 8-acetylene imidazobenzodiazepines in a rhesus monkey conflict procedure. *Neuropharmacology* 2010; 59: 612–8.

Fischer BD, Atack JR, Platt DM, Reynolds DS, Dawson GR, Rowlett JK. Contribution of GABA(A) receptors containing $\alpha 3$ subunits to the therapeutic-related and side effects of benzodiazepine-type drugs in monkeys. *Psychopharmacology* 2011; 215: 311–9.

Foster AC, Kemp JA. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 7–17.

Freund TF, Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996; 6: 347–470.

Friedman H, Abernethy DR, Greenblatt DJ, Shader RI. The pharmacokinetics of diazepam and desmethyldiazepam in rat brain and plasma. *Psychopharmacology* 1986; 88: 267–70.

- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D. Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 1998; 390: 194–210.
- Fu C, Cawthon B, Clinkscales W, Bruce A, Winzenburger P, Ess KC. GABAergic interneuron development and function is modulated by the Tsc1 gene. *Cereb Cortex* 2012; 22: 2111–9.
- Gasnier B. The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers Arch* 2004; 447: 756–9.
- Geyer MA. Approaches to the characterization of drug effects on locomotor activity in rodents. *Modern Methods in Pharmacology, Vol. 6, Testing and Evaluation of Drugs of Abuse*, Wiley-Liss, Inc; 1990: 81–99.
- Gill KM, Lodge DJ, Cook JM, Aras S, Grace AA. A novel α 5GABA(A)R-positive allosteric modulator reverses hyperactivation of the dopamine system in the MAM model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 1903–11.
- Giusti P, Ducić I, Puia G, Arban R, Walser A, Guidotti A, Costa E. Imidazenil: a new partial positive allosteric modulator of gamma-aminobutyric acid (GABA) action at GABAA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266: 1018–28.
- Glykys J, Peng Z, Chandra D, Homanics GE, Houser CR, Mody I. A new naturally occurring GABA(A) receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. *Nat Neurosci* 2007; 10: 40–48.
- Gould RA, Otto MW, Pollack MH. A meta-analysis of treatment outcome for panic disorder. *Clinical Psychology Review* 1995; 15: 819–44.
- Greenblatt DJ, Shader RI, Divoll M, Harmatz JS. Benzodiazepines: a summary of pharmacokinetic properties. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 11: 11S–16S.
- Griebel G. Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? *Pharmacol Ther* 1999; 82: 1–61.
- Griebel G, Perrault G, Simiand J, Cohen C, Granger P, Decobert M, Françon D, Avenet P, Depoortere H, Tan S, Oblin A, Schoemaker H, Evanno Y, Sevrin M, George P, Scatton B. SL651498: an anxiolytic compound with functional selectivity for α 2- and α 3-containing gamma-aminobutyric acid(A) (GABA(A)) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 753–68.
- Grimwood S, Hartig PR. Target site occupancy: emerging generalizations from clinical and preclinical studies. *Pharmacol Ther* 2009; 122: 281–301.
- Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E. Decrease in reelin

and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57: 1061–9.

Guidotti A, Auta J, Davis JM, Dong E, Grayson DR, Veldic M, Zhang X, Costa E. GABAergic dysfunction in schizophrenia: a new treatment target on the horizon. *Psychopharmacology* 2005; 180: 191–205.

Hadingham KL, Wingrove PB, Wafford KA, Bain C, Kemp JA, Palmer KJ, Wilson AW, Wilcox AS, Sikela JM, Ragan CI. Role of the beta subunit in determining the pharmacology of human gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 1211–8.

Haefely W. Pharmacological profile of two benzodiazepine partial agonists: Ro 16-6028 and Ro 17-1812. *Clin Neuropharmacol* 1984; 7: 670–1.

Haefely W, Martin JR, Schoch P. Novel anxiolytics that act as partial agonists at benzodiazepine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 452–6.

Haller J, Alicki M. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. *Curr Opin Psychiatry* 2012; 25: 59–64.

Hamlin M. In Hallstrom C, editor. Benzodiazepine dependence. New York: Oxford Medical Publications, 1993. pp. 1–12.

Hammarlund-Udenaes M. Active-site concentrations of chemicals – are they a better predictor of effect than plasma/organ/tissue concentrations? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010; 106: 215–20.

Hefti FF. Requirements for a lead compound to become a clinical candidate. *BMC Neurosci* 2008; 9: S7.

Helms CM, Rossi DJ, Grant KA. Neurosteroid influences on sensitivity to ethanol. *Front Endocrinol* 2012; 3: 10.

Hendry SH, Schwark HD, Jones EG, Yan J. Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J Neurosci* 1987; 7: 1503–19.

Hendry SH, Jones EG, Emson PC, Lawson DE, Heizmann CW, Streit P. Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Exp Brain Res* 19; 76: 467–72.

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 327: 1–5.

Hironaka T, Fuchino K, Fujii T. Absorption of diazepam and its transfer through the blood–brain barrier after intraperitoneal administration in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 229: 809–15.

Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54: 21–30.

Hollister LE, Müller–Oerlinghausen B, Rickels K, Shader RI. Clinical uses of benzodiazepines. *J Clin Psychopharmacol* 1993; 13: 1S–169S.

Houser CR, Hendry SH, Jones EG, Vaughn JE. Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory–motor cortex. *J Neurocytol* 1983; 12: 617–38.

Insel TR, Voon V, Nye JS, Brown VJ, Altevogt BM, Bullmore ET, Goodwin GM, Howard RJ, Kupfer DJ, Malloch G, Marston HM, Nutt DJ, Robbins TW, Stahl SM, Tricklebank MD, Williams JH, Sahakian BJ. Innovative solutions to novel drug development in mental health. *Neurosci Biobehav Rev* 2013 Apr 3. [Epub ahead of print].

Iversen, L. GABA pharmacology—what prospects for the future? *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1537–40.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short– and long–term memory. *Behav Brain Res* 1999; 103: 1–11.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Da Silva WC, Medina JH, Cammarota M. The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. *Neurotox Res* 2006; 10: 113–21.

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

Joksimović S, Varagic Z, Kovačević J, Van Linn M, Milić M, Rallapalli S, Timić T, Sieghart W, Cook JM, Savić MM. Insights into functional pharmacology of $\alpha(1)$ GABA (A) receptors: how much does partial activation at the benzodiazepine site matter? *Psychopharmacology* 2013 May 18. [Epub ahead of print].

Jones EG. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cerebral Cortex* 1993; 3: 361–72.

Jones GH, Schneider C, Schneider HH, Seidler J, Cole BJ, Stephens DN. Comparison of several benzodiazepine receptorligands in two models of anxiolytic activity in the mouse: an analysisbased on fractional receptor occupancies. *Psychopharmacology* 1994; 114: 191–9.

Kadriu B, Guidotti A, Costa E, Davis JM, Auta J. Acute imidazenil treatment after the onset of DFP–induced seizure is more effective and longer lasting than midazolam at preventing seizure activity and brain neuropathology. *Toxicol Sci* 2011; 120: 136–45.

Kaila K, Lamsa K, Smirnov S, Taira T, Voipio J. Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K^+ transient. *J Neurosci* 1997; 17: 7662–72.

Kalvass JC, Maurer TS. Influence of nonspecific brain and plasma binding on CNS exposure: implications for rational drug discovery. *Biopharm Drug Dispos* 2002; 23: 327–38.

Kan CC, Breteler MH, Zitman FG: High prevalence of benzodiazepine dependence in out-patient users, based on the DSM-III-R and ICD-10 criteria. *Acta Psychiatr Scand* 1997; 96: 85–93.

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

Khanna JM, Kalant H, Chau A, Shah G. Rapid tolerance and crosstolerance to motor impairment effects of benzodiazepines, barbiturates, and ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 59: 511–9.

Kinnard WJ, Watzman N. Techniques utilized in the evaluation of psychotropic drugs on animal activity. *J Pharm Sci* 1966; 55: 995–1012.

Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JDB, Cobden PM, Buzsaki G, Somogyi P. Brain state- and cell type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 2003; 421: 844–8.

Knabl J, Witschi R, Hösl K, Reinold H, Zeilhofer UB, Ahmadi S, Brockhaus J, Sergejeva M, Hess A, Brune K, Fritschy JM, Rudolph U, Möhler H, Zeilhofer HU. Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes. *Nature* 2008; 451: 330–4.

Knoflach F, Drescher U, Scheurer L, Malherbe P, Möhler H. Full and partial agonism displayed by benzodiazepine receptor ligands at recombinant gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266: 385–91,

Korpi ER, Grunder G, Lüddens H. Drug interactions at GABAA receptors. *Prog Neurobiol* 2002a; 67: 113–59.

Korpi ER, Mihalek RM, Sinkkonen ST, Hauer B, Hevers W, Homanics GE, Sieghart W, Lüddens H. Altered receptor subtypes in the forebrain of GABAA receptor delta subunit-deficient mice: recruitment of gamma 2 subunits. *Neuroscience* 2002b; 109: 733–43.

Kralic JE, Korpi ER, O'Buckley TK, Homanics GE, Morrow AL. Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 1037–45.

Kralic JE, O'Buckley, T.K., Khisti, R.T., Hodge, C.W., Homanics, G.E., Morrow, A.L., 2002b. GABAA receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. *Neuropharmacology* 43, 685–694.

Krnjević K. Some neuroactive compounds in the substantia nigra. *Adv Neurol* 1974; 5: 145–52.

Kubota Y, Kawaguchi Y. Three classes of GABAergic interneurons in neocortex and neostriatum. *Jpn J Physiol* 1994; 44: S145–8.

Laakmann G, Schüle C, Lorkowski G, Baghai T, Kuhn K, Ehrentraut S. Buspirone and lorazepam in the treatment of generalized anxiety disorder in outpatients. *Psychopharmacology* 1998; 136: 357–66.

Lader M. Benzodiazepines: A risk–benefit profile. *CNS Drugs* 1994; 1: 377–87.

Lader MH. Limitations on the use of benzodiazepines in anxiety and insomnia: are they justified? *Eur Neuropsychopharmacol* 1999; 9 (Suppl 6): S399–405.

Langer SZ, Faure–Halley C, Seeburg P, Graham D, Arbilla S. The selectivity of zolpidem and alpidem for the α_1 -subunit of the GABA_A receptor. *Eur Neuropsychopharm* 1992; 2: 232–4.

Lewis DA, Cho RY, Carter CS, Eklund K, Forster S, Kelly MA, Montrose D. Subunit–selective modulation of GABA type A receptor neurotransmission and cognition in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2008; 165: 1585–93.

Licata SC, Platt DM, Cook JM, Van Linn ML, Rowlett JK. Contribution of alpha1 subunit–containing gamma–aminobutyric acidA (GABAA) receptors to motor–impairing effects of benzodiazepines in squirrel monkeys. *Psychopharmacology* 2009; 203: 539–46.

Lippa AS, Nash PA, Greenblatt EN. Pre–clinical neuro–psychopharmacological testing procedures for anxiolytic drugs. In: Fielding St, Lal H, editors. *Anxiolytics*, Futura Publishing Comp. Inc., New York, 1979. pp. 41–81.

Lippa A, Czobor P, Stark J, Beer B, Kostakis E, Gravielle M, Bandyopadhyay S, Russek SJ, Gibbs TT, Farb DH, Skolnick P. Selective anxiolysis produced by ocinaplon, a GABAA receptor modulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 7380–85.

Liu X, Vilenski O, Kwan J, Apparsundaram S, Weikert R. Unbound brain concentration determines receptor occupancy: a correlation of drug concentration and brain serotonin and dopamine reuptake transporter occupancy for eighteen compounds in rats. *Drug Metab Dispos* 2009; 37: 1548–56.

Longo LP, Johnson B. Treatment of insomnia in substance abusing patients. *Psychiatric Annals* 1998; 28: 154–9.

López-Muñoz F, Alamo C, García-García P. The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: half a century of anxiolytic drugs. *J Anxiety Disord* 2011; 25: 554–62.

Löscher W, Schmidt D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res* 1988; 2: 145–81.

Löscher W, Nolting B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs: IV. Protective indices. *Epilepsy Res* 1991; 9: 1–10.

Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011; 20: 359–68.

Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rülicke T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 2000; 290: 131–4.

Macdonald RL, Olsen RW. GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 569–602.

Madsen KK, Larsson OM, Schousboe A. Regulation of excitation by GABA neurotransmission: focus on metabolism and transport. *Results Probl Cell Differ* 2008; 44: 201–21.

Madsen KK, Clausen RP, Larsson OM, Krogsgaard-Larsen P, Schousboe A, White HS. Synaptic and extrasynaptic GABA transporters as targets for anti-epileptic drugs. *J Neurochem* 2009; 109: 139–44.

Martin JR, Pieri L, Bonetti EP, Schaffner R, Burkard WP, Cumin R, Haefely WE. Ro 16–6028: a novel anxiolytic acting as a partial agonist at the benzodiazepine receptor. *Pharmacopsychiatry* 1988; 21: 360–2.

Martin JR, Schoch P, Jenck F, Moreau JL, Haefely WE. Pharmacological characterization of benzodiazepine receptor ligands with intrinsic efficacies ranging from high to zero. *Psychopharmacology* 1993; 111: 415–422.

Martin DL, Tobin AJ. Mechanisms controlling GABA synthesis and degradation in the brain. *GABA in the Nervous System: The View at Fifty Years*. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000. pp. 25–41.

Martin DL, Olsen RW, editors. *GABA in the Nervous System: The View at 50 Years*. Lippincott, Williams & Wilkins, New York, 2000.

- Martin JL, Sainz-Pardo M, Furukawa TA, Martín-Sánchez E, Seoane T, Galán C. Benzodiazepines in generalized anxiety disorder: heterogeneity of outcomes based on a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Psychopharmacol* 2007; 21: 774–82.
- McKernan RM, Whiting PJ. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 1996; 19: 139–43.
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci* 2000; 3: 587–92.
- McMullan J, Sasson C, Pancioli A, Silbergleit R. Midazolam versus diazepam for the treatment of status epilepticus in children and young adults: a meta-analysis. *Acad Emerg Med* 2010; 17: 575–82.
- McNamara RK, Skelton RW. Diazepam impairs acquisition but not performance in the Morris water maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 38: 651–8.
- McNamara RK, dePape GE, Skelton RW. Differential effects of benzodiazepine receptor agonists on hippocampal long-term potentiation and spatial learning in the Morris water maze. *Brain Res* 1993; 626: 63–70.
- McNamara RK, Skelton RW. Tolerance develops to the spatial learning deficit produced by diazepam in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 56: 383–9.
- Mendelson WB. Clinical distinctions between long-acting and short-acting benzodiazepines. *J Clin Psychiatry* 1992; 53: 4–7.
- Meyer OA, Tilson HA, Bird WC, Riley MT. A method for the routine assessment of fore- and hind limb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol* 1979; 1: 233–6.
- Miller G. Is pharma running out of brainy ideas? *Science* 2010; 329: 502–504.
- Milić M, Divljaković J, Rallapalli S, van Linn ML, Timić T, Cook JM, Savić MM. The role of $\alpha 1$ and $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rats. *Behav Pharmacol* 2012; 23: 191–7.
- Minier F, Sigel E. Techniques: Use of concatenated subunits for the study of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 499–503.
- Mirza NR, Larsen JS, Mathiasen C, Jacobsen TA, Munro G, Erichsen HK, Nielsen AN, Troelsen KB, Nielsen EØ, Ahring PK. NS11394 [3'-[5-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-benzoimidazol-1-yl]-biphenyl-2-carbonitrile], a unique subtype-selective GABAA receptor positive allosteric modulator: in vitro actions, pharmacokinetic properties and in vivo anxiolytic efficacy. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327: 954–68.

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

Möhler H. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* 2006; 326: 505–16.

Möhler H, Rudolph U, Boison D, Singer P, Feldon J, Yee BK. Regulation of cognition and symptoms of psychosis: focus on GABA(A) receptors and glycine transporter 1. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 58–64.

Möhler H. The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology* 2011; 60: 1042–9.

Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 1981; 12: 239–260.

Morris R. Developments of a water–maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Meth* 1984; 11: 47–60.

Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long–term potentiation by an N–methyl–D–aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 1986; 319: 774–6.

Morris HV, Dawson GR, Reynolds DS, Atack JR, Stephens DN. Both alpha2 and alpha3 GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic properties of benzodiazepine site ligands in the conditioned emotional response paradigm. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 2495–504.

Nash JR, Nutt D. Pharmacotherapy of anxiety. In Sibley DR, Hanin I, Kuhar M, Skolnick P, editors. *Handbook of Contemporary Neuropharmacology*. John Wiley & Sons, 2007. pp. 59–91.

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

Nusser Z, Sieghart W, Benke D, Fritschy JM, Somogyi P. Differential synaptic localization of two major gamma–aminobutyric acid type A receptor alpha subunits on hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11939–44.

Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P. Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1998; 18: 1693–703.

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

Nutt D, Goodwin G. ECNP Summit on the future of CNS drug research in Europe 2011: report prepared for ECNP by David Nutt and Guy Goodwin. *Eur Neuropsychopharmacol* 2011; 21: 495–9.

O’Keefe J, Recce ML. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 1993; 3: 317–30.

Olsen RW, Sawyer GW. GABAA receptor. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, New York, 2004. pp. 162–6.

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

Pardridge WM. Blood–brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv* 2003; 3: 90–105.

Paulsen O, Moser EI. A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1998; 21: 273–8.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14: 149–67.

Peng Z, Hauer B, Mihalek RM, Homanics GE, Sieghart W, Olsen RW, Houser CR. GABAA receptor subunit changes in delta subunit-deficient mice: altered expression of alpha4 and gamma2 subunits in the forebrain. *J Comp Neurol* 2002; 446: 179–97.

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

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

Popik P, Kostakis E, Krawczyk M, Nowak G, Szewczyk B, Krieter P, Chen Z, Russek SJ, Gibbs TT, Farb DH, Skolnick P, Lippa AS, Basile AS. The anxiolytic agent 7-(2-chloropyridin-4-yl)pyrazolo-[1,5-a]-pyrimidin-3-yl(pyridin-2-yl)methanone (DOV 51892) is more efficacious than diazepam at enhancing GABA-gated currents at alpha1 subunit-containing GABAA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 1244–52.

Poucet B, Benhamou S. The neuropsychology of spatial cognition in the rat. *Crit Rev Neurobiol* 1997; 11: 101–20.

- Poucet B, Save E, Lenck-Santini PP. Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Rev Neurosci* 2000; 11: 95–111.
- Pratt JA, Brett RR, Laurie DJ. Benzodiazepine dependence: from neural circuits to gene expression. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 59: 925–34.
- Rabe H, Kronbach C, Rundfeldt C, Lüddens H. The novel anxiolytic ELB139 displays selectivity to recombinant GABA(A) receptors different from diazepam. *Neuropharmacology* 2007; 52: 796–801.
- Ramerstorfer J, Furtmüller R, Vogel E, Huck S, Sieghart W. The point mutation gamma 2F77I changes the potency and efficacy of benzodiazepine site ligands in different GABAA receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 2010; 636: 18–27.
- Read KD, Braggio S. Assessing brain free fraction in early drug discovery. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; 6: 337–44.
- Rickels K: Benzodiazepines in the treatment of anxiety. *Am J Psychother* 1982; 36: 358–70.
- Rivera C, Voipio J, Kaila K. Two developmental switches in GABAergic signalling: the K–Cl cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J Physiol* 2005; 562: 27–36.
- Roberts E, Frankel S. Gamma–Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 1950; 187: 55–63.
- Roberts E. GABA: the road to neurotransmitter status. In Olsen RW, Venter JC, editors. *Benzodiazepines/GABA Receptors and Chloride Channels: Structural and Functional Properties*. Allan R. Liss, New York, USA, 1986a. pp. 1–39.
- Roberts E. What do GABA neurons really do? They make possible variability generation in relation to demand. *Exp Neurol* 1986b; 93: 279–90.
- Rodgers RJ, Johnson NJ. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus–maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52: 297–303.
- Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 801–10.
- Rowan MJ, Culle WK, Moulton B. Buspirone impairment of performance of passive avoidance and spatial learning tasks in the rat. *Psychopharmacology* 1990; 100: 393–8.
- Rowlett JK, Platt DM, Lelas S, Atack JR, Dawson GR. Different GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic, abuse–related, and motor effects of benzodiazepine–like drugs in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005a; 102: 915–20.

Rowlett JK, Cook JM, Duke AN, Platt DM. Selective antagonism of GABAA receptor subtypes: an in vivo approach to exploring the therapeutic and side effects of benzodiazepine-type drugs. *CNS Spectr* 2005b; 10: 40–8.

Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 1999; 401: 796–800.

Rudolph U, Möhler H. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 475–98.

Rudolph U, Möhler H. GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 18–23.

Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 685–97.

Rustay NR, Wahlsten D, Crabbe JC. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behav Brain Res* 2003; 141: 237–49.

Sanger DJ. The pharmacology and mechanisms of action of new generation, non-benzodiazepine hypnotic agents. *CNS Drugs* 2004; 18 (Suppl. 1): 9–15.

Savić MM, Obradović DI, Ugresić ND, Cook JM, Yin W, Bokonjić DR. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the elevated plus-maze: differential antagonism by flumazenil and beta-CCt. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 79: 279–90.

Savić MM, Huang S, Furtmüller R, Clayton T, Huck S, Obradović DI, Ugresić ND, Sieghart W, Bokonjić DR, Cook JM. Are GABAA receptors containing alpha5 subunits contributing to the sedative properties of benzodiazepine site agonists? *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 332–9.

Savić MM, Milinković MM, Rallapalli S, Clayton T Sr, Joksimović S, Van Linn M, Cook JM. The differential role of alpha1- and alpha5-containing GABA(A) receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; 12: 1179–93.

Savić MM, Majumder S, Huang S, Edwankar RV, Furtmüller R, Joksimović S, Clayton T Sr, Ramerstorfer J, Milinković MM, Roth BL, Sieghart W, Cook JM. Novel positive allosteric modulators of GABAA receptors: do subtle differences in activity at alpha1 plus alpha5 versus alpha2 plus alpha3 subunits account for dissimilarities in behavioral effects in rats? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34: 376–86.

Scott-Stevens P, Atack JR, Sohal B, Worboys P. Rodent pharmacokinetics and receptor occupancy of the GABAA receptor subtype selective benzodiazepine site ligand L-838417. *Biopharm & Drug Disp* 2005; 26: 13–20.

Sieghart W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 181–234.

Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 795–816.

Sieghart W, Ernst M. Heterogeneity of GABAA receptors: revived interest in the development of subtype-selective drugs. *Curr Med Chem Cent Nerv Syst Agents* 2005; 5: 217–42.

Sigel E, Baur R, Boulineau N, Minier F. Impact of subunit positioning on GABAA receptor function. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 868–71.

Sigel E, Steinmann ME. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J Biol Chem* 2012; 287: 40224–31.

Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA. Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem* 2004; 279: 41422–35.

Sine S, Engel A. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 2006; 440: 448–55.

Silverman P. Motor activity. In: *Animal behaviour in the laboratory*. Chapman and Hall, London, 1978. pp. 79–92.

Skolnick P. Anxiolytic anxiolytics: on a quest for the Holy Grail. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 611–20.

Skolnick P. Response to W. Sieghart. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34: 146.

Smith MA, Craig CK, French AM. Agonist and antagonist effects of benzodiazepines on motor performance: influence of intrinsic efficacy and task difficulty. *Behav Pharmacol* 2004; 15: 215–23.

Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 500–5.

Stahl S. Don't ask, don't tell, but benzodiazepines are still the leading treatments for anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 2002; 63: 756–7.

Sur C, Wafford KA, Reynolds DS, Hadingham KL, Bromidge F, Macaulay A, Collinson N, O'Meara G, Howell O, Newman R, Myers J, Atack JR, Dawson GR, McKernan RM, Whiting PJ, Rosahl TW. Loss of the major GABA(A) receptor subtype in the brain is not lethal in mice. *J Neurosci* 2001; 21: 3409–18.

Sutherland SM, Davidson JRT. In Stein MB, editor. *Social phobia: Clinical and research perspectives*. Washington, DC: American Psychiatric Press. 1995. pp. 323–46.

Tamamaki N, Tomioka R. Long-Range GABAergic Connections Distributed throughout the Neocortex and their Possible Function. *Front Neurosci* 2010; 4: 202.

Tan KR, Brown M, Labouèbe G, Yvon C, Creton C, Fritschy JM, Rudolph U, Lüscher C. Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature* 2010; 463: 769–74.

Terry AV Jr. Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009. Chapter 13.

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Product. Human Medicines Evaluation Unit. (2000) ICH Topic S7. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. Note for Guidance on Safety Pharmacology Studies in Human Pharmaceuticals.

Thompson AJ, Lummis SCR. 5-HT₃ receptors. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 3615–30.

Tyrer P. The benzodiazepine bonanza. *Lancet* 1974; 2: 709–10.

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

van Steveninck AL, Gieschke R, Schoemaker RC, Roncari G, Tuk B, Pieters MS, Breimer DD, Cohen AF. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of bretazenil and diazepam with alcohol. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 41: 565–73.

Vicini S, Ortinski P. Genetic manipulations of GABAA receptor in mice make inhibition exciting. *Pharmacol Ther* 2004; 103: 109–20.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006; 1: 848–58.

Walker MC, Semyanov A. Regulation of excitability by extrasynaptic GABA(A) receptors. *Results Probl Cell Differ* 2008; 44: 29–48.

Wall PM, Messier C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25: 275–86.

Wang Y, Oguntayo S, Wei Y, Wood E, Brown A, Jensen N, Auta J, Guiodotti A, Doctor BP, Nambiar MP. Neuroprotective effects of imidazenil against chemical warfare nerve agent soman toxicity in guinea pigs. *Neurotoxicology* 2012; 33: 169–77.

Watson J, Wright S, Lucas A, Clarke KL, Viggers J, Cheetham S, Jeffrey P, Porter R, Read KD. Receptor occupancy and brain free fraction. *Drug Metab Dispos* 2009; 37: 753–60.

Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I. Perisynaptic localization of δ subunit containing GABAA receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 2003; 23: 10650–61.

Whiting PJ, McKernan RM, Iversen LL. Another mechanism for creating diversity in γ_2 aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of γ_2 phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 330–7.

Whiting PJ. GABA-A receptors: a viable target for novel anxiolytics? *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 24–9.

Wieland HA, Lüddens H, Seeburg PH. A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* 1992; 267: 1426–9.

Wieland HA, Lüddens H. Four-amino acid exchanges convert a diazepam-insensitive, inverse agonist-preferring GABAA receptor into a diazepam-preferring GABAA receptor. *J Med Chem* 1994; 37: 4576–80.

Willumeit HP, Ott H, Neubert W. Simulated car driving as a useful technique for the determination of residual effects and alcohol interaction after short- and long-acting benzodiazepines. *Psychopharmacology Suppl* 1984; 1: 182–92.

Wittchen HU, Hoyer J. General anxiety disorder: nature and course. *J Clin Psychiatry* 2011; 62: 15–21.

Woods JH, Katz JL, Winger G. Benzodiazepines: use, abuse, and consequences. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 151–347.

Woods JH, Winger G. Current benzodiazepine issues. *Psychopharmacology* 1995; 118: 107–15.

Wu Y, Rosenberg HC, Chiu TH. Rapid down-regulation of [3H]zolpidem binding to rat brain benzodiazepine receptors during flurazepam treatment. *Eur J Pharmacol* 1995; 278: 125–32.

Yamada J, Furukawa T, Ueno S, Yamamoto S, Fukuda A. Molecular basis for the GABAA receptor-mediated tonic inhibition in rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 2007; 17: 1782–7.

Yin W, Majumder S, Clayton T, Petrou S, VanLinn ML, Namjoshi OA, Ma C, Cromer BA, Roth BL, Platt DM, Cook JM. Design, synthesis, and subtype selectivity of 3,6-disubstituted β -carboline at Bz/GABA(A)ergic receptors. SAR and studies directed toward agents for treatment of alcohol abuse. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 7548–64.

Zorumski CF; Isenberg KE. Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. *Am J Psychiatry* 1991; 148: 162–173.

KRATKA BIOGRAFIJA KANDIDATA

Srđan Joksimović je rođen 1981. godine u Beogradu, Republika Srbija. Na Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut, upisao se školske 2000/01. godine, a diplomirao 2006. sa srednjom ocenom 8,65. Dobitnik je stipendije za najbolje studente (Ministarstva prosvete Republike Srbije) 2001/2002, a 2008. i 2010. dobitnik je nagrade *European College of Neuropsychopharmacology Travel Award*.

Na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisao je doktorske akademske studije školske 2006/07. godine, pod mentorstvom prof. dr Miroslava Savića, kada je i uključen u naučnoistraživački rad na Katedri za farmakologiju. Osnovno polje naučnog interesovanja kandidata je bihejvioralna farmakologija benzodiazepina. Iste godine se zaposlio kao stručni saradnik u Farmakološkoj laboratoriji, koja se nalazila u okviru Nacionalne kontrolne laboratorije u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije. Od 2007. godine bio je načelnik Farmakološke laboratorije, a od 2010. stručni saradnik za *in vitro* i *in vivo* ispitivanja u Biološkoj laboratoriji – farmakologija. Tokom rada u Nacionalnoj kontrolnoj laboratoriji njegove osnovne odgovornosti bile su usmerene ka kontroli kvaliteta lekova i medicinskih sredstava: izvođenje i kontrola različitih *in vivo* i *in vitro* testova, stručni nadzor nad radom sa laboratorijskim životinjama, organizovanje rada vivarijuma, implementacija standarda kvaliteta u rad laboratorije i vivarijuma.

Od 2011. godine Srđan Joksimović je angažovan, sa punim radnim vremenom, kao istraživač–pripravnik na projektu „Bihejvioralni efekti ponavljane primene novosintetisanih supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora: poređenje sa standardnim psihofarmakološkim lekovima“ (projekat br. 175076). Mentor je studentskih naučno-istraživačkih radova; autor ili koautor je šest radova u vrhunskim međunarodnim časopisima, sedam saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu i jednog saopštenja na skupu nacionalnog značaja štampanog u izvodu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Срђан Јоксимовић

број индекса 18/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

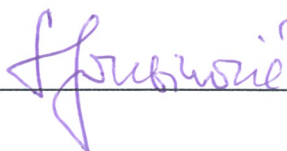
Значај модулације појединих подтипова бензодиазепинског места везивања

ГАБА_A рецептора за испољавање бихејвиоралних ефеката бензодиазепина

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

Потпис докторанда

У Београду, 06.09.2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Срђан Јоксимовић

Број индекса 18/06

Студијски програм докторске академске студије из фармакологије

Наслов рада Значај модулације појединих подтипова бензодиазепинског места везивања ГАБА_A рецептора за испољавање бихејвиоралних ефеката бензодиазепина

Ментор проф. др Мирослав Савић

Потписани Срђан Јоксимовић

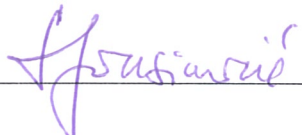
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 06.09.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Значај модулације појединих подтипова бензодиазепинског места везивања ГАБА_A рецептора за испољавање бихејвиоралних ефеката бензодиазепина

која је моје ауторско дело.

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

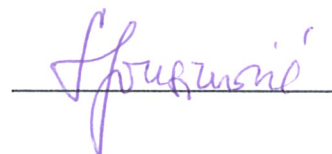
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 06.09.2013.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.