

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Tamara S. Timić Stamenić

**Uticaj modulacije GABA_A receptora koji sadrže
 α_5 podjedinicu na poremećaje ponašanja pacova
izazvane primenom dizocilpina, skopolamina i
amfetamina**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY**

Tamara S. Timić Stamenić

**The influence of modulation of α_5 subunit-
containing GABA_A receptors on the behavioral
deficits induced by dizocilpine, scopolamine and
amphetamine in rats**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentor

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

Članovi komisije

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

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

U Beogradu, _____

Profesoru Miroslavu Saviću, svom mentoru, dugujem ogromnu zahvalnost za nesebičnu pomoć, podršku, stručne savete, posvećeno vreme i kritike koje su učinile ovaj rad boljim. Profesoru Nenadu Ugrešiću veliko hvala za stručne sugestije, razumevanje i dragocene savete. Osećaj zahvalnosti i poštovanja dugujem profesoru Dubravku Bokonjiću na dragocenim smernicama tokom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se kolegama Aleksandru Obradoviću, Tamari Stanković, Anji Santrač, Branki Divović, Jovani Kovačević, Mariji Milić i Bojanu Batiniću sa Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na razumevanju i velikoj pomoći u sprovođenju ovog istraživanja. Posebnu zahvalnost dugujem Srđanu Joksimoviću, kolegi i prijatelju, koji je savetima i nesebičnom, stalnom podrškom usmeravao ovaj istraživački rad. Zahvaljujem se Bojanu Markoviću sa Katedre za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na radu kojim je doprineo ovoj disertaciji. Bez saradničkih laboratorija profesora James Cook-a (University of Wisconsin—Milwaukee, SAD) i profesora Werner Sieghart-a i Margot Ernst (Center for Brain Research, Medical University Vienna, Austrija) ovo istraživanje ne bi bilo moguće, i na tome im hvala.

Posebno sam zahvalna mojoj porodici na ljubavi i brizi. Podrška i požrtvovanje mojih roditelja su za mene od najvećeg značaja. Zahvalnost je najmanje što im dugujem.

Svom suprugu, kao najvećem osloncu u životu, dugujem neizmernu zahvalnost. Bez njegove ljubavi i podrške ova disertacija ne bi postojala.

Uticaj modulacije GABA_A receptora koji sadrže α_5 podjedinicu na poremećaje ponašanja pacova izazvane primenom dizocilpina, skopolamina i amfetamina

REZIME

Poslednjih godina intenzivirana su istraživanja čiji je cilj razvoj adekvatnih terapijskih opcija za kognitivne deficite koji se javljaju u shizofreniji, ali i drugim poremećajima koje prati kognitivno propadanje. Posebno su važni napori da se poveća translaciona validnost animalnih testova i modela, među kojima veliki značaj imaju testovi vizuelnog učenja i pamćenja (test prepoznavanja novog objekta, Morrisov vodeni lavirint) i socijalne kognicije (procedura socijalnog prepoznavanja). Imajući u vidu ulogu GABA-ergičkog sistema u procesima učenja i pamćenja, modulacija GABA_A receptora je predložena kao potencijalno koristan pristup kod poremećaja povezanih sa smanjenjem kognitivnih sposobnosti. Promene utvrđene *post mortem* na mozgovima pacijenata sa shizofrenijom upućuju na promene u GABA-ergičkom sistemu, ne samo u nivou GAD₆₇ i parvalbumin pozitivnih neurona, već i u nivou α_5 subjedinice GABA_A receptora. Kao potencijalno nova terapijska opcija u lečenju kognitivnih deficita predložena je modulacija α_5 GABA_A receptora, shodno njihovoj specifičnoj lokalizaciji i afirmativnim rezultatima dobijenim na životinjama kod kojih postoji potpun ili delimičan gubitak ovih receptora. Studije sprovedene sa više inverznih agonista BDZ mesta vezivanja α_5 GABA_A receptora pokazale su određeni prokognitivni potencijal ovih liganada u pretkliničkim istraživanjima. I pored određenih iskustava u ispitivanjima na ljudima, u kliničkoj praksi nema nootropnih lekova koji su inverzni agonisti BDZ mesta vezivanja α_5 GABA_A receptora, delom zbog neadekvatne podnošljivosti.

Aktuelna su postala ispitivanja uloge kako negativne, tako i pozitivne modulacije α_5 GABA_A receptora u poboljšanju kognitivnih deficita. U našem istraživanju korišćeni su inverzni agonist PWZ-029 i pet agonista (MP-III-022, MP-III-004, SH-053-2'F-R-CH₃, SH-I-75 i SH-I-047) BDZ mesta vezivanja na α_5 GABA_A receptoru. Naši rezultati pokazuju da negativni modulator α_5 GABA_A receptora PWZ-029 u animalnim modelima relevantnim za oštećenja videna u shizofreniji ispoljava preventivno dejstvo na razvoj pojedinih promena. Korišćeni su dobro validirani pretklinički modeli: hipofunkcija NMDA receptora izazvana primenom MK-801, hiperdopaminergičko stanje izazvano amfetaminom, kao i

promene indukovane antagonistom muskarinskih receptora skopolaminom. U testovima kojima se procenjuju kognitivne sposobnosti pacova, PWZ-029 je ostvario značajne prevenirajuće efekte na deficite izazvane delovanjem MK-801 i skopolamina. Potpuna reverzija oštećenja zapažena je za deficit izazvan primenom MK-801 i skopolamina u testu prepoznavanja novog objekta (deklarativna memorija), a parcijalna u Morisovom vodenom lavirintu (prostorna memorija) u modelu hipofunkcije NMDA receptora. Na smanjenje socijalnog prepoznavanja indukovano primenom MK-801, koje se povezuje sa negativnim simptomima viđenim u shizofreniji, PWZ-029 nije uticao. Modulacijom α_5 GABA_A receptora nije mogla da se prevenira hiperaktivnost, povezana sa pozitivnim simptomima u shizofreniji, a indukovana primenom amfetamina, MK-801 i skopolamina. Antipsihotik haloperidol je izvršio reverziju amfetaminom indukovane promene ponašanja, ali u jasno sedativnoj dozi, dok je diazepam u višim dozama, pri kojima ispoljava sedativni potencijal, uspeo da delimično smanji MK-801-izazvanu hiperlokomociju.

Pokazano je da svi ispitivani ligandi prolaze krvno-moždanu barijeru i da su nakon *i.p.* primene koncentracije jednog liganada u moždanom tkivu i plazmi komparabilne. Povezivenjem podataka o procenjenim slobodnim koncentracijama u mozgu nakon različitih doza negativnog i pozitivnih modulatora GABA_A receptora sa elektrofiziološkom efikasnošću pokazana je selektivnost delovanja preko α_5 GABA_A receptora. Inverzni agonist BDZ mesta vezivanja GABA_A receptora je u svim ispitivanim dozama ostvario selektivan efekat na α_5 GABA_A receptore, s time da je u kognitivnim testovima sa farmakološki indukovanim promenama ponašanja dobijen odnos doze PWZ-029 i efekta u obliku obrnutog slova „J“ ili „U“.

Naši rezultati potkrepljuju ulogu koju α_5 GABA_A receptori imaju u kognitivnim procesima, posebno imajući u vidu da noviji podaci iz literature pokazuju mogućnost preventivnog efekta modulacije ovih receptora u kognitivnim deficitima povezanim sa shizofrenijom i Daunovim sindromom. Dodatno, sve je više istraživanja koja ukazuju na značaj modulacije α_5 GABA_A receptora u drugim, ne-kognitivnim domenima disfunkcije, u stanjima kao što su Alzheimerova bolest, autizam ili depresija. Prikazani podaci ukazuju na nove supstance čiji *in vitro* i *in vivo* profili odgovaraju potrebama daljih istraživanja uloge i kliničke primenljivosti selektivne modulacije aktivnosti α_5 GABA_A receptora.

Ključne reči: pozitivni modulatori, PWZ-029, α_5 GABA_A receptori, MK-801, skopolamin, amfetamin, *Wistar* pacov, kognitivni deficiti

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

UDK broj: 616-092.9:615.214 (043.3)

The influence of modulation of α_5 subunit-containing GABA_A receptors on the behavioral deficits induced by dizocilpine, scopolamine and amphetamine in rats

ABSTRACT

In recent years, intensive efforts have been made to develop adequate therapies for cognitive deficits associated with schizophrenia and other disorders marked by cognitive deterioration. Of especial importance are activities aimed to further enhance translational value of animal models and tests, most notably those assessing visual learning and memory (novel object recognition test, Morris water maze) and social cognition (social novelty discrimination). Having in mind the involvement of GABAergic system in processes of learning and memory, the modulation of GABA_A receptors has been suggested as a potentially useful pharmacologic approach to the treatment of disorders with decreased cognitive abilities. The *post mortem* changes seen in schizophrenic patients' brains pointed to differences in GABAergic system, not only in level of GAD₆₇ and parvalbumin positive neurons, but also in the degree of α_5 subunit of GABA_A receptors. Modulation of α_5 GABA_A receptors has been proposed as a potentially novel therapeutic option in treating cognitive deficits, which corresponds well with the specific localization of α_5 GABA_A receptors and affirmative results from animals with partial or full depletion of these receptors. Moreover, studies with inverse agonists of α_5 GABA_A receptors have revealed their procognitive potential in preclinical settings. Although there exist some data in humans, no nootropic drugs acting as inverse agonists at α_5 GABA_A receptors have been approved so far, in part due to their inadequate tolerability.

The examinations of the role of both, negative and positive modulation of α_5 GABA_A receptors in amelioration of cognitive deficits are in progress. In the present study, we used one inverse agonist, PWZ-029 and five agonists (MP-III-022, MP-III-004, SH-053-2'F-R-CH₃, SH-I-75 and SH-I-047) of the benzodiazepine (BDZ) binding site at α_5 GABA_A receptors. Our results demonstrated that the negative modulator of α_5 GABA_A receptors, PWZ-029, exerts protective effects on development of distinct changes in animal models relevant to deficits seen in schizophrenia. The highly validated preclinical models: hypofunction of NMDA receptors induced by MK-801, amphetamine-induced hyperdopaminergic state as well as changes induced by muscarinic receptors antagonist,

scopolamine, have been used. In tests that assessed cognitive ability of rats, PWZ-029 achieved a significant beneficial effect on deficits induced by MK-801 and scopolamine. A complete reversion of MK-801 and scopolamine-induced deficits has been noted in novel object recognition test (declarative memory), whereas in the model of NMDA receptor hypofunction in Morris water maze (spatial memory) only a partial effect took place. The social recognition disruption induced by MK-801, which mimics negative symptomatology in schizophrenia, was unpreventable with PWZ-029. Moreover, the modulation of α_5 GABA_A receptors was unable to reduce hyperactivity, associated with positive symptoms in schizophrenia, induced by amphetamine, MK-801 or scopolamine. A higher, clearly sedative dose of the antipsychotic haloperidol did prevent the induced behavioral deficits, while higher doses of diazepam, despite its sedative effect, had only a partial beneficial effect on MK-801-induced hyperlocomotion.

We showed that all the tested modulators cross blood-brain barrier and that the concentrations of a ligand in plasma and brain were comparable after *i.p.* application. Assessment of selectivity for α_5 GABA_A receptors could be achieved by connecting the estimated free concentrations in brain after different doses of negative and positive modulators of GABA_A receptors with electrophysiological responses. The inverse agonist of the BDZ site of GABA_A receptors exhibited a selective effect on α_5 GABA_A receptors in all tested doses, with inverted “J” or “U” shape of dose-effects curves in pharmacologically induced cognitive deficits.

Our results further support the role of α_5 GABA_A receptors in cognitive processes, especially knowing that recent literature data demonstrate the possibility of a preventive effect of modulation of these receptors in cognitive deficits associated with schizophrenia and Down syndrome. Moreover, there is an increasing number of studies like ours, indicating the importance of α_5 GABA_A receptor modulation in different, non-cognitive, conditions such as Alzheimer's disease, depression or autism. The present data point at novel compounds with *in vitro* and *in vivo* profiles appropriate for further investigations of the role and clinical applicability of selective modulation of α_5 GABA_A receptors.

Key words: positive modulators, PWZ-029, α_5 GABA_A receptors, MK-801, scopolamine, amphetamine, *Wistar* rat, cognitive deficits

Academic Expertise: Pharmacy

Major in: Pharmacology

UDC number: 616-092.9:615.214 (043.3)

Sadržaj

1	UVOD.....	1
1.1	Uloga GABA _A receptora sa različitim α podjedinicama	2
1.1.1	Uloga α_5 GABA _A receptora	5
1.2	Životinjski modeli zasnovani na farmakološki indukovanim promenama	7
1.2.1	Hipofunkcija NMDA receptora (MK-801) i GABA-ergički sistem u shizofreniji.....	11
1.2.2	Amfetamin i dopaminska hipoteza u shizofreniji	15
1.2.3	Skopolamin i holinergički sistem u shizofreniji	18
1.3	Ligandi selektivni za α_5 GABA _A receptore.....	21
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
3	MATERIJAL I METODE	31
3.1	Životinje.....	31
3.2	Supstance	31
3.3	<i>In vitro</i> testovi.....	33
3.3.1	Određivanje koncentracije izabranih supstanci u plazmi i mozgu pacova	33
3.3.2	Određivanje slobodne frakcije supstanci i metaboličke stabilnosti	34
3.4	Bihevioralni testovi.....	35
3.4.1	Test lokomotorne aktivnosti	36
3.4.2	Test prepoznavanja novog objekta.....	38
3.4.3	Morisov vodeni lavirint	40
3.4.4	Procedura socijalne diskriminacije	42
3.5	Statistička analiza podataka	43
4	REZULTATI	45
4.1	Određivanje koncentracije izabranih supstanci u plazmi i mozgu pacova	45
4.1.1	Eksperiment 1	45
4.1.2	Eksperiment 2	46
4.1.3	Eksperiment 3	48
4.2	Test lokomotorne aktivnosti	50
4.2.1	Eksperiment 1	50
4.2.2	Eksperiment 2	51
4.2.3	Eksperiment 3	53
4.2.4	Eksperiment 4	56
4.2.5	Eksperiment 5	59
4.2.6	Eksperiment 6	62

4.2.7	Eksperiment 7	65
4.2.8	Eksperiment 8	68
4.2.9	Eksperiment 9	71
4.2.10	Eksperiment 10	74
4.2.11	Eksperiment 11	77
4.2.12	Eksperiment 12	78
4.2.13	Eksperiment 13	80
4.2.14	Eksperiment 14	82
4.2.15	Eksperiment 15	85
4.2.16	Eksperiment 16	87
4.3	Test prepoznavanja novog objekta.....	91
4.3.1	Eksperiment 1	92
4.3.2	Eksperiment 2	94
4.3.3	Eksperiment 3	96
4.3.4	Eksperiment 4	100
4.3.5	Eksperiment 5	102
4.4	Morisov vodeni lavirint	104
4.4.1	Eksperiment 1	104
4.4.2	Eksperiment 2	107
4.4.3	Eksperiment 3	109
4.4.4	Eksperiment 4	112
4.4.5	Eksperiment 5	116
4.4.6	Eksperiment 6	119
4.5	Procedura socijalnog prepoznavanja.....	124
4.5.1	Eksperiment 1	124
4.5.2	Eksperiment 2	125
5	DISKUSIJA	127
5.1	Profili selektivnosti modulatora α_5 GABA _A receptora.....	129
5.2	Test lokomotorne aktivnosti	132
5.3	Test prepoznavanja novog objekta.....	137
5.4	Morisov vodeni lavirint	141
5.5	Procedura socijalnog prepoznavanja.....	145
6	ZAKLJUČCI.....	152
7	Literatura.....	155

LISTA SKRAĆENICA:

AMPH – amfetamin

BDZ – benzodiazepini

BDZ mesto vezivanja – benzodiazepinsko mesto vezivanja

CNS – centralni nervni sistem

CNTRICS – eng. *Cognitive Neurosciences Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia*

DAT – dopaminski transporter

EPSP – ekscitatorni postsinaptički potencijal

FDA – eng. *US Food and Drug Administration*

GABA – γ -aminobuterna kiselina

GABA_A – tip A receptora za γ -amino buternu kiselinu

GAD₆₇ – glutamat dekarboksilaza

i.p. – intraperitonealno

IPSP – inhibitorni postsinaptički potencijal

LTD – eng. *long-term depression*

LTP – eng. *long-term potentiation*

MAM – metilazoksimetanol acetat

MATRICS – eng. *Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia*

NMDA – N-metil-D-aspartat receptora

NORT – eng. *Novel Object Recognition Test*

SCOP – skopolamin

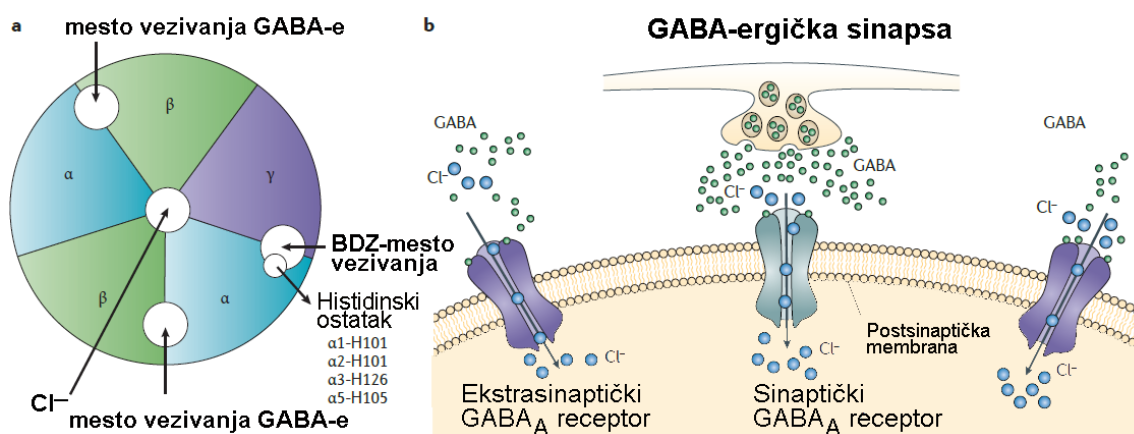
URNS – eng. *Treatment Units for Research on Neurocognition and Schizophrenia*

1 UVOD

Najznačajniji inhibitorni neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu (CNS), γ -aminobuterna kiselina (GABA), deluje preko jonotropnih i metabotropnih receptora. U okviru jonotropnih GABA_A receptora, preko kojih GABA ostvaruje većinu efekata, nalaze se brojna modulatorna mesta, od kojih je benzodiazepinsko (BDZ) mesto vezivanja važno ciljano mesto dejstva lekova. U lekove koji modulišu GABA-ergički sistem spadaju benzodiazepini, benzodiazepinima slični lekovi, kao što su tzv. Z-hipnotici (zolpidem, zopiklon, zaleplon), i barbiturati. Svi ovi lekovi mogu da ostvare anksiolitički, antikonvulzivni, hipnotički, sedativni i miorelaksantni efekat i imaju primenu u terapiji brojnih psihijatrijskih i neuroloških oboljenja (Möhler, 2015). Napredak u tehnikama molekularne biologije u prethodnih 25 godina omogućio je da se identifikuju različite podjedinice GABA_A receptora. Tako je otkriveno da je GABA_A receptor heteropentamer u čiji sastav može da uđe 19 podjedinica, koje se svrstavaju u nekoliko familija (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ i ρ_{1-3} ; Sieghart, 2006). U neuronima adultnog mozga, vezivanje GABA-e za GABA_A receptore povećava influks negativno naelektrisanih hloridnih jona, što stvara inhibitorni postsinaptički potencijal (IPSP). Iako bi se mogle očekivati izuzetno raznovrsne kombinacije podjedinica u sastavu heteropentamernog receptora, najčešće se sreće receptor sastavljen od dve α , dve β i jedne γ podjedinice, koji može biti sinaptički ili ekstrasinaptički lokalizovan (Olsen i Sieghart, 2009; Rudolph i Knoflach, 2011). Uz pomoć antitela specifičnih za pojedine podjedinice ispitivana je zastupljenost pojedinih podtipova GABA_A receptora i pokazano je da su najrasprostranjeniji receptori koji sadrže $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ podjedinice, dok se $\alpha_2\beta_n\gamma_2$, $\alpha_3\beta_n\gamma_2$, $\alpha_4\beta_n\gamma_2$, $\alpha_5\beta_n\gamma_2$, $\alpha_6\beta\gamma_{n2}$, $\alpha_4\beta_n\delta$ i $\alpha_6\beta_n\delta$ kombinacije podjedinica ređe nalaze u CNS-u (Sieghart i Sperk, 2002). Uporedo sa razvojem tehnika za otkrivanje strukture GABA_A receptora, razvijani su i eksperimentalni pristupi kako bi se otkrila fiziološka uloga različitih podjedinica i sintetisana su jedinjenja selektivna za pojedine podtipove receptora. Takvi ligandi bi delovanjem isključivo na GABA_A receptore sa određenim podtipom α podjedinice mogli da ispolje specifične terapijske efekte (na primer anksiolitički efekat bez sedativnog). Kombinovanje različitih pristupa dovelo je do eksperimentalnih nalaza da bi ligandi selektivni za pojedine α podjedinice GABA_A receptora mogli da dobiju nove terapijske indikacije (autizam, shizofrenija, Alzheimerova bolest, moždani udar, neuropatski bol).

1.1 Uloga GABA_A receptora sa različitim α podjedinicama

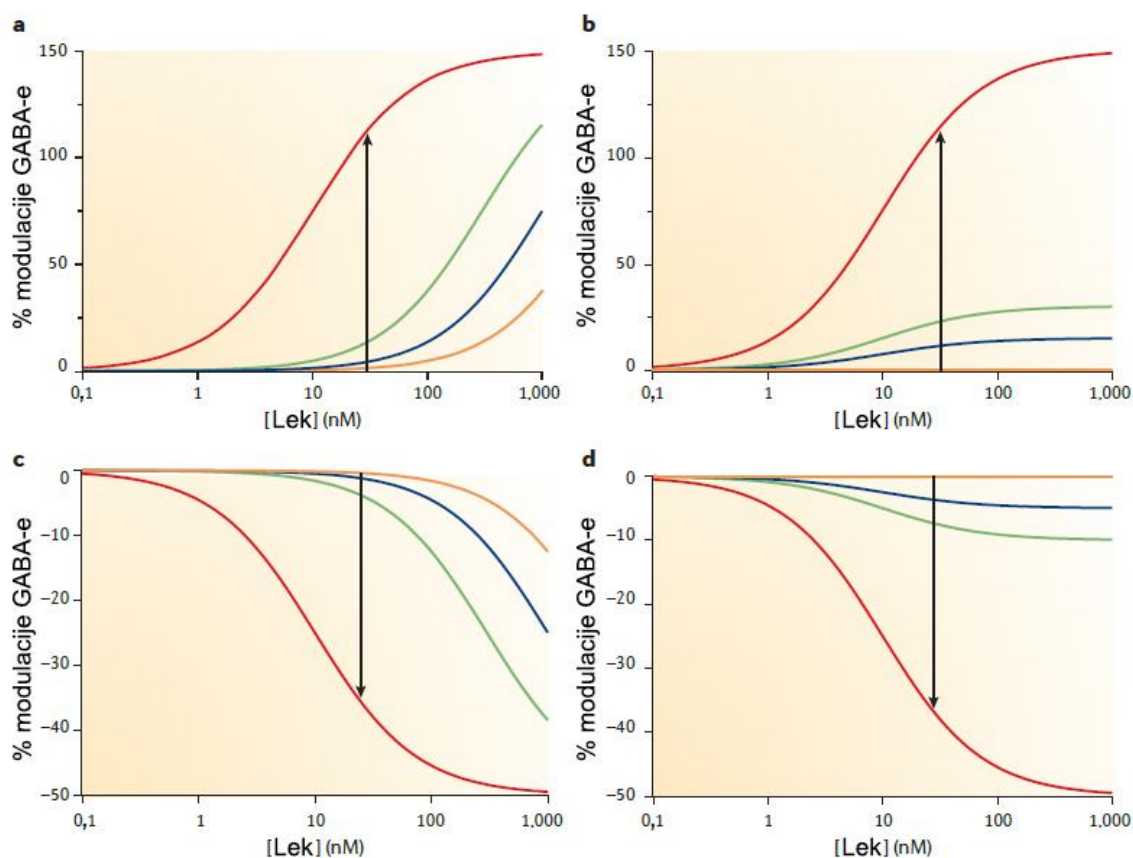
Od velikog broja podtipova GABA_A receptora, samo oni koji sadrže α_1 , α_2 , α_3 , ili α_5 podjedinicu u kombinaciji sa β i γ_2 podjedinicom jesu senzitivni na BDZ (Olsen i Sieghart, 2008). Uočeno je da tačkasta mutacija (promena aminokiseline histidin u arginin, Slika 1a) dovodi do stvaranja receptora sa α_1 , α_2 , α_3 ili α_5 podjedinicama neosetljivim za vezivanje diazepama, dok je efekat fiziološkog neurotransmitera (GABA-e) očuvan kako na sinaptičkim, tako i na ekstrasinaptičkim receptorima (Slika 1b) (Rudolph i sar., 1999; McKernan i sar, 2000).



Slika 1. Mesta vezivanja GABA-e i BDZ mesto vezivanja na GABA_A receptoru (a). Efekti otvaranja GABA_A receptora na postsinaptičkoj membrani: povećanje provodljivosti postsinaptičke membrane i promena u potencijalu membrane zahvaljujući kretanju hloridnih jona (hiperpolarizujuća inhibicija). Sinaptički receptori detektuju mM koncentracije GABA-e i posreduju brzi IPSP, dok ekstrasinaptički receptori detektuju μ M koncentracije GABA-e i bitni su za spori IPSP (tonična inhibicija) (b). Preuzeto i prilagođeno iz Rudolph i Knoflach, 2011.

Ligandi koji deluju preko BDZ mesta vezivanja GABA_A receptora mogu biti pozitivni, neutralni ili negativni modulatori GABA-ergičke transmisije, odnosno agonisti, antagonisti ili inverzni agonisti BDZ mesta. Među pozitivnim i negativnim modulatorima postoji grupa supstanci koje ne mogu da dovedu do maksimalnog odgovora, pa se stoga nazivaju parcijalnim agonistima ili parcijalnim inverznim agonistima (Slika 2; Rudolph i Knoflach, 2011). Na Slici 2a prikazani su odgovori liganada – pozitivnih modulatora koji imaju različit afinitet za receptore sa istom efikasnošću, dok je na Slici 2b prikazan odgovor (% modulacije GABA-e) pozitivnih modulatora sa istim afinitetom za receptore ali sa različitim efikasnostima (parcijalni odgovor). Crvenom je označen maksimalni odgovor (efikasnost) i

najveći afinitet za dati receptor. Slično je prikazano i na Slikama 2c i 2d, s tim što se radi o odgovoru inverznih agonista.



Slika 2. Pozitivni modulatori (agonisti) različitog afiniteta (pomeranje krive koncentracija-odgovor) (a); agonisti selektivni po efikasnosti imaju isti afinitet za dati receptor (nema pomeranja krive duž apscise) (b); negativni alosterični modulatori (inverzni agonisti) različitog afiniteta (pomeranje krive koncentracija-odgovor) (c); inverzni agonisti selektivni po efikasnosti imaju isti afinitet za dati receptor (nema pomeranja krive duž apscise) (d); Maksimalni efekat na jednom receptoru (crvene krive) ne može se postići kada je efikasnost manja – parcijalni agonisti i parcijalni inverzni agonisti (b i d). Preuzeto i prilagođeno iz Rudolph i Knoflach, 2011.

Farmakološka ispitivanja koja podrazumevaju upotrebu selektivnih liganada, kao i studije sa genetski modifikovanim miševima, pokazali su da je prisustvo određene α podjedinice povezano sa pojedinim efektima potencijacije GABA-ergičke neurotransmisije, koji se ispoljavaju kroz različite promene ponašanja (Kralic i sar., 2002; Dias i sar., 2005; Atack, 2008; 2011a; Savić i sar, 2010; Joksimović i sar., 2013a; 2013b). U Tabeli 1 je data lokalizacija svih šest α podjedinica koje ulaze u sastav GABA_A receptora, kao i efekti koji se ispoljavaju preko četiri podtipa BDZ mesta vezivanja (Rudolph i Möhler, 2014).

Tabela 1. Celularna i subcelularna lokalizacija GABA_A receptora sa različitim α podjedinicama. Preuzeto i prilagođeno iz Rudolph i Möhler, 2014.

α	α_1	α_2	α_3	α_4	α_5	α_6
	$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	$\alpha_3\beta_{2,3}\gamma_2$	$\alpha_4\beta_{2,3}\delta$	$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	$\alpha_6\beta_{2,3}\gamma_2$ $\alpha_6\beta_{2,3}\delta$
farmakologija (benzodiazepini)	Najrasprostranjenija podjedinica (60%); miorelaksantno, sedativno, amnestičko dejstvo i najvećim delom antikonvulzivni efekat kao i zavisnost pri primeni agonista BDZ mesta vezivanja	Manje rasprostranjenost (15-20%); anksiolitički efekat agonista BDZ mesta vezivanja	Manja rasprostranjenost (10-15%); anksiolitički efekat agonista pri velikoj okupiranosti BDZ mesta vezivanja	Manje od 5% svih receptora, neosetljiva za BDZ	Manje od 5% svih receptora, pro-kognitivni efekti parcijalnih inverznih agonista BDZ mesta vezivanja	Manje od 5% svih receptora, neosetljiva za BDZ
lokalizacija	Cerebralni korteks (slojevi 1-6), hipokampus, amigdala, olfaktorni bulbus, talamus, prednji mozak, globus pallidus, substantia nigra pars reticulata, colliculus inferior, mali mozak, matične ćelije mozga	Cerebralni korteks (slojevi 1-4), hipokampus, amigdala, striatum, olfaktorni bulbus, hipotalamus, colliculus superior, oliva inferior, motorni nukleus, kičmena moždina, dorzalni rog	Cerebralni korteks (slojevi 5,6), amigdala, olfaktorni bulbus, talamičko retikularno i interlaminarno jedro, colliculus superior, matične ćelije mozga, kičmena moždina, locus coeruleus, raphe jedra, medijalni septum	Dentatni girus, talamus	Najrasprostranjenija u hipokampusu, manje zastupljena u dubljim kortikalnim slojevima, amigdali, olfaktornim bulbusu, hipotalamusu, colliculus-u superior, gornjem maslinastom jedru, spinalnom trigeminalnom nukleusu, kičmenoj moždini	Mali mozak, dorzalno kohlearno jedro
neuroni	Mitralne ćelije i neuroni kratkih aksona (olfaktorni bulbus), principalne ćelije i odabrani interneuroni u cerebralnom korteksu i hipokampusu, GABA-ergički neuroni u pallidum-u i substantia nigra-i, talamičkim relearnim neuronima, Purkinjeovim ćelijama i granularnim ćelijama	Principalne ćelije u hipokampusu i amigdali, neuroni kičmene moždine, granularne ćelije olfaktornog bulbusa, motorni neuroni, ganglioni dorzalnog korena, unutrašnji neuroni dorzalnog roga	„Tufted“ ćelije (olfaktorni bulbus), retikularno talamički neuroni, ćelije Golgi tipa II, serotonergički i kateholaminergički neuroni, holinergički neuroni prednjeg mozga, principalne ćelije lateralne i bazolateralne amigdale	Granularne ćelije (dentatni girus)	Piramidalne ćelije (hipokampus, cerebralni korteks), granularne i periglomerularne ćelije (olfaktorni bulbus), gornje maslinasto jedro, spinalni trigeminalni neuroni	Granularne ćelije (mali mozak)
subcelularna lokalizacija	Sinaptički na somi i dendritima, ekstrasinaptički na neuronima sa velikom ekspresijom	Pretežno sinaptički, perisomatski i koncentrisani na inicijalnom segmentu aksonskog brežuljka na kortikalnim i hipokampalnim piramidalnim ćelijama	Pretežno sinaptički, uključujući somu i početni deo aksonskog brežuljka, ekstrasinaptički na principalnim ćelijama amigdale i neuronima maslinastog jedra	Ekstrasinaptički	Ekstrasinaptički u hipokampusu, cerebralnom korteksu, olfaktornom bulbusu, ekstrasinaptički na spinalnom trigeminalnom nukleusu i gornjem maslinastom jedru, sinaptički na „bitufted“ ćelijama	Sinaptički u glomerulima malog mozga, ekstrasinaptički na granularnim ćelijama, dendritima i telu neurona

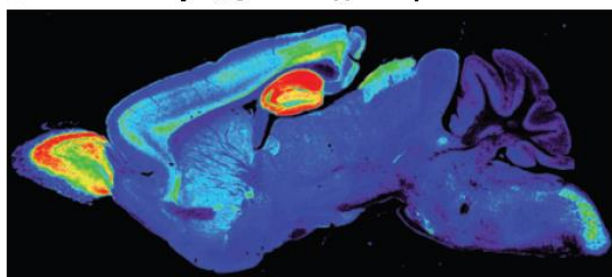
1.1.1 Uloga α_5 GABA_A receptora

Na osnovu činjenice da postoji visoka zastupljenost α_5 GABA_A receptora u hipokampusu (Slika 3a) i da je dobro poznata uloga hipokampusa u učenju i pamćenju, modulacija ove populacije GABA_A receptora je interesantna sa aspekta istraživanja njihove uloge u kognitivnim procesima. Poznato je da u velikoj meri GABA-ergički interneuroni regulišu aktivnost ekscitatornih piramidalnih ćelija u hipokampusu, koje su odgovorne za prostorno učenje i druge tipove memorijskih procesa. Dodatno je pokazano da je lokalizacija različitih α podjedinica GABA_A receptora zaslužna za razlike koje postoje u efektima potenciranja inhibitornih GABA_A receptora na aktivnost ekscitatornih piramidalnih ćelija. Iako je distribucija GABA_A receptora u CNS-u generalno specifična, posebno se može uočiti i istraživati na piramidalnim neuronima hipokampusa. Dok se α_1 i α_2 podjedinice nalaze pretežno u okviru sinapse koju formiraju različiti tipovi interneurona sa piramidalnom ćelijom (Nyiri i sar., 2001), α_5 GABA_A receptori su lokalizovani pre svega ekstrasinaptički (Fritschy i sar., 1998; Brunig i sar., 2002). Smatra se da ekstrasinaptičke α_5 GABA_A receptore aktivira „curenje“ GABA-e iz bliskih sinapsi i da se tom aktivacijom postiže tonična inhibicija piramidalnog neurona (Caraiscos i sar., 2004). Karakteristično je i da se $\alpha_5\beta\gamma_2$ GABA_A receptori nalaze pretežno na bazi dendritskih spina („trnića“) piramidalnih ćelija (Slika 3b) u CA₁ i CA₂ regionu hipokampusa, kao i u V sloju kortikalnih neurona (Brickley i Mody, 2012), te su na taj način α_5 GABA_A receptori strateški pozicionirani da modulišu ekscitatornu glutamatergičku transmisiju koja svoje efekte ostvaruje preko N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora.

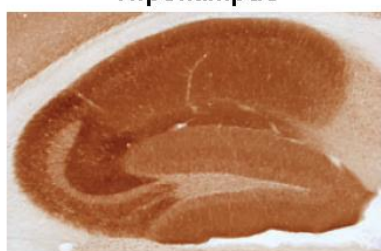
Shodno specifičnoj lokalizaciji, u regulaciji učenja i pamćenja se poseban značaj pridaje α_5 podjedinici GABA_A receptora (Brickley i Mody, 2012). Eksperimenti sa životinjama kod kojih postoji potpun ili delimičan gubitak α_5 GABA_A receptora jasno upućuju na poboljšanje kognitivnih sposobnosti životinja sa nedostatkom α_5 GABA_A receptora. Gubitak α_5 GABA_A receptora ($\alpha_5^{-/-}$) dovodi do poboljšanja u testovima prostorne memorije (Morisov vodeni lavirint), ali i do smanjenja amplitude IPSP-a na hipokampalnim presecima, i posledično do olakšanog formiranja ekscitatornog postsinaptičkog potencijala (EPSP), čime je otkriveno da α_5 GABA_A receptori imaju ključnu ulogu u kognitivnim procesima upravo kontrolisanjem komponente sinaptičke transmisije u CA₁ regionu hipokampusa (Collinson i sar., 2002; Chambers i sar., 2004; Sternfeld i sar., 2004).

Pokazano je i da gubitak α_5 GABA_A receptora dovodi do smanjenja amnestičkog, ali ne i sedativno-hipnotičkog potencijala opšteg anestetika etomidata (Cheng i sar., 2006). Eksperimenti na miševima sa parcijalnim deficitom α_5 GABA_A receptora u hipokampusu pokazuju da ovakve životinje efikasnije izvode testove koji su zavisni od funkcije hipokampusa, poput testa uslovljenosti strahom, dok ne ispoljavaju prokognitivne efekte u testovima koji su hipokampus-nezavisni, poput “odloženog kondicioniranja“ (Crestani i sar., 2002; Yee i sar., 2004). Ipak, parcijalno ili potpuno izostajanje α_5 GABA_A receptora može imati i efekte minimalnog oštećenja memorije u testu prepoznavanja lokacije novog objekta (Prut i sar., 2010), dok miševi sa parcijalnim deficitom α_5 GABA_A receptora ispoljavaju blago oštećenje prepulsne inhibicije u akustičnom refleksu preneraženja, upućujući na abnormalnosti u senzorno-motornim procesima (Hauser i sar., 2005). Rezultati ovakvih eksperimenata su direktno upućivali na vezu između α_5 GABA_A receptora i memorijskih procesa, te se na njima temeljio razvoj liganada selektivnih za α_5 GABA_A receptore, koji su ispitivani pre svega u kognitivnim testovima.

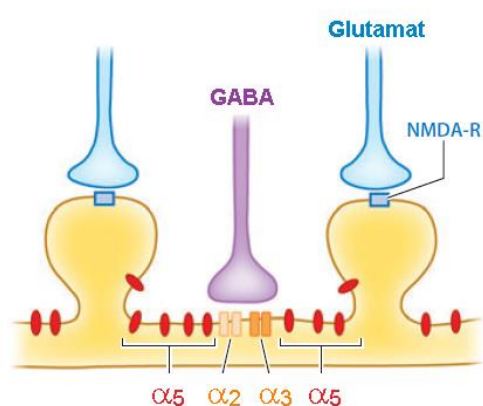
a Lokalizacija α_5 GABA_A receptora



Hipokampus



b Dendriti piramidalnih ćelija



Slika 3. Distribucija α_5 GABA_A receptora (a) i subcelularna lokalizacija na dendritima (b). Preuzeto i prilagođeno iz Rudolph i Möhler, 2014.

Sa druge strane, novija istraživanja dokazuju znatno prisustvo α_5 GABA_A receptora u sinapsi (Brady i Jacob, 2015), što čini efekte koji se ostvaruju preko ovih receptora još značajnijim. Interesantna je i činjenica da se u razvoju nervnog sistema dešava pomeranje α_5 podjedinice GABA_A receptora u hipokampusu iz sinapse na telu neurona ka

ekstrasinaptičkim pozicijama lociranim na dendritima. Ovaj neurorazvojni obrazac je sličan shemi promene $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ sistema, pa samim tim vrlo lako može da korelira sa aktivnošću GABA-ergičkog sistema koji od ekscitatornog preuzima inhibitornu ulogu (Ramos i sar., 2004). Dodatno je pokazano da u neonatalnom dobu u neokorteksu dominantno postoje α_3 i α_5 podjedinice GABA_A receptora, i da sa starenjem njihov broj opada, dok je u hipokampusu u ranom postnatalnom periodu ekspresija α_2 , α_5 i γ_2 podjedinice povećana, s time da se taj nivo ekspresije zadržava pri razvoju (Yu i sar., 2006; Datta i sar., 2014). Stoga je poslednjih godina ispitivanje uloge upravo α_5 GABA_A receptora dobilo poseban značaj kod neurorazvojnih bolesti, kao značajne grupe psihijatrijskih poremećaja koju karakterišu skromne terapijske mogućnosti.

1.2 Životinjski modeli zasnovani na farmakološki indukovanim promenama

Da bi se animalni model smatrao dobrim poželjno je da zadovolji kriterijume validnosti sličnosti (homologija sa simptomatologijom u oboljenju), konstrukcijske validnosti (neurobiološka sličnost sa oboljenjem i slična patofiziologija) i predikcione validnosti (model pokazuje odgovarajući farmakološki odgovor ili izostanak odgovora, kako bi se mogao koristiti prilikom ispitivanja potencijalnih lekova). Iako je samo za shizofreniju razvijeno više od 20 različitih životinjskih modela, svi se mogu svrstati u jednu od četiri kategorije: neurorazvojni, farmakološki indukovani, lezijski indukovani i modeli zasnovani na genetskoj manipulaciji (Jones i sar., 2011).

Dok postoje brojni animalni modeli za izučavanje poremećaja vezanih za pojedine aspekte ponašanja, nije razvijen model koji bi mogao da imitira sve simptome koji postoje u nekom neuropsihijatrijskom oboljenju. Ipak, modeli zasnovani na farmakološkim manipulacijama za izazivanje ili egzacerbaciju simptoma viđenih kod ljudi pokazuju znatnu konstrukcijsku validnost (Weiner i Arad, 2009). Ovo uključuje primenu amfetamina (AMPH), koji oslobađa dopamin iz vezikula i na taj način izaziva pozitivne (psihotične) simptome shizofrenije; dizocilpina (MK-801, antagonist NMDA receptora), koji izaziva čitav spektar simptoma viđenih u shizofreniji, i skopolamina (SCOP, antagonist muskarinskih receptora za acetilholin) koji izaziva smanjenje kognitivnih funkcija i psihotične simptome. Dok se u

ovakvim modelima mogu primetiti i pratiti neke, ali ne sve, promene u ponašanju (kontinuirano eksplorativno ponašanje, stereotipni pokreti, agresija, hiperaktivnost, socijalno povlačenje, smanjenje kognitivnih sposobnosti), pored bihevioralne karakterizacije modela često je potrebna i molekularna potvrda viđenih promena. Danas postoji sve veća potreba za opsežnom validacijom animalnog modela koji bi mogao da služi za istraživanje prokognitivnih efekata potencijalnih lekova (van der Staay, 2011), ali i za otkrivanje lekova koji bi bili efikasni u smanjenju kognitivnih promena koje su postale zajednička karakteristika mnogih psihijatrijskih oboljenja.

U tom smislu je Nacionalni institut za mentalno zdravlje u SAD, u saradnji sa FDA (eng. *US Food and Drug Administration*) i sa akademskom zajednicom pokrenuo inicijative MATRICS (eng. *Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia*), TURNS (eng. *Treatment Units for Research on Neurocognition and Schizophrenia*) i CNTRICS (eng. *Cognitive Neuroscience Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia*). Cilj je bio da se razvije metodologija za ispitivanje kognicije, ali i pronadu lekovi koji bi bili efikasniji u lečenju kognitivnih i negativnih simptoma. U okviru MATRICS inicijative opisani su modeli i bihevioralni testovi koji karakterišu jedan od sedam kognitivnih domena: pažnja, radna memorija, rešavanje problema, brzina učenja, vizuelno učenje i pamćenje, verbalno učenje i pamćenje i socijalna kognicija (Nuechterlein i sar., 2004). Young i saradnici (2009) detaljno prikazuju validnost pojedinih testova, od kojih poseban značaj imaju testovi vizuelnog učenja i pamćenja (test prepoznavanja novog objekta, Morrisov vodeni lavirint) i socijalna kognicija (procedura socijalnog prepoznavanja).

Farmakološki indukovano smanjenje kognicije u testu prepoznavanja novog objekta (eng. *novel object recognition test – NORT*) ima zadovoljavajuću validnost (Young i sar., 2009). Dokazi o ulozi koju holinergička neurotransmisija ima u testu prepoznavanja novog objekta upućuju na oštećujući uticaj skopolamina, ali ne i metilskopolamina (Sambeth i sar., 2007), te je skopolaminom izazvano smanjenje učenja korišćeno u mnogim studijama (Dodart i sar., 1997; Woolley i sar., 2003; de Bruin i sar., 2011). Pokazano je da akutna i hronična upotreba psihotomimetika (fenciklidin, MK-801) izaziva pouzdano smanjenje diskriminacije, te je animalni model sa antagonistima NMDA receptora dosta upotrebljavan i dobro validiran (Neill i sar., 2010; Meltzer i sar., 2013). Ispitivan je uticaj akutno primenjenog MK-801 (0,1 i 0,2 mg/kg) na različite faze memorije u NORT-u – pre

familijarizacije (akvizicija), odmah nakon familijarizacije (konsolidacija) i neposredno pre testiranja, i otkriveno je da je najizraženiji uticaj na memoriju MK-801 imao kada je primenjen pre familijarizacije kod miševa (Nilsson i sar., 2007). Istraživanja na pacovima potvrdila su oštećujući efekat primene MK-801 pre i odmah nakon familijarizacije pri kratkim (1 h) i dugim (24 h) retencionim intervalima (de Lima i sar., 2005). Ovakvi nalazi upućuju na bitnu ulogu NMDA receptora u procesima formiranja memorije, praćeno smanjenjem kognitivnih sposobnosti glodara pri delovanju MK-801. Dodatno, validnosti farmakološki indukovanih promena u NORT-u doprinosi činjenica da antipsihotici (klozapin, ali ne i haloperidol, antipsihotik prve generacije) poništavaju promene nastale akutnom primenom MK-801 (Karasawa i sar., 2008). U skorije vreme je ispitivan i uticaj kombinovane primene mirtazapina i risperidona na MK-801 izazvano smanjenje učenja u NORT-u, gde je jasno pokazan pozitivan uticaj kombinovane terapije kod miševa, bez efekta samih antipsihotika (Rogóz, 2013). Eksperimenti sa amfetaminom pokazuju dvojak uticaj; poboljšanje u testu prepoznavanja novog objekta na *Fmr1 knockout* miševima kod kojih je postojalo smanjenje diskriminacije, ali i oštećujući efekat kod genetski nepromenjenih životinja (Ventura i sar., 2004). Pri ponavljanoj primeni amfetamina pokazan je izostanak efekta u poređenju sa kontrolnim životinjama (Belcher i sar., 2005). Zbog nekonzistentnog uticaja amfetamina na ponašanje u testu prepoznavanja novog objekta, u protokolu farmakološki indukovanih promena amfetamin se mnogo manje koristi od skopolamina i antagonista NMDA receptora.

Vodeni lavirint je test sa velikom tradicijom primene, čijoj validnosti doprinosi i činjenica postojanja humanog analoga: virtuelni lavirint koji zahteva navigaciju kroz multimodalnu sredinu i u kome se često ispituju sposobnosti pacijenata obolelih od shizofrenije (Hanlon i sar., 2006; Kurtz i sar., 2007; Weniger i Irle, 2008; Folley i sar., 2010; Fajnerová i sar., 2014). U vodenom lavirintu je nedvosmisleno pokazano da starije životinje sporije uče, kao i da postoji jasna razlika u učenju među polovima (Blokland i sar., 2006), što dobro korelira sa nalazima iz virtuelnog vodenog lavirinta (Moffat i Resnick, 2002; Sneider i sar., 2015). Dva neurotransmitterska sistema najuže povezivana sa prostornim snalaženjem u vodenom lavirintu jesu glutamatergički i holinergički (D'Hooge i De Deyn, 2001). Lamberty i Gower (1991) su jasno pokazali oštećujući uticaj skopolamina, ali ne i metilskopolamina i amfetamina u vodenom lavirintu; dok je hiperaktivnost viđena sa skopolaminom i amfetaminom, učenje je bilo smanjeno samo pod dejstvom skopolamina. Istraživanja sa antagonistima NMDA receptora pokazala su konzistentno smanjenje učenja u vodenom

lavirintu (Ahlander i sar., 1999; Wass i sar., 2006). Antipsihotici su u ovom testu ispoljavali različite efekte na prostorno učenje i pamćenje (Skarsfeldt i sar., 1997; Hagan i Jones, 2005), a primenjeni u malim dozama vršili su reverziju defekta izazvanog akutnom i subhroničnom primenom antagonista NMDA receptora (Didriksen i sar., 2007; Beraki i sar., 2008; Mutlu i sar., 2011).

Modeli socijalnog prepoznavanja kod pacova postali su popularni posebno zbog mogućnosti otkrivanja novih neuronskih kola relevantnih za promene u socijalnim aspektima, viđene pre svega u autizmu (Moy i sar., 2004; Lim i sar., 2005). Kao i kod drugih memorijskih testova, antagonisti NMDA receptora smanjuju mogućnost socijalnog prepoznavanja (Hlinak i Krejci, 1994; Brigman i sar., 2009; Moy i sar., 2013); neonatalna primena fenciklidina čak dovodi do perzistentnog smanjenja socijalnog prepoznavanja kod odraslih pacova (Harich i sar., 2007). Iako je istraživanje uticaja antipsihotika na procese socijalne memorije još u razvoju, par studija otkrilo je mogući pozitivni efekat amilsulprida i klopazina na deficite izazvane akutnom i neonatalnom primenom fenciklidina (Terranova i sar., 2005). Pokazano je da modulacija holinergičkog sistema utiče na socijalno prepoznavanje kod glodara, pa je česta upotreba skopolamina za smanjenje sposobnosti socijalnog prepoznavanja (Mitchell i sar., 2006; Riedel i sar., 2009). Na validnost ovog testa utiče pre svega nemogućnost jasnog odvajanja prepoznavanja objekta od socijalne komponente prepoznavanja, koja zavisi ne toliko od vizuelnog koliko od olfaktornog sistema. Dodatno, u oboljenjima poput shizofrenije jasna razlika između socijalnih i kognitivnih deficita nije precizirana, s obzirom da neke studije pokazuju veliku korelaciju između socijalno-zavisne i ne-socijalne memorije kod pacijenata (Vauth i sar., 2004; Sergi i sar., 2007).

Farmakološka modulacija osolobađanja dopamina, kao i efekata glutamata i acetilholina preko NMDA i muskarinskih receptora, predstavlja validiran i često korišćen pristup u ispitivanjima vezanim za shizofreniju. Modulacija α_5 GABA_A receptora je prepoznata kao potencijalno mesto uticaja na ponašanje povezano sa shizofrenijom. Uporedno praćenje ponašanja životinja u uslovima promena izazvanih primenom dizocilpina, amfetamina ili skopolamina omogućuje da se utvrdi mogući uticaj selektivne pozitivne ili negativne modulacije α_5 GABA_A receptora na parametre koji se povezuju sa pozitivnim, negativnim i kognitivnim elementima shizofrenije. Naime, iako se akcenat stavlja pre svega na testove i parametre koji procenjuju kognitivne procese, pri određenom doznom režimu dizocilpin,

skopolamin i amfetamin izazivaju i izraženu hiperlokomociju i hiperaktivnost. S tim u vezi optimalnim se smatra upravo onaj animalni model koji može da razdvoji kognitivne od nekognitivnih bihevioralnih efekata.

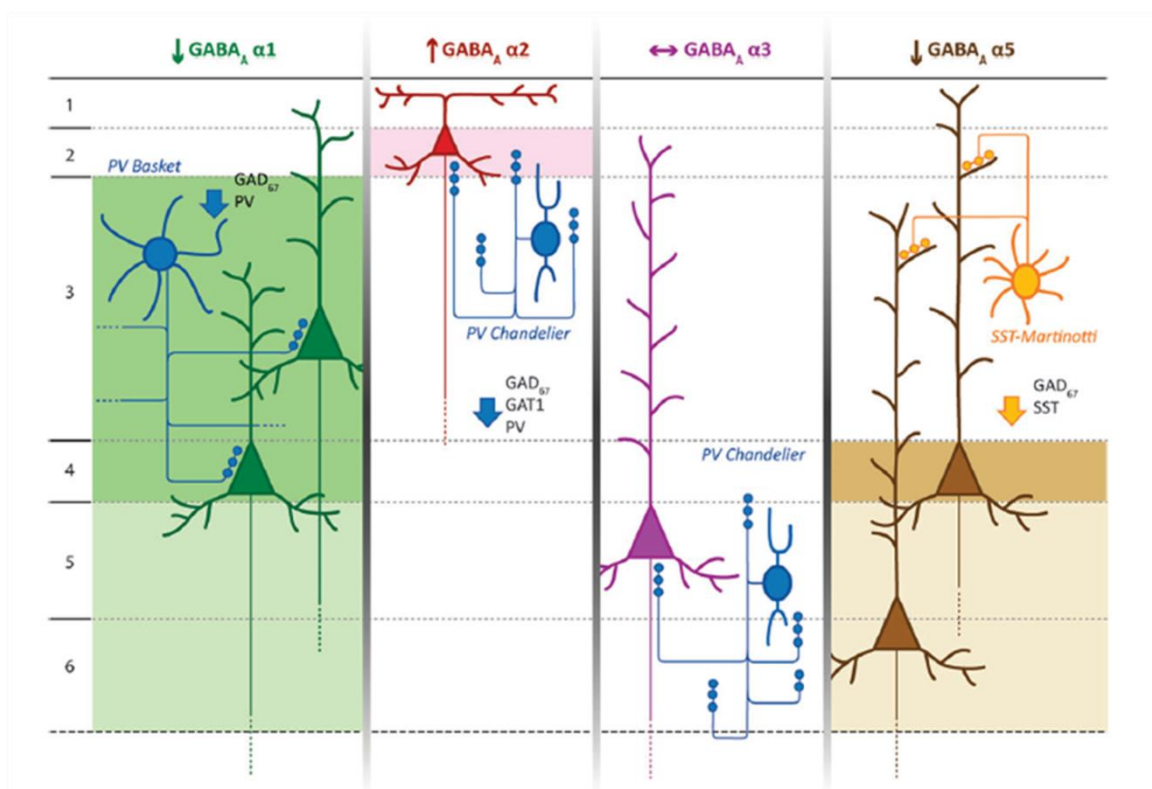
1.2.1 Hipofunkcija NMDA receptora (MK-801) i GABA-ergički sistem u shizofreniji

Važan neurotransmiter uključen u memorijske procese je glutamat, koji delom deluje preko NMDA receptora, koji su direktno povezani sa procesima formiranja memorije (Riedel i sar., 2003). Dokumentovano je da ponavljana, visokofrekventna stimulacija NMDA receptora indukuje procese dugotrajne potencijacije (eng. *long term potentiation*, LTP) na isečcima hipokampusa, što je mehanizam koji se direktno povezuje sa sinaptičkom plastičnošću u toku procesa učenja (Rezvani, 2006; Morris, 2013). MK-801 je selektivan, nekompetitivan antagonist sa visokim afinitetom za NMDA receptore (Wong i sar., 1986). Bihevioralne promene nastale blokadom NMDA receptora dokazuju relevantnost ovakvog modela za proučavanje kognitivnih deficita povezanih sa demencijom, Alzheimerovom bolešću (Ellison, 1995; Newcomer i sar., 2000; Newcomer i Krystal, 2001) i shizofrenijom (Csernansky, 2005). Pokazano je da promene indukovane upotrebom MK-801 mogu biti antagonizovane klinički efikasnim prokognitivnim lekovima, npr. holinesteraznim inhibitorima donepezilom i galantaminom (Csernansky, 2005). Model izazivanja kognitivnog smanjenja upotrebom 0,1 mg/kg MK-801 validiran je kod mužjaka miševa i pacova kao pouzdan model za selektivno oštećenje memorije bez posledičnih nekognitivnih neželjenih efekata poput senzorno-motornih deficita, dok upotrebom većih doza dolazi do hiperaktivnosti životinja i stereotipnog ponašanja, pa čak i do ataksije (van der Staay i sar., 2011). Dodatno je okarakterisan animalni model indukovanja, primenom MK-801, promena koje imitiraju pozitivne simptome viđene u shizofreniji (Andiné i sar., 1999).

NMDA receptori uglavnom regulišu okidanje kortikalnih GABA-ergičkih interneurona, tako da inhibicija NMDA receptora dovodi paradoksalno do aktivacije piramidalnih neurona. Ovaj indirektan efekat dezinhibicije piramidalnih neurona konzistentan je sa nalazom da inhibicija interneurona antagonistima NMDA receptora počinje i dostiže plato pre nego što inhibicija NMDA receptora počne na piramidalnim neuronima (Homayoun i Moghaddam, 2007). Dodatno, aktivnost kortikalnih interneurona je jako osetljiva na toničnu

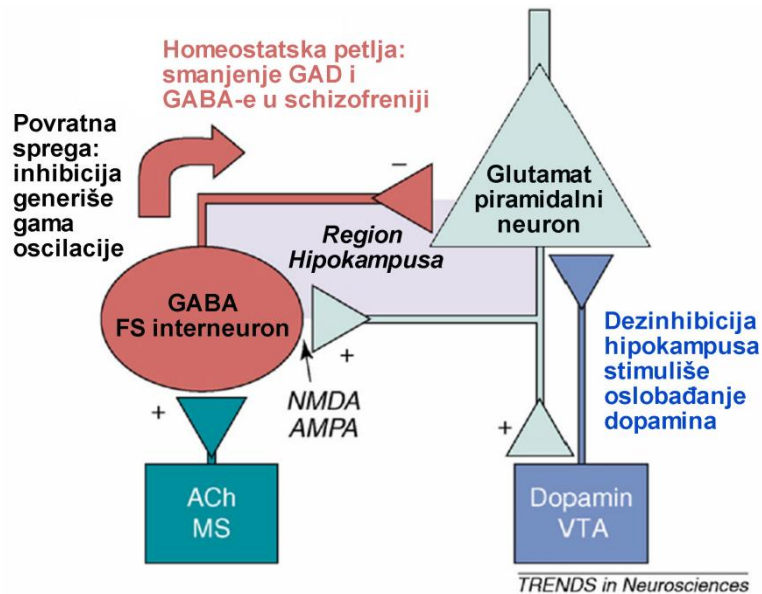
regulaciju posredstvom NMDA receptora, dok za bazalnu aktivnost piramidalnih neurona nisu direktno odgovorni NMDA receptori. Smanjena funkcija NMDA receptora dovodi do kortikalne ekscitacije i oštećuje kognitivne funkcije povezane sa prefrontalnim korteksom (Homayoun i Moghaddam, 2007). U prefrontalnom korteksu postoje različiti tipovi interneurona koji se klasifikuju na osnovu morfologije, kao i ekspresije različitih kalcijum-vezujućih proteina (Markram i sar., 2004). Interesantno je da interneuroni koji ekspimiraju kalbindin- ili kalretinin-vezujuće proteine primarno inervišu distalne dendrite piramidalnog neurona, dok su parvalbumin pozitivni interneuroni odgovorni za pravljenje sinapse na inicijalnom segmentu aksonskog brežuljka i samim tim dominantno odgovorni za regulaciju okidanja piramidalnog neurona. Funkcionalni deficit GABA-ergičkih interneurona pokazan je u shizofreniji (Lewis i sar., 2005), što dodatno upućuje na utisak da antagonisti NMDA receptora oslikavaju simptome viđene u shizofreniji povezane sa deficitom GABA-ergičkih interneurona. Zato je i dobra validnost modela zasnovnog na akutnoj aplikaciji antagoniste NMDA receptora (npr. fenciklidin, ketamin ili MK-801): validnost sličnosti se ogleda u hiperlokomociji, stereotipiji, ali i kognitivnom smanjenju, konstrukcijska u gubitku parvalbumin pozitivnih neurona i smanjenju glutamat dekarboksilaze (GAD_{67}), a potencijalnoj predikcionoj validnosti doprinosi dobra osetljivost na antipsihotike (de Lima i sar., 2005; Rung i sar., 2005; Romón i sar., 2011; Adell i sar., 2012; Neill i sar., 2014).

Promene u GABA-ergičkom sistemu u shizofreniji dugo su poznate i pokazuju smanjenje koncentracije GABA-e u korteksu (Perry i sar., 1979). Novija istraživanja potvrđuju promene u GABA-ergičkoj transmisiji, ali i otkrivaju promene u ekspresiji pojedinih podjedinica $GABA_A$ receptora u korteksu (Slika 4) (Beneyto i sar., 2010, Hoftman i sar., 2015). Najznačajnija promena je svakako statistički značajno smanjenje ekspresije glutamat dekarboksilaze (eng. *glutamic acid decarboxylase*, GAD_{67}) ali i smanjenje α_5 podjedinice $GABA_A$ receptora u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu *post mortem* (Duncan i sar., 2010).



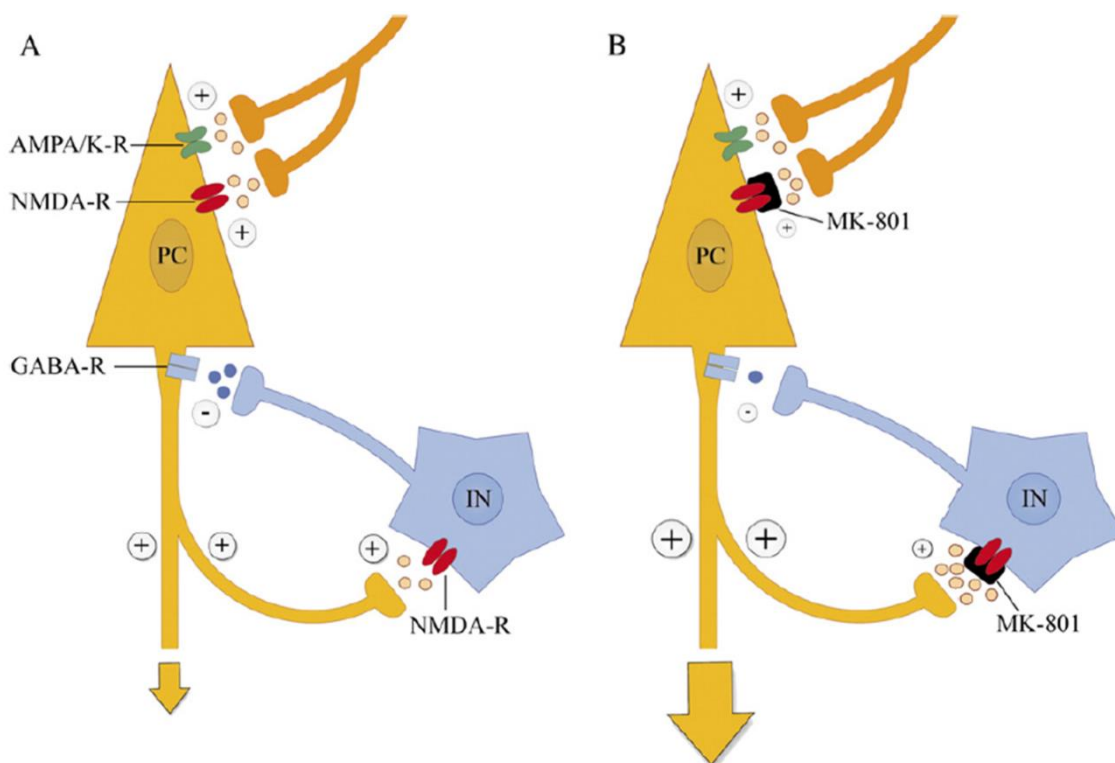
Slika 4. Shematski prikaz promena u pre- i postsinaptičkim markerima GABA-ergičke transmisije u dorzolateralnim delovima prefrontalnog korteksa kod pacijenata obolelih od shizofrenije. *PV Basket* = parvalbumin pozitivne košaraste ćelije, *PV Chandelier* = parvalbumin pozitivne Šandelijer ćelije, *SST-Martinotti* = somatostatin pozitivne Martinoti ćelije, GAT 1 = transporter 1 za GABA-u, GAD₆₇ = glutamat dekarboksilaza (preuzeto i prilagođeno iz Beneyto i sar., 2010)

Promene nisu isključivo prisutne u korteksu već se mogu videti i u regiji hipokampusa (Slika 5), pri čemu je smanjenje parvalbumin-pozitivnih neurona izraženije u hipokampusu nego prefrontalnom korteksu (Tooney i Chahl, 2004; Lisman i sar., 2008). Dezinhibicija piramidalnih ćelija u hipokampusu usled primene antagonista NMDA receptora dovodi do povećanja u metaboličkoj aktivnosti, što se danas proučava funkcionalnim *imaging*-om. Gama oscilacije (30-100 Hz) koje oslikavaju sinhrono okidanje grupa piramidalnih ćelija redukovane su u shizofreniji, dok stepen ovog smanjenja korelira sa ozbiljnošću pre svega negativnih simptoma (Lee i sar., 2003; Uhlhaas i Singer, 2010).



Slika 5. Pojednostavljena shema povezanosti neurotransmiterskih sistema u shizofreniji kod disfunkcije NMDA receptora. Petlje: hipokampus-ventralna tegmentalna regija (VTA) i recipročna veza između piramidarnih neurona i brzookidajućih (eng. *fast-spiking*, FS) interneurona. Abnormalnosti u frekvenciji gama oscilacija se povezuju sa kognitivnim i negativnim simptomima. Pokazan je i holinerški efekat na brzookidajuće interneurone, Ach = acetilholin, MS = medijalni septalni region (preuzeto i prilagođeno iz Lisman i sar., 2008).

Animalni model koji oslikava prethodno navedene promene u GABA-ergičkoj transmisiji je oštećenje izazvano primenom antagoniste NMDA receptora – MK-801 (Braun i sar., 2007). Povezanost primene MK-801 i promene izazvane u lokalnom kolu GABA-ergičkih interneurona u hipokampusu, kao i prefrontalnom korteksu, prikazana je na Slici 6.



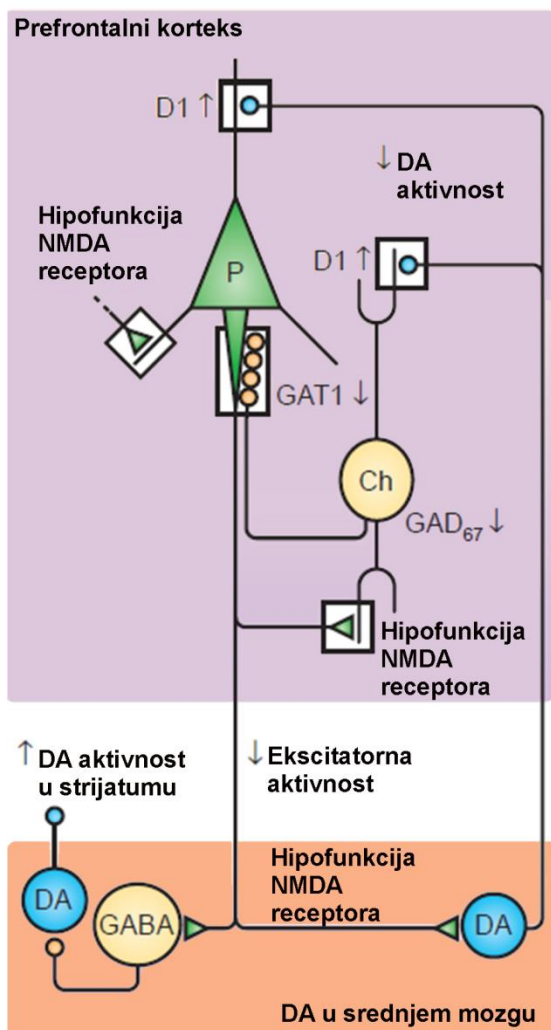
Slika 6. Model lokalnog neuralnog kola dezinhibicije kao odgovora na MK-801. GABA-ergički neuron (IN) prima signal od piramidalnog (PC) neurona i tako aktiviran kontrolira inhibicijom piramidalnu ćeliju (A). U prisustvu MK-801 lokalna povratna sprega je oštećena – nema inhibicije piramidalnog neurona, dok ekscitatorni stimulus piramidalne ćelije ostaje nepogođen delovanjem MK-801 (zbog različite osetljivosti NMDA receptora na efekte antagoniste i zbog prisustva drugih receptora na piramidalnom neuronu (AMPA i kainatni receptori = AMPA/K R)) (B). Preuzeto i prilagođeno iz Braun i sar., 2007.

1.2.2 Amfetamin i dopaminska hipoteza u shizofreniji

Mnogi modeli koji se koriste za istraživanje psihotičnih poremećaja bazirani su na dopaminskoj teoriji, po kojoj psihoza nastaje zbog deregulacije dopaminskog sistema. Do teorije se došlo zapažanjem da svi antipsihotici deluju kao antagonisti dopaminskih receptora (Seeman, 2010; 2013). Ovu teoriju su dodatno podržale studije na ljudima sa prethodno dijagnostikovanom psihozom, ali i zdravim dobrovoljcima, kod kojih su se nakon primene dopaminskog agoniste, ili indirektnog dopaminskog agoniste – amfetamina javljali pre svega pozitivni simptomi viđeni u shizofreniji (Howes i Kapur, 2009). Zato je amfetamin predložen kao konstitutivni farmakološki model za izazivanje psihoza generalno. Amfetamin ispoljava svoje efekte povećavanjem ekstracelularnog dopamina i produžavanjem efekata koji se ostvaruju preko dopaminskih receptora u strijatumu, delujući

preko tri mehanizma: supstrat je za dopaminski transporter (DAT), preko koga kompetitivno inhibira preuzimanje dopamina; olakšava izlazak dopamina iz vezikula u citoplazmu i promovira DAT-posredovan reverzni transport dopamina u sinaptičku pukotinu nezavisno od oslobađanja indukovanog akcionim potencijalom (Fleckenstein i sar., 2007; Calipari i Ferris, 2013). Amfetaminom indukovane promene kod životinja kao model shizofrenije dobro su okarakterisane merenjem prepulsne inhibicije, hiperlokomocije, stereotipnog ponašanja i latentne inhibicije, ali i u testovima učenja i pamćenja u kojima amfetamin nije izazivao oštećenja (Featherstone i sar., 2007; 2008). Korišćenje amfetamina u kognitivnim testovima je zahtevno, budući da u manjim dozama povoljno deluje na memorijske procese, dok u određenim doznim režimima može da ošteti kogniciju (Fletcher i sar., 2005; 2007). U uslovima primene amfetamina kod životinja, pored bihevioralnih efekata jasno je pokazano i povećano oslobađanje dopamina u strijatumu, kao i senzitivizacija na taj efekat (Paulson i Robinson, 1995; 1996; Breier i sar., 1997). Dodatno je hiperdopaminska teorija u shizofreniji potvrđena *imaging* studijama koje su pokazivale pogoršanje psihoza kod pacijenata nakon davanja amfetamina, pri čemu je stepen pogoršanja bio u direktnoj korelaciji sa procenjenim oslobođenim dopaminom (Laruelle i sar., 1999). Pored promena viđenih u strijatumu, funkcija prefrontalnog korteksa je takođe izmenjena u shizofreniji; primećen je smanjen cerebralni protok krvi u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu kod pacijenata koji su imali kognitivne poremećaje (Daniel i sar., 1991). Ovakva „hipofrontalnost“ se mogla primetiti i kod eksperimenata na životinjama sa amfetaminom gde je pored kognitivnih deficita primećen i redukovani nivo dopamina u prefrontalnom korteksu (Castner i sar., 2005). Činjenica da u prefrontalnom korteksu postoji smanjenje dopamina dovela je do re-definisanja dopaminske hipoteze, kao hiperdopaminsko stanje u strijatumu i hipodopaminsko stanje u prefrontalnom korteksu, čemu se kasnije pridodavala uloga u izazivanju kognitivnih deficita i negativne simptomatologije (Davis i sar., 1991). Dalja istraživanja su zato klasične elemente dopaminske hipoteze, a to su previše aktivan mezolimbčki dopaminski sistem i smanjeno aktivan mezokortikalni dopaminski put, posmatrala kao promene izazvane u „finalnom zajedničkom putu“ (Howes i Kapur, 2009). Dodatno je hipotetisano da disfunkcija NMDA receptora može da dovede do disregulacije dopamina preko kompleksnih veza između glutamatergičkih i dopaminergičkih neurona, ali i GABA-ergičkih mehanizama. Tako je disfunkcijom NMDA receptora mogla da se objasni pojava kako pozitivnih tako i negativnih simptoma u shizofreniji (Schwartz i sar., 2012; Gruber i sar., 2014). Naime, preko efekta na funkciju

GABA-ergičkih interneurona dobija se simultano hiperfunkcija mezolimbickog dopaminskog sistema (pozitivni simptomi) i hipofunkcija mezokortikalnog dopaminskog sistema (negativni simptomi) (Slika 7).



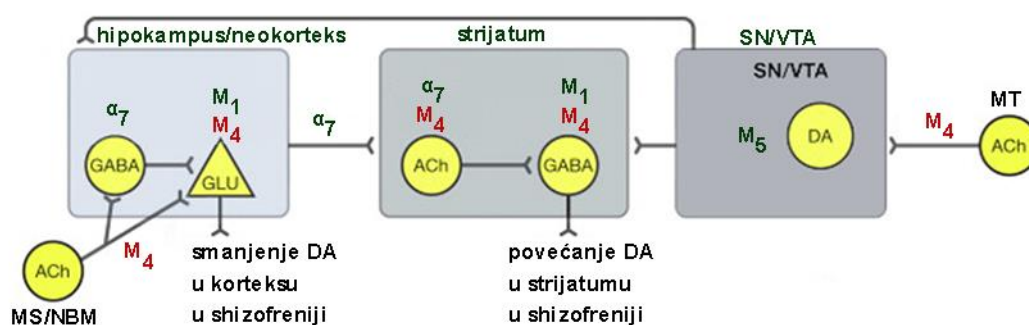
Slika 7. Hipofunkcija NMDA receptora smanjuje aktivnost kortikalnih ekscitatornih neurona koji se projektuju u dopaminska jezra srednjeg mozga, dovodeći do smanjene aktivnosti dopaminskih neurona koji se projektuju nazad u dorzolateralni prefrontalni korteks i povećane aktivnosti dopaminskih neurona koji vode do strijatuma. Smanjenje dopamina u prefrontalnom korteksu dovodi do kompenzatornog, ali funkcionalno nedovoljnog povećanja ekspresije D1 dopaminskih receptora. Hipofunkcija NMDA receptora i promjenjen D1 signalni put dovode do smanjenja aktivnosti parvalbumin pozitivnih ćelija kroz smanjenu ekspresiju GAD67 enzima, manje GABA-e i nishodnu regulaciju GAT1 transportera. DA = dopamin, GAD = glutamat dekarboksilaza (preuzeto i prilagođeno iz Lewis i Gonzalez-Burgos, 2006)

1.2.3 Skopolamin i holinergički sistem u shizofreniji

Skopolamin je okarakterisan kao relativno robustan i pouzdan alat za umanjeње kognicije (Klinkenberg i Blokland, 2010). Poznato je da je holinergički sistem usko povezan sa kognitivnim procesima (Bentley i sar., 2011; Ménard i sar., 2015), i stoga ne čudi činjenica da je najčešće korišćeni animalni model prolaznog farmakološki indukovanoг smanjenja memorije upravo sistemski tretman muskarinskim antagonistom skopolaminom (Klinkenberg i Blokland, 2010). Hipoteza koja objašnjava ulogu acetilholina u procesima učenja i pamćenja upućuje na važnu ulogu u hipokampalnim procesima koji se dešavaju prilikom sticanja memorije i pozivanja naučenog (Hasselmo, 2004; Hasselmo i Sarter, 2011). Iako je originalna holinergička hipoteza postavljena još 1982. godine (Bartus i sar., 1982), vremenom se dosta menjala zahvaljujući istraživanjima koja su upućivala da su testovi koji ispituju pažnju mnogo osjetljiviji na promene izazvane skopolaminom nego testovi učenja i pamćenja, što je upućivalo da su mnogo manje doze skopolamina potrebne za oštećenje pažnje nego kognitivnih procesa (Klinkenberg i Blokland, 2010). Dodatno, holinergička hipoteza upućivala je na gubitak holinergičke funkcije u centralnom nervnom sistemu prilikom starenja, što se povezivalo sa smanjenjem kognitivnih funkcija kod starenja, i posebno u Alzheimerovoj bolesti (Schliebs i Arendt, 2011).

Alternativni pristup za lečenje shizofrenije predstavlja upotrebu liganada koji imaju određenu aktivnost na muskarinskim receptorima, čineći deo takozvane muskarinske holinergičke hipoteze shizofrenije (Raedler i sar., 2007; Jones i sar., 2012; Sarter i sar., 2012). Iako se ova teorija već smatra klasičnom, u skorije vreme su se pojavili dokazi o deregulaciji muskarinskog holinergičkog sistema u shizofreniji koja utiče na hiperdopaminsko stanje u strijatumu vezano za pozitivne simptome, ali i na poremećaje regulacije u kortikalnim regijama povezane sa kognitivnim funkcijama (McKinzie i Bymaster, 2012; Scarr i sar., 2013). Ovome doprinosi i recipročna uloga koju dopamin i acetilholin imaju u regijama relevantnim za shizofreniju (McKinzie i Bymaster, 2012). U hipokampusu, M₁ i M₄ muskarinski receptori igraju bitnu ulogu u holinergičkoj modulaciji piramidalnih neurona (Dasari i Gulleddg, 2011), dok su muskarinski M₄ receptori lokalizovani sa dopaminskim i modulišu efekte dopamina vezane za motornu funkciju,

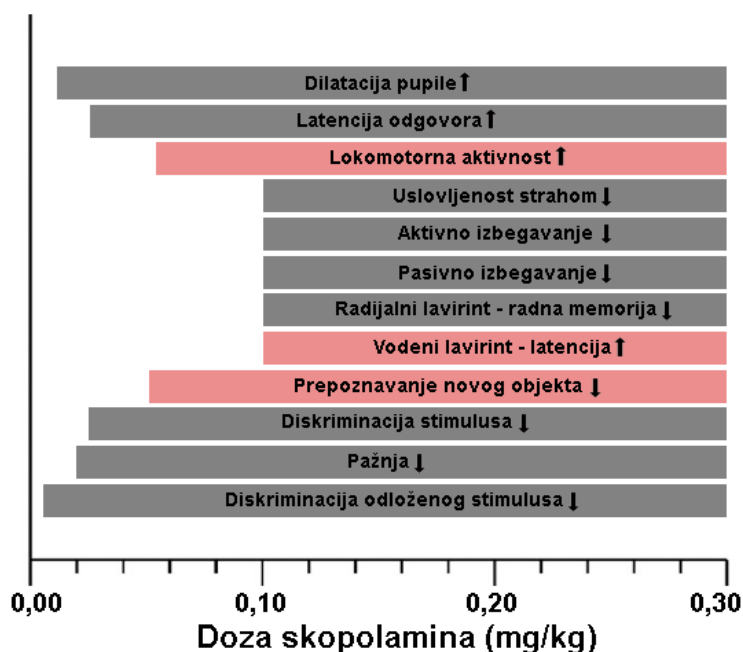
raspoloženje i senzornu percepciju (Gomez i sar., 1999). Tako ne čude jasni antipsihotični efekti agonista M₄ muskarinskih receptora, i prokognitivni potencijal agonista selektivnih za M₁ muskarinske receptore kod glodara (Brady i sar., 2008; Bradley i sar., 2010; Leach i sar., 2010). Među parcijalnim agonistima M₁/M₄ receptora izdvojio se ksanomelin, koji je pokazao izvesno antipsihotično i prokognitivno dejstvo u prekliničkim modelima, ali i u kliničkim studijama smanjio psihotične simptome kod pacijenata sa Alzheimerovom bolešću, ali i pozitivne, negativne i kognitivne kod pacijenata obolelih od shizofrenije (Shekhar i sar., 2008; Barak i Weiner, 2011). Muskarinski M₅ receptori su lokalizovani u supstanciji nigri i ventralnoj regiji tegmentuma, tako da modulišu oslobađanje dopamina iz ovih struktura (Zhang i sar., 2002). Shematski prikaz uloge acetilholina u shizofreniji dat je na Slici 8. Imajući u vidu povezanost muskarinskog sistema sa nastankom shizofrenije, indukcija promena primenom skopolamina, pored kognitivnih, oponaša delimično i poremećaje pozitivne i negativne simptomatologije viđene u shizofreniji.



Slika 8. Pojednostavljen shematski prikaz ekspresije receptora za acetilholin u regijama od interesa za shizofreniju. M₁, M₄ i M₅ – muskarinski M₁, M₂ i M₅ receptori, α_7 – nikotinski, ACh – acetilholinski, DA – dopaminski, GABA – GABA-ergički neuroni, MS/NBM – medijalni septum/nucleus basalis (Meynert), MT – mezopontalni tegmentum, SN – substantia nigra pars compacta, VTA – ventralna tegmentalna regija. Preuzeto i prilagođeno iz Karam i sar., 2010.

Skopolamin je neselektivan antagonist muskarinskih receptora sa visokim afinitetom za ove receptore (oko 1 nM u mozgu pacova, Klinkenberg i Blokland, 2010), ali i sa mogućnošću ostvarivanja nikotinskih efekata pri velikim dozama. Sistemskom primenom skopolamina ne mogu se razdvojiti periferni i centralni efekti, i zato je sintetisan metilskopolamin (skopolanim metilbromid), koji ne prolazi krvno-moždanu barijeru i u manjim dozama ne izaziva centralne efekte. U neželjene efekte skopolamina spadaju dilatacija pupile (midrijaza, M₃ receptori), koja svakako utiče na vizuelne diskriminacijske testove,

smanjenje salivacije (M_3 ali i M_1 i M_5 receptori), što utiče na otežano uzimanje čvrste hrane, kao i uticaj na funkciju glatkih mišića (M_2 i M_3 receptori) (Klinkenberg i Blokland, 2010). Bihevioralni efekti skopolamina uključuju pre svega hiperlokomociju i smanjenje učenja i pamćenja (test prepoznavanja novog objekta, Morris-ov vodeni lavirint, aktivno i pasivno izbegavanje, uslovljavanje strahom). Interesantno je da u testovima vodenog lavirinta koji ispituju uticaj na prostorno pamćenje efekat skopolamina može zavistiti od starosti životinja, ali i od osvetljenosti prostora u kome se vrši testiranje, što upućuje na procese koji nisu vezani samo za sticanje prostorne memorije, već na širi spektar oštećenja (Klinkenberg i Blokland, 2010). Poznato je da skopolamin izaziva izraženije deficite kognicije kod starije populacije i dramatičnije pogađa pacijente obolele od Alzheimerove bolesti nego starije kod kojih demencija nije izražena (Terry i Buccafusco, 2003). Zapravo, holinergički deficit izazvan skopolaminom i specifične promene u elektroencefalogramu povezivane su sa promenama viđenim u Alzheimerovoj bolesti, mada je slično dizocilpinu, uočena promena u kortikalnom elektroencefalogramu u okviru gama oscilacija (Rodriguez i sar., 2004; Terry, 2006). Shematski prikaz različitih dozno-zavisnih efekata skopolamina dat je na Slici 9 (Klinkenberg i Blokland, 2010). Uprkos nemogućnosti da selektivno utiče samo na jedan aspekt ponašanja i stoga diskutabilnoj validnosti modela (konstrukcijska i prediktivna), skopolamin je dugo bio zlatni standard za farmakološki izazvane promene pre svega memorijskih procesa. Danas se smatra da bi ligandi koji su selektivni antagonisti muskarinskih M_1 receptora (biperiden, pirenzepin) bili dobra, mada ne i idealna zamena za skopolamin u testovima smanjenja kognicije. Naime, ne samo što nema dovoljno jasnih dokaza o ulozi ovog podtipa receptora u procesima pažnje, učenja i nekognitivnim efektima, već i optimalno selektivni ligandi još nisu razvijeni (Heinrich i sar., 2009).



Slika 9. Shematski prikaz odnosa doze i efekta skopolamina u nekoliko bihevioralnih testova. Skopolamin je primenjivan sistemski kod pacova ili miševa (doze primenjivane kod miševa ne mogu biti direktno upoređivane sa onima datim pacovima). Leva strana sheme predstavlja minimalnu dozu pri kojoj se javljao dati bihevioralni efekat u odgovarajućem testu. Na vrhu su dati nekognitivni efekti skopolamina. Crvenom bojom su označeni testovi u kojima su ispitivani efekti skopolamina u sklopu istraživanja u disertaciji. Preuzeto i prilagođeno iz Klinkenberg i Blokland, 2010.

1.3 Ligandi selektivni za α_5 GABA_A receptore

Na rezultatima dobijenim na genetski izmenjenim životinjama temeljio se razvoj liganada koji bi bili selektivni za α_5 GABA_A receptore, a koji bi posledično bili bez neželjenih efekata koje izazivaju tipični benzodiazepini, kao neselektivni modulatori GABA_A receptora. Neselektivni inverzni agonisti BDZ mesta vezivanja GABA_A receptora bili su uspešni u reverziji skopolaminom indukovano smanjenja kognitivnih sposobnosti kod pacova i ljudi, ali su imali prokonvulzivni i anksiogeni potencijal (Duka i sar., 1996; Kawasaki i sar., 1996). Zato je, u cilju dobijanja supstanci sa potencijalno prokognitivnim efektom bez neželjenih dejstava, od strane farmaceutskih kompanija (Merck i Roche) sintetisana serija inverznih agonista BDZ mesta vezivanja selektivnih za α_5 GABA_A receptore.

Merck-ova grupa istraživača opisala je seriju supstanci, visokog afiniteta i sa odgovarajućom efikasnošću za α_5 podjedinicu GABA_A receptora, sa značajnim pozitivnim efektom u bihevioralnim testovima zavisnim od hipokampusa, a bez prokonvulzivnog potencijala (Chambers i sar., 2003). Ligand L655,708 jedan je od predstavnika negativnih modulatora sa selektivnošću po afinitetu za α_5 GABA_A receptore (Quirk i sar., 1996; Navarro i sar., 2002). Ispitivan u standardnom Morisovom vodenom lavirintu ispoljio je pozitivan uticaj na aspekte prostornog učenja (Atack i sar., 2006), ali je bilo i rezultata koji su upućivali na njegov anksiogeni potencijal kod miševa (Navarro i sar., 2002). U novije vreme ispitivan je kod reverzije kratkotrajnog gubitka pamćenja nakon anestezije izofluranom, gde je ostvario pozitivne efekte, koji su bili u skladu sa saznanjima da do anterogradnog memorijskog deficita usled upotrebe anestetika dolazi upravo njihovim delovanjem preko α_5 GABA_A receptora (Saab i sar., 2010; Zurek i sar., 2012). S druge strane, novija istraživanja sa L655,708 ukazuju na potencijalno pozitivan efekat ovog liganda kod oporavka od moždanog udara, pa supstance koje smanjuju toničnu inhibiciju predstavljaju jednu od predloženih terapijskih mogućnosti za ovu indikaciju (Clarkson i sar., 2010). MRK-536, još jedan ligand sintetisan u Merck-u, sa selektivnošću po afinitetu i efikasnosti za α_5 GABA_A receptore, bio je uspešan u prekliničkim testovima, poput protokola za procenu radne memorije u Morisovom vodenom lavirintu (Chambers i sar., 2003; Atack i sar., 2011b). Od svih Merck-ovih jedinjenja, α IA ligand se izdvojio kao pouzdano efikasan u prekliničkim testovima i sa njim su nastavljena klinička istraživanja (Dawson i sar., 2006; Atack, 2010). α IA je supstanca sa subnanomolarnim afinitetom ekvivalentnim za α_1 , α_2 , α_3 i α_5 subjedinicu GABA_A receptora i sa inverznom agonističkom efikasnošću za BDZ mesto vezivanja α_5 GABA_A receptora; bez prokonvulzivne i anksiogene aktivnosti, ali sa pozitivnim efektom pri proceni radne memorije u Morisovom vodenom lavirintu (Dawson i sar., 2006). Ova supstanca uspeva da poveća EPSP u CA1 regionu hipokampusa, i predložena je kao terapijska opcija za poremećaje povezane sa kognitivnim deficitom. Iako je pokazano da kod mlađe populacije α IA dovodi do reverzije etanolom izazvanog kognitivnog deficita (Nutt i sar., 2007), kod starijih osoba ovaj efekat ne samo da nije primećen, već je neočekivano α IA dovodio do pogoršanja simptoma kognitivnog oštećenja (Atack, 2010). Prekidu kliničkih istraživanja sa α IA ligandom doprinela je renalna toksičnost njegovog metabolita otkrivana u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima i loša podnošljivost od strane starijih ispitanika (Atack, 2010). Razvijen je i ligand α IA-II, koji je istraživan samo u prekliničkim kognitivnim testovima (Collinson i

sar., 2006). Skorije, α IA je ispitivan u modelu kognitivnog deficita povezanog sa Daunovim sindromom kod miševa, gde je ostvario pozitivan uticaj (Braudeau i sar., 2011a; 2011b). U kliničkim istraživanjima je pored α IA liganda ispitivan i MRK-016, ligand koji je pokazivao visoku efikasnost za α_5 GABA_A receptore (veću u poređenju sa α IA ligandom), sa nanomolarnim afinitetom za α_1 , α_2 , α_3 i α_5 subjedinicu GABA_A receptora. Poput α IA, MRK-016 je doveo do povećanja LTP na mišijim hipokampalnim presecima i to u većem stepenu nego α IA, i pokazao pozitivne efekte na radnu memoriju u Morisovom vodenom lavirintu (Atack i sar., 2009). Iako nije izazivao renalnu toksičnost kod ljudi, klinička istraživanja sa MRK-016 su prekinuta zbog loše podnošljivosti od strane starijih ispitanika već pri dozi od 0,5 mg (Atack i sar., 2009). Supstance poput MRK-016 i L655,708 počele su da se ispituju i u stresom indukovanom modelu depresije. Zbog dobijenih pozitivnih rezultata na životinjama, negativni alosterne modulatori selektivni za α_5 GABA_A receptore predloženi su kao nova klasa brzodelujućih antidepresiva čija će se uloga u depresiji narednih godina intenzivnije istraživati (Fischell i sar., 2015).

Pristup istraživača u Roche-u je bio da se sintetiše supstanca sa pre svega funkcionalnom selektivnošću za α_5 podjedinicu GABA_A receptora (Achermann i sar., 2009; Ballard i sar., 2009). Iako su Roche-ova jedinjenja ispoljavala funkcionalnu selektivnost za α_5 GABA_A receptore, mali broj supstanci se izdvojio kao selektivan i po afinitetu (supstance 10e i 11f, Buettelmann i sar., 2009; RO4938581 i RO4882224, Knust i sar., 2009). Supstance RO4938581 i RO4882224 su ispitivane u skopolaminom indukovanom smanjenju radne memorije i dobijena je reverzija kognitivnog deficita (Knust i sar., 2009). RO4938581 je pokazao pozitivan efekat i u testu diazepamom indukovnog kognitivnog deficita kod glodara i u testovima ispitivanja kognitivnih funkcija kod primata, bez anksiogenog i prokonvulzivnog potencijala (Ballard i sar., 2009). Konačno, RO4938581 je ispitivan u za shizofreniju relevantnom modelu fenciklidinom izazvanog kognitivnog deficita, gde je pozitivan efekat ostvaren u testu prepoznavanja novog objekta, kao i u smanjenju hiperlokomocije izazvane primenom amfetamina (Redrobe i sar., 2012). Od maja 2014. u toku je i II faza kliničkih istraživanja za indikaciju poboljšanja kognitivnog deficita u Daunovom sindromu sa predstavnikom negativnih alosterne modulatora selektivnih za α_5 GABA_A receptore, RO5186582 (INN basmisanil, RG-1662), naslednikom RO4938581 liganda (Möhler, 2012; <https://clinicaltrials.gov>).

Iako je negativna modulacija α_5 GABA_A receptora detaljno istraživana proteklih godina, još uvek nema odobrenih indikacija za ove lekove kao potencijalno prokognitivne (Froestl i sar., 2014). Dodatno, u modelima smanjenja kognitivnih funkcija povezanog sa starenjem pokazano je da izostaju povoljni efekti negativne modulacije α_5 GABA_A receptora. Istraživanja na miševima sa redukovanim brojem α_5 GABA_A receptora pokazuju oštećenje kognitivnih funkcija u testu prepoznavanja lokacije novog objekta, kao i hiperaktivnost (Prut i sar., 2010). Tome u prilog ide i činjenica da je u kliničkoj studiji α_5 IA pogoršao kognitivni deficit kod starijih ispitanika (Atack, 2010), te se može dovesti u pitanje korisnost upotrebe inverznih agonista BDZ mesta vezivanja selektivnih za α_5 GABA_A receptore u kognitivnim deficitima povezanim sa starenjem. Danas sve veći broj dokaza iz prekliničkih i kliničkih istraživanja upućuje da bi pozitivni modulatori, selektivni za α_5 podjedinicu GABA_A receptora, mogli imati primenu u poboljšanju kognitivnih disfunkcija povezanih sa starenjem (Koh i sar., 2013). Zbog povećane hipokampalne aktivnosti pre svega u CA3 regionu, povezane sa smanjenjem kognitivnih funkcija pri starenju (Wilson i sar., 2005), pokazano je da male doze antiepileptika smanjenjem povećane hipokampalne aktivnosti imaju pozitivne efekte na kognitivne sposobnosti (Koh i sar., 2010). Dodatno, pokazano je da u početnim stadijumima Alzheimerove bolesti postoji izvestan nedostatak α_5 subjedinice GABA_A receptora (Rissman i sar., 2003). Time je otvoreno polje za istraživanje pozitivnih modulatora α_5 GABA_A receptora kao potencijalne terapijske opcije u lečenju kognitivnih deficita kod starih, iako se zna da povećana aktivnost na α_5 podjedinici GABA_A receptora može da dovede do smanjenja učenja i pamćenja, što je utvrđeno ispitivanjem agoniste α_5 GABA_A receptora, NS-11394, u vodenom lavirintu i u testu kontekstualnog uslovljavanja strahom kod pacova (Mirza i sar., 2008; Hofmann i sar., 2012). Proteklih godina se sve više istražuju i pozitivni modulatori selektivni za α_5 subjedinicu kao potencijalni lekovi za kognitivne deficite povezane sa shizofrenijom (Gill i sar., 2011; Gill i Grace, 2014). Ligand QH-II-66 (Huang i sar., 2000), pozitivni modulator α_5 GABA_A receptora, smanjio je hiperaktivaciju izazvanu amfetaminom, ali je u testu prepoznavanja novog objekta smanjivao kognitivne funkcije i nije dalje ispitivan u fenciklidinom izazvanom oštećenju kognicije (Redrobe i sar., 2012). Iako je predloženo da se i pozitivnom i negativnom modulacijom α_5 GABA_A receptora mogu postići poboljšavajući kognitivni efekti u zavisnosti od smera postojećeg nesklada u odnosu inhibitornih i ekscitatornih signala (Gill i Grace, 2014), još uvek nema afirmativnih nalaza sa pozitivnim modulatorima ovih receptora.

Pored farmaceutskih kompanija i akademske ustanove, poput grupe sa Univerziteta u Viskonsinu (University of Wisconsin—Milwaukee, SAD) kojom rukovodi prof. James M. Cook, sintetišu brojne ligande čiji *in vitro* profili ukazuju na selektivnost po afinitetu i/ili efikasnosti za pojedine podtipove GABA_A receptore (Di Lio i sar., 2011; Makaron i sar., 2013; Soto i sar., 2013). U Tabeli 2 prikazani su *in vitro* profili afiniteta novosintetisanih supstanci korišćenih u bihejvioralnoj karakterizaciji u različitim farmakološkim modelima.

Tabela 2. Afiniteti ispitivanih supstanci za benzodiazepinsko mesto vezivanja humanih rekombinantnih $\alpha\beta\gamma_2$ GABA_A receptora, izraženi u nM (za PWZ-029 preuzeto iz Savić i sar., 2008a; drugi podaci preuzeti iz nepublikovanih rezultata saradničkih laboratorija).

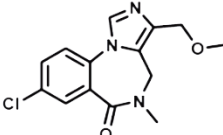
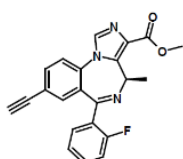
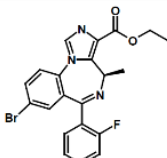
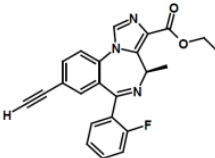
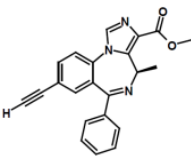
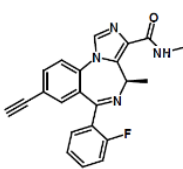
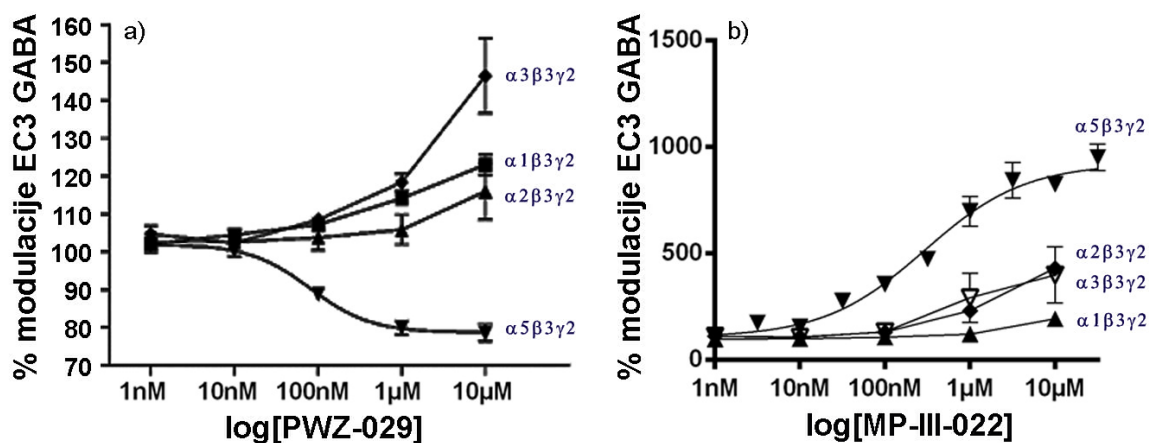
PWZ-029 				
	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	$\alpha 2\beta 3\gamma 2$	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	$\alpha 5\beta 3\gamma 2$
Merck	> 300	> 300	> 300	38,5
Moltech	920	–	–	30
MP-III-004 				
	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	$\alpha 2\beta 3\gamma 2$	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	$\alpha 5\beta 3\gamma 2$
IC50	3200	5400	4300	980
SH-I-047 				
	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	$\alpha 2\beta 3\gamma 2$	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	$\alpha 5\beta 3\gamma 2$
IC50	340	470	730	120
Terry Ki	1710	–	1220	1590
SH-053-2'F-R-CH3 				
	$\alpha 1\beta 3\gamma 2$	$\alpha 2\beta 3\gamma 2$	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	$\alpha 5\beta 3\gamma 2$
IC50	2100	6500	2400	420
Terry Ki	760	950	770	95

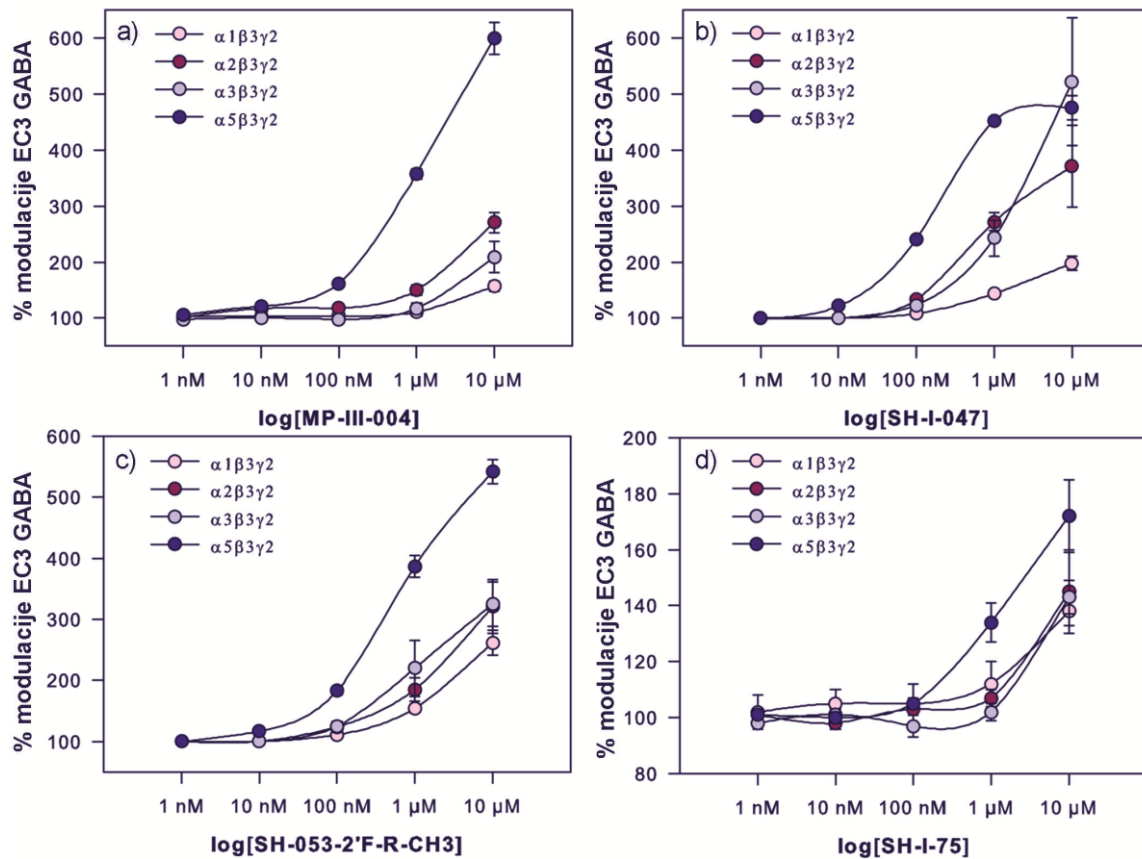
Tabela 2. Afiniteti ispitivanih supstanci za benzodiazepinsko mesto vezivanja humanih rekombinantnih $\alpha\beta\gamma_2$ GABA_A receptora, izraženi u nM (za PWZ-029 preuzeto iz Savić i sar., 2008a; drugi podaci preuzeti iz nepublikovanih rezultata saradničkih laboratorija).

SH-I-75 	$\alpha_1\beta_3\gamma_2$	$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	$\alpha_5\beta_3\gamma_2$
IC50	1800	4100	5600	1200
Terry Ki	1490	990	770	—
MP-III-022 	$\alpha_1\beta_3\gamma_2$	$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	$\alpha_5\beta_3\gamma_2$
IC50	1071	605	1161	89

Na Slikama 10 i 11 date su vrednosti potencijacije pojedinih podtipova receptora pri različitim koncentracijama ispitivanih supstanci. Ovi *in vitro* eksperimenti urađeni su u saradničkoj laboratoriji prof. Werner Sieghart-a i Margot Ernst (Center for Brain Research, Medical University Vienna, Austrija) na GABA_A receptorima pacova dobijenim rekombinantnom tehnologijom i eksprimiranim na žabljim oocitima (*Xenopus laevis*).



Slika 10. Krive efikasnosti za modulatore PWZ-029 (a) i MP-III-022 (b) na $\alpha_1\beta_3\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ i $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ podtipu GABA_A receptora, pri EC3 GABA. Vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu \pm statistička greška na 3–6 oocita iz najmanje 2 serije.



Slika 11. Krive efikasnosti za pozitivne modulatore MP-III-004 (a), SH-I-047 (b), SH-053-2'F-R-CH3 (c) i SH-I-75 (d) na $\alpha 1\beta 3\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ i $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ podtipu GABA_A receptora, pri EC3 GABA. Vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu \pm statistička greška na 3–6 oocita iz najmanje 2 serije.

PWZ-029 ligand, predstavnik imidazobenzodiazepina poput L-655,708 i RO4938581, okarakterisan je *in vitro* kao selektivan po afinitetu i umereno po efikasnosti za $\alpha 5$ GABA_A receptore, i kao pripadnik negativnih modulatora ovih receptora ispitivan je u nizu bihevioralnih testova kojima se procenjuje kognitivna sposobnost životinja (Harris i sar., 2008; Savić i sar., 2008a; Soto i sar., 2013). U testu pasivnog izbegavanja kod pacova pokazao je pozitivan efekat u dozi od 5 mg/kg, ali je takav efekat izostao u testu aktivnog izbegavanja, nije imao efekta na anksioznost i tonus mišića ali je u višim dozama, 10 i 20 mg/kg, izazivao smanjenje lokomotorne aktivnosti (Savić i sar., 2008a). Pored drugih selektivnih negativnih modulatora $\alpha 5$ GABA_A receptora sintetisanih u laboratoriji prof. James M. Cook, RY-23 i RY-24, ispitivan je i kod primata (Soto i sar., 2013). Ligandi poput RY-23 i RY-24, okarakterisani kao puni inverzni agonisti BDZ mesta vezivanja $\alpha 5$ GABA_A receptora, nisu imali efekta u kognitivnim testovima, dok je PWZ-029 kao

parcijalni inverzni agonist pokazao pozitivne efekte u testu radne memorije na rezus majmunima (Soto i sar., 2013).

SH-053-2'F-R-CH3 i SH-053-2'F-S-CH3 su predstavnici agonista BDZ mesta vezivanja za GABA_A receptore sa α_2 , α_3 i α_5 podjedinicom, koji pokazuju određenu selektivnost po afinitetu/efikasnosti za α_5 GABA_A receptore (Fischer i sar., 2010; Savić i sar., 2010). SH-053-2'F-R-CH3, selektivniji od ova dva liganda za α_5 GABA_A receptore, ispitan je u metilazoksimetanol acetatnom (MAM) modelu shizofrenije gde je pokazano da primenjen sistemski ili centralno u oblast ventralnog hipokampusa smanjuje odgovor na amfetaminom izazvanu hiperaktivnost, kao i da smanjuje hiperaktivnost dopaminskog sistema prisutnog u MAM modelu (Gill i sar., 2011). Oba liganda su istraživana i kod primata u kognitivnim testovima gde nisu pokazivali efekte na izvođenje kognitivnih testova (Soto i sar., 2013). Kod neurorazvojnog imunološki indukovano poremećaja, SH-053-2'F-S-CH3 je pokazao pozitivan uticaj na hiperaktivnost dopaminskog sistema, ali nije uspevao da utiče na psihotično ponašanje niti na aspekte kognitivnog i socijalnog deficita (Richetto i sar., 2015). Oba liganda su pri određenim dozama smanjivala lokomotorornu aktivnost pacova, nisu imali efekta u Morisovom vodenom lavirintu, a dok SH-053-2'F-R-CH3 nije menjao ponašanje pacova u testu uzdignutog plus lavirinta, SH-053-2'F-S-CH3 je pokazivao anksiolitički potencijal (Savić i sar., 2010).

Iako je pri negativnoj modulaciji α_5 GABA_A pod određenim eksperimentalnim uslovima, izveštavano dobijanje promnestičkih efekata (Maubach 2003), u kliničkoj praksi nema nootropnih lekova koji su inverzni agonisti BDZ mesta vezivanja α_5 GABA_A receptora. Ovo upućuje na potrebu za daljim istraživanjima o ulozi ove podjedinice u kognitivnim procesima, posebno imajući u vidu da noviji rezultati pokazuju potencijalnu ulogu modulacije α_5 GABA_A receptora u kognitivnim deficitima povezanim sa shizofrenijom (Gill i sar., 2011; Redrobe i sar., 2012) i Daunovim sindromom (Martínez-Cué i sar., 2014). Dodatno, sve je više istraživanja koja imaju za cilj rasvetljavanje uloge modulacije α_5 GABA_A receptora u drugim, ne-kognitivnim domenima disfunkcije u stanjima kao što su Alzheimerova bolest, autizam ili depresija.

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

GABA_A receptori koji sadrže α_5 subjedinicu postali su važna meta za razvoj potencijalnih novih lekova za neuropsihijatrijske bolesti. Razvoj selektivnih lekova, koji bi mogli da budu efikasniji, a svakako sa manje neželjenih efekata, suočava se sa ograničenjima translacijske vrednosti animalnih modela. Dosadašnji rezultati usmereni ka rasvetljavanju uloge α_5 GABA_A receptora u centralnom nervnom sistemu nisu lišeni kontradiktornosti i nedoumica. Uporednim ispitivanjem selektivnih modulatora α_5 GABA_A receptora, kakvi su PWZ-029 kao negativan modulator, i MP-III-004, MP-III-022, SH-053-2'F-R-CH3, SH-I-75 i SH-I-047 kao pozitivni modulatori, moguće je doprineti sagledavanju terapijskih mogućnosti modulacije ovih receptora. Cilj ovih istraživanja bio je da se, primenom u oblasti bihejvioralne farmakologije široko korišćenih testova, kao i povezivanjem bihejvioralnih efekata sa dostupnim *in vitro* profilima, utvrdi:

- 1) koncentracija PWZ-029, MP-III-004, MP-III-022, SH-053-2'F-R-CH3, SH-I-75 i SH-I-047 u plazmi i moždanom tkivu pacova, i tako pokaže u kojoj meri ovi ligandi prolaze krvno–moždanu barijeru;
- 2) slobodna frakcija PWZ-029, MP-III-004, MP-III-022, SH-053-2'F-R-CH3, SH-I-75 i SH-I-047 u plazmi i moždanom tkivu pacova, pomoću koje se može proceniti u kojoj meri ovi ligandi mogu da se vežu za receptor;
- 3) farmakokinetički profil PWZ-029 i MP-III-022, kao izabranih modulatora, u plazmi i moždanom tkivu pacova;
- 4) metabolička stabilnost pozitivnih modulatora α_5 GABA_A receptora različitih hemijskih struktura (MP-III-004, MP-III-022, SH-I-047);
- 5) uticaj negativne modulacije α_5 GABA_A receptora (PWZ-029) na ponašanje pacova;
- 6) efekat negativne modulacije α_5 GABA_A receptora (PWZ-029) na ponašanje pacova izmenjeno delovanjem amfetamina, dizocilpina (MK-801) i skopolamina;

- 7) uticaj pozitivne modulacije α_5 GABA_A receptora (MP-III-004, MP-III-022, SH-053-2'F-R-CH₃, SH-I-75, SH-I-047) na ponašanje pacova i uočavanje razlika u njihovim bihevioralnim profilima;
- 8) efekat pozitivne modulacije α_5 GABA_A receptora (MP-III-004, MP-III-022, SH-053-2'F-R-CH₃, SH-I-75, SH-I-047) na ponašanje pacova izmenjeno delovanjem amfetamina, MK-801 i skopolamina;
- 9) relativni značaj dvosmerne selektivne modulacije benzodiazepinskog mesta vezivanja na α_5 podtipu GABA_A receptora, kao kvantitativno manjoj populaciji GABA_A receptora osetljivih na benzodiazepine, u regulaciji ponašanja intaktnih i farmakološki izmenjenih pacova;
- 10) razlike u mogućnosti negativnog (PWZ-029) i pozitivnih alosternih modulatora α_5 GABA_A receptora (MP-III-004, MP-III-022, SH-053-2'F-R-CH₃, SH-I-75, SH-I-047) da preveniraju/suzbiju promene praćenih bihevioralnih parametara izazvane primenom amfetamina, MK-801 i skopolamina.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Životinje

Sva bihevioralna ispitivanja, kao i određivanje koncentracije izabranih supstanci u plazmi i moždanom tkivu, sprovedena su na zdravim albino pacovima *Wistar* soja, muškog pola, starosti 8–10 nedelja, telesne mase 200–250 g, odgajanim na farmi Vojnomedicinske akademije u Beogradu. U testu socijalne diskriminacije korišćeni su i juvenilni pacovi *Wistar* soja, muškog pola, starosti 27–29 dana. Pacovi su držani u standardnim kavezima od pleksiglasa (42 cm × 26,5 cm × 18 cm), u grupi po četiri do šest životinja u kavezu, juvenilni po osam u kavezu, smeštenim 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 česmenske vode bilo je *ad libitum*. Negovanje životinja i bihevioralna testiranja sprovedeni su tokom svetle faze ciklusa.

3.2 Supstance

Pored komercijalno dostupnih skopolamina, amfetamina, MK-801, haloperidola i diazepama, u ispitivanju je korišćena serija novih supstanci, sintetisanih u saradničkoj laboratoriji prof. *James M. Cook-a*, *Department of Chemistry, University of Wisconsin-Milwaukee*, SAD, koje imaju različite kombinacije afiniteta i efikasnosti na α_5 GABA_A receptorima (Tabela 3).

Pored ovih, kao interni standard za kvantifikaciju odgovarajućih modulatora u moždanom tkivu i plazmi, korišćen je 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, Obradović i sar., 2014). *In vitro* karakterizacija ovih supstanci urađena je u saradničkoj laboratoriji prof. *Werner Sieghart-a*, *Center for Brain Research, Medical University Vienna* (Beč, Austrija). Supstance su rastvarane/suspendovane u odgovarajućem farmakološki

inertnom vehikulumu i primenjivane intraperitonealno u zapremini od 2 mL/kg telesne mase životinje.

Tabela 3. Hemijski naziv i *in vitro* profil ispitivanih supstanci. Ref. = referenca

Supstanca (kodni ili skraćeni naziv)	Hemijski naziv i <i>in vitro</i> profil	Ref.
SCOP	skopolamin (antagonist muskarinskih receptora)	Klinkenberg i Blokland, 2010
MK-801	dizocilpin (selektivni nekompetitivni antagonist na NMDA receptorima)	van der Staay i sar., 2011
AMPH	amfetamin (oslobađa dopamin i noradrenalin)	/
HALO	haloperidol (tipični antipsihotik)	/
DZP	diazepam (standardni neselektivni benzodiazepin)	Savić i sar., 2008b; 2010
DMCM	metil 6,7-dimetoksi-4-etil- β -karbolin-3-karboksilat (inverzni neselektivni agonist)	Savić i sar., 2006; 2008a
PWZ-029	8-hloro-3-(metoksimetil)-5-metil-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-6-on (inverzni agonist visokog afiniteta i efikasnosti za α_5 -GABA _A receptore)	Savić i sar., 2008a
SH-053-2'F-R-CH3	etil estar (R) stereoizomera 8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]azulen-3-karboksilne kiseline (agonist selektivan za α_5 GABA _A receptore)	Savić i sar., 2010
SH-I-75	metil estar (R) stereoizomera 8-etinil-6-fenil-4-metil-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]azulen-3-karboksilne kiseline (agonist visokog afiniteta za α_5 GABA _A receptore)	/
SH-I-047	etil estar (R) stereoizomera 8-bromo-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]azulen-3-karboksilne kiseline (agonist selektivan za α_5 GABA _A receptore)	/
MP-III-004	metil estar (R) stereoizomera 8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]azulen-3-karboksilne kiseline (agonist selektivan za α_5 GABA _A receptore)	/
MP-III-022	metil amid (R) stereoizomera 8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]azulen-3-karboksilne kiseline (agonist visokog afiniteta i efikasnosti za α_5 -GABA _A receptore)	/
vehikulum	85% destilovana voda, 14% propilen glikol, 1% Tween 80	/

3.3 *In vitro* testovi

3.3.1 Određivanje koncentracije izabranih supstanci u 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 plazmi i moždanom tkivu određivali smo koncentraciju negativnog (PWZ-029) i pozitivnih modulatora GABA_A receptora koji sadrže α_5 subjedinicu (MP-III-004, MP-III-022, SH-053-2'F-R-CH₃, SH-I-75, SH-I-047).

U prvom eksperimentu, u cilju procene povezanosti primenjene doze i koncentracija koje se postižu u plazmi i moždanom tkivu, pacovi su primali PWZ-029 u dozi od 2, 5 i 10 mg/kg *i.p.* i nakon 20 minuta žrtvovani, dok je za utvrđivanje farmakokinetičkog profila PWZ-029 davan u dozi od 5 mg/kg i životinje su žrtvovane u različitim vremenskim tačkama (nakon 5, 10, 20, 40 i 60 minuta). U drugom eksperimentu ligandi (MP-III-004, SH-053-2'F-R-CH₃, SH-I-75, SH-I-047) su primenjivani u dozi od 0,5; 2 i 10 mg/kg i nakon 20 minuta od tretmana pacovi su žrtvovani. U trećem eksperimentu, pacovi su dobijali MP-III-022 u dozi od 1; 2,5 i 10 mg/kg i žrtvovani nakon 20 minuta, dok je doza od 2,5 mg/kg korišćena za utvrđivanje farmakokinetičkog profila MP-III-022 (pacovi su žrtvovani u vremenskim tačkama 5, 10, 20, 40, 60 i 180 minuta nakon *i.p.* primene). Za sva određivanja broj životinja po vremenskoj tački je bio 3. Neposredno pre dekapitacije pacovi su anestetizirani ketaminom.

Uzorci krvi su skupljani srčanom punkcijom anestetisane životinje, centrifugirani na 5000×g 15 min, a supernatant (plazma) je nakon tečno–čvrste ekstrakcije (eng. *solid–phase extraction*—SPE) analiziran LC– tandem MS analitičkom metodom. Nakon dekapitacije, mozgovi su vađeni, odmeravani u epruveti i homogenizovani rotor–stator blenderom (*T 25 digital Ultra–Turrax*, IKA, Nemačka) u 2 mL metanola na 16000 rpm tokom 2 min. Zatim je homogenat dopunjavan do 5 ml metanolom, centrifugiran (9000×g, 15 min) i na kraju analiziran LC– tandem MS analitičkom metodom.

Koncentracije odabranih supstanci u plazmi i moždanom tkivu određivane su pomoću Waters Alliance 2695, Mass Lynx, Waters ZQ 2000 kvadrapalnog 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 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 plazma ili razblaženi 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.

3.3.2 Određivanje slobodne frakcije supstanci i metaboličke stabilnosti

Za određivanje slobodne frakcije selektivnih modulatora u plazmi i homogenatu mozga korišćena je aparatura za brzu ekvilibrijumsku analizu sa 48 bunarića (eng. *rapid equilibrium dialysis* (RED), Thermo Scientific). Plazma i homogenat mozga su pripremljeni kao i za određivanje koncentracija u plazmi i homogenatu mozga, s tim što je ovde za homogenizaciju korišćen PBS pufer (eng. *phosphate-buffered saline*) umesto metanola. Mozak pacova je za brzu ekvilibrijumsku dijalizu razblažen sa 4 zapreminska dela (1:5) PBS-a i homogenizovan. U bunariće su postavljeni umeci sa dve komorice (jedna za uzorak – crvena a druga za pufer – bela). U crveni deo dodavalo se 190 μL plazme ili homogenate mozga i 10 μL radnog rastvora ispitujućeg liganda koncentracije 100 μM (PWZ-029, SH-053-2'F-R-CH₃, SH-I-75, SH-I-047, MP-III-004, MP-III-022) pripremljenog u dimetilsulfoksidu (DMSO), kako bi se dobila ukupna koncentracija liganda u crvenom delu umetka od 5 μM . U beli deo umetka dodavan je pufer (PBS). Nakon inkubacije na 37°C na orbitalnom šejkeru u trajanju od 4 sata, 50 μL alikvota pufera, plazme i homogenata mozga

je prenošeno u ependorvice u kojima je prethodno nalivana ista zapremina DMSO-a. Dodavano je 50 μL pufera koji nije podvrgnut dijalizi u alikvote plazme i homogenate mozga (iz crvenog dela) dok je 50 μL sveže plazme i homogenata mozga, koji nisu prošli dijalizu, stavljano u alikvote pufera iz dijalize (beli deo). U tako pripremljene uzorke je nalivano 300 μL hladnog acetonitrila u kome je rastvoren interni standard (SH-I-048A). Posle vorteksiranja i centrifugiranja na hladnom, 100 μL supernatanta je prenošeno u vijale za LC-tandem MS analitičku metodu. Isti protokol je korišćen i za pripremu matriksa za kalibracionu krivu, pri čemu se pre dijalize u plazmu i homogenat mozga nije dodavao radni rastvor liganda, već je nakon dijalize u alikvot stavljan rastvor ispitujućeg modulatora u DMSO poznate koncentracije (u rasponu od 0,5 do 50 μM).

Nevezana frakcija u plazmi je određivana kao odnos izmerenih koncentracija u puferu (iz belog dela) i plazmi (crveni deo). Slobodna frakcija u nerazblaženom mozgu je izračunata po formuli: $f_u = \{1/D * [(1/ f_{u(\text{homogenat})} - 1) + 1/D]\}$ (Kalvass i Maurer, 2002), gde D predstavlja faktor razblaženja a $f_{u(\text{homogenat})}$ slobodnu frakciju određenu kao odnos koncentracija liganda u puferu (beli deo) i homogenatu mozga (crveni deo).

3.4 Bihevioralni testovi

U cilju procene efekata supstanci selektivnih za α_5 podtip GABA_A receptora na ponašanje ogleđnih životinja korišćeni su sledeći testovi: test lokomotorne aktivnosti, test prepoznavanja novog objekta, Morisov vodeni lavirint i procedura socijalne diskriminacije. Sva testiranja su sprovedena tokom svetle faze ciklusa sa početkom u 9 h. Celokupno ponašanje životinje u *in vivo* testovima praćeno je digitalnom kamerom povezanom sa *ANY-maze* softverom (Stoelting Co., Wood Dale, IL, SAD) koji omogućava izračunavanje odabranih parametara. Svi *in vivo* eksperimenti sprovedeni su u namenskim prostorijama vivarijuma Farmaceutskog fakulteta.

3.4.1 Test lokomotorne aktivnosti

Ispitivanje opšte motorne i lokomotorne aktivnosti glodara predstavlja jedan od fundamentalnih pristupa prilikom testiranja psihofarmaka (Geyer, 1990). Termin „spontana lokomotorna aktivnost” ukazuje da se radi o grupi neuslovljenih 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 depresori dominantno na bazi njihovog opšteg uticaja na lokomotornu aktivnost glodara. Procena lokomotorne aktivnosti, koja je izmenjena delovanjem farmakoloških supstanci (npr. hiperlokomocija izazvana amfetaminom ili dizocilpinom koja se povezuje sa pozitivnim simptomima shizofrenije), može biti iskorišćena za otkrivanje novih lekova (npr. antipsihotika).

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). Aktivnost pacova praćena je uz pomoć *ANY-maze* softvera, instaliranog na računaru koji je povezan sa kamerom postavljenom direktno iznad kaveza. Za eksperimente sa dizocilpinom korišćen je protokol praćenja aktivnosti tokom perioda od 30 ili 60 min, bez prethodne habituacije. U eksperimentima sa amfetaminom i skopolaminom korišćen je drugačiji protokol, u kome je nakon tretmana životinja praćena 20 minuta (procena bazalne lokomotorne aktivnosti pod dejstvom ispitivanih supstanci), a zatim su životinje primale amfetamin ili skopolamin i test se nastavljao još 60 minuta. Posle svake životinje kavez je čišćen razblaženim rastvorom etanola i papirnom vatom. Za praćenje uticaja ispitivanih tretmana u ovom testu su korišćeni sledeći parametri: ukupni pređeni put i vreme provedeno u aktivnosti (tokom čitavog praćenja testa i tokom petominutnih intervala).

U testu lokomotorne aktivnosti sprovedeno je ukupno šesnaest eksperimenata:

- **Eksperiment 1:** Procena efekata amfetamina (0,5 mg/kg);
- **Eksperiment 2:** Procena uticaja haloperidola (0,125 i 0,25 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu amfetaminom (0,5 mg/kg);

- **Eksperiment 3:** Procena uticaja PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu amfetaminom (0,5 mg/kg);
- **Eksperiment 4:** Procena efekata SH-053-2'F-R-CH3 (10 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu amfetaminom (0,5 mg/kg);
- **Eksperiment 5:** Procena efekata SH-I-047 (0,5; 2 i 10 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu amfetaminom (0,5 mg/kg);
- **Eksperiment 6:** Procena efekata SH-I-75 (0,1; 0,2; 0,5 i 2 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu amfetaminom (0,5 mg/kg);
- **Eksperiment 7:** Procena efekata MP-III-004 (0,5; 2 i 10 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu amfetaminom (0,5 mg/kg);
- **Eksperiment 8:** Procena efekata MP-III-022 (1; 2,5 i 10 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu amfetaminom (0,5 mg/kg);
- **Eksperiment 9:** Procena uticaja dizocilpina (0,1; 0,2 i 0,5 mg/kg);
- **Eksperiment 10:** Procena efekata diazepama (1 i 5 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu dizocilpinom (0,2 mg/kg);
- **Eksperiment 11:** Procena efekata diazepama (2 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu dizocilpinom (0,2 mg/kg);
- **Eksperiment 12:** Procena efekata PWZ-029 (5 i 20 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu dizocilpinom (0,2 mg/kg);
- **Eksperiment 13:** Procena efekata PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu dizocilpinom (0,2 mg/kg);
- **Eksperiment 14:** Procena efekata SH-I-75 (0,5 i 5 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu dizocilpinom (0,2 mg/kg);
- **Eksperiment 15:** Procena efekata SH-I-75 (0,2 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu dizocilpinom (0,2 mg/kg);

- **Eksperiment 16:** Procena efekata PWZ-029 (2 mg/kg) i SH-I-75 (0,2 mg/kg) na hiperlokomociju izazvanu skopolaminom (0,5 mg/kg).

3.4.2 Test prepoznavanja novog objekta

Iako je Berlyne još 1950. godine pokazao da pacovi provode više vremena u eksploraciji novog objekta nego prethodno istraživanog (familijarnog) objekta (Berlyne, 1950), tek su Ennaceur i Delacour (1988) uveli ovaj test kao metod za istraživanje „prepoznavanja objekta“. Generalno se test prepoznavanja novog objekta sastoji od dve faze. U prvoj fazi, životinji se prezentuju isti objekti koje ona istražuje (čime oni postaju familijarni objekti) u okruženju koje nije isto kao kavez u kome se životinja čuva. Nakon prve faze, životinja se vraća u kavez u kome je čuvana i tu provodi odgovarajuće vreme (retenciono vreme). U drugoj fazi, životinja se vraća u aparaturu u kojoj se susrela sa familijarnim – poznatim objektima i pred nju se stavljaju dva objekta, jedan familijarni i jedan novi objekat. Ovaj test koristi prirodnu sklonost životinje da prilazi i istražuje novi objekat, za šta nije neophodno višekratno treniranje životinje i što se može sprovesti u jednoj sesiji. Ovakav test ne zahteva averzivni stimulus, restrikciju hrane ili vode, i veliki broj laboratorija ga uspešno koristi za miševe i pacove. Test prepoznavanja novog objekta je i test koji je uključen u MATRICS inicijativu kao test za izučavanje „vizuelnog učenja i pamćenja“ (Young i sar. 2009). Najbitnije moždane strukture uključene u izvođenja testa prepoznavanja novog objekta kod glodara jesu hipokampus i parahipokampalni region – postrinalni, peririnalni i rinalni korteks (Dickerson i Eichenbaum, 2010). Tokom vremena su razvijane varijacije ovog testa, što otežava poređenje rezultata dobijenih u različitim laboratorijama.

Aparatura za test prepoznavanja novog objekta se u našoj laboratoriji sastoji od kutije dimenzija 65 cm × 45 cm × 45 cm, iznad koje je montirana kamera za praćenje ponašanja životinja. U sobi je za vreme testiranja uključeno indirektno belo svetlo jačine 20 lx. Odmah po primljenom tretmanu životinje su aklimatizovane na eksperimentalnu sobu, i 20 minuta nakon tretmana sprovedena je familijarizacija, koja je trajala 5 minuta. Za vreme faze familijarizacije predstavljana su dva istovetna objekta, nakon čega su životinje vraćane u

kaveze za odgoj do druge faze – testiranja. Vreme između faza familijarizacije i testiranja je u eksperimentu 1 bilo 24 h, dok je u drugim eksperimentima bilo 1 h. Vreme između faza familijarizacije i testiranja od 24 h upućuje na gubitak diskriminacije kontrolnih životinja između novog i poznatog objekta. Protokol u kome je korišćen kraći period između dve faze (1 h) primenjivan je kod farmakološkog oštećenja diskriminacije novog objekta za vreme faze testiranja. Faza testiranja, u kojoj se životinja susreće sa jednim novim i jednim familijarnim objektom, trajala je 3 minuta. Svi objekti su sličnih dimenzija, ali drugačijeg oblika, boje i materijala i korišćeni su u triplikatu, kako bi se u fazi testiranja prezentovao drugi (istovetni) objekat. Svi objekti i aparatura su se čistili 70%-nim etanolom nakon familijarizacije i testiranja, kako bi se isključila mogućnost uticaja olfaktornog stimulusa na istraživanje objekata. Eksperimenti su snimani i obrađivani Any-maze softverom. Parametri korišćeni za fazu testiranja su vremena eksploracije novog i familijarnog objekta, diskriminacioni indeks ((vreme eksploracije novog – vreme eksploracije familijarnog objekta) / (vreme eksploracije novog + vreme eksploracije familijarnog objekta)), diskriminacioni odnos (vreme eksploracije novog / vreme eksploracije familijarnog objekta), ukupno vreme eksploracije objekata, pređeni put i brzina kretanja. Za fazu familijarizacije praćeni su parametri vremena eksploracije dva ista objekta (A i B), ukupno vreme eksploracije objekata, pređeni put, brzina kretanja.

U testu prepoznavanja novog objekta sprovedeno je ukupno pet eksperimenata:

- **Eksperiment 1:** Procena efekata rastućih doza PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg), DMCM (0,25 mg/kg) i skopolamina (retenciono vreme 24 h);
- **Eksperiment 2:** Procena efekata dizocilpina (0,05; 0,1 i 0,2 mg/kg);
- **Eksperiment 3:** Procena uticaja PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na promene ponašanja izazvane dizocilpinom (0,1 mg/kg);
- **Eksperiment 4:** Procena efekata skopolamina (0,1; 0,3 i 1 mg/kg) i diazepama (2 mg/kg);
- **Eksperiment 5:** Procena uticaja PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na promene ponašanja izazvane skopolaminom (0,3 mg/kg).

3.4.3 Morisov vodeni lavirint

Richard G. Morris je u bihevioralnu neuronauku prvi uveo vodeni lavirint pre više od 30 godina (1981), a danas je Morisov vodeni lavirint jedan od najčešće korišćenih testova za procenu uticaja psihotropnih supstanci na učenje i pamćenje. Kod glodara, vodeni lavirint ispituje prostorno/alocentrično i egocentrično učenje i pamćenje, što bi kod ljudi odgovoralo dvema komponentama memorije – proceduralnoj (implicitnoj) i deklarativnoj (eksplicitnoj) (Izquierdo i sar., 1999, 2006).

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 i entorinalnog korteksa od centralnog značaja za sticanje – akviziciju prostorne memorije (D’Hooge i De Dayn, 2001, Vorhees i Williams, 2014). Istraživanja selektivnih modulatora benzodiazepinskog mesta vezivanja u vodenom lavirintu, kao i korišćenje transgenih životinja u mnogome su doprineli otkrivanju uloge GABA-e i α_5 GABA_A receptora u memorijskim procesima (McNamara i Skelton, 1991, McNamara i sar., 1993, Collinson i sar., 2002, Dawson i sar., 2005, Collinson i sar., 2006).

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 severoistočnog kvadranta bazena, i iste je boje kao unutrašnjost bazena, što je čini nevidljivom za pacove (Terry, 2009). 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). Pacov se postavljao u vodu glavom okrenut prema ivici bazena u jednu od četiri nasumično odabrane pozicije: sever, zapad, severozapad i jugoistok. 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 akvizicije, vršio se probni test u trajanju od 60 s, u bazenu bez platforme i bez prethodnog tretmana (Vorhees i Williams, 2006). Jedino u ovom testu pacov se puštao sa jugozapadne pozicije, najdalje tačke u odnosu na onu gde se platforma nalazila prethodnih dana.

Kod testa ispitivanja uticaja na učenje parametri izabrani za praćenje bili su: latencija nalaska platforme (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). Sva tri parametra mogu se, u manjoj ili većoj meri, povezati sa ponašanjem životinje koje se odlikuje kretanjem ka cilju (Vorhees i Williams, 2014). S druge strane, izabran je i parametar brzina plivanja čijom procenom mogu da se sagledaju nekognitivni efekti tretmana (na primer senzorno-motorne promene). Kod ispitivanja promena ponašanja izazvanih skopolaminom dodatno su obrađeni i parametri tigmotaksičnog ponašanja: % pređenog puta i % vremena provedenog u perifernom prstenu. U toku testa pozivanja, kao praćeni parametri odabrani su latencija i efikasnost puta do prvog ulaska u ciljnu region, kao i vreme i pređeni put u ciljnom regionu. Kroz procenu ovih parametara pratiti smo uticaje tretmana na deklarativnu memoriju. U eksperimentima sa skopolaminom korišćen je i parametar vremena provedenog u perifernom prstenu (fenomen tigmotaksije – smanjenje je povezano sa proceduralnom komponentom memorije), kao i vreme provedeno u SI kvadrantu.

U vodenom lavirintu sprovedeno je ukupno šest eksperimenata:

- **Eksperiment 1:** Procena efekata SH-I-75 (0,2; 2 i 5 mg/kg);
- **Eksperiment 2:** Procena efekata dizocilpina (0,07; 0,1 i 0,15 mg/kg);

- **Eksperiment 3:** Procena uticaja PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na promene ponašanja izazvane dizocilpinom (0,1 mg/kg);
- **Eksperiment 4:** Procena uticaja SH-I-75 (0,5; 2 i 5 mg/kg) na promene ponašanja izazvane dizocilpinom (0,1 mg/kg);
- **Eksperiment 5:** Procena efekata skopolamina (0,03; 0,1; 0,3 i 1 mg/kg);
- **Eksperiment 6:** Procena uticaja PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na promene ponašanja izazvane skopolaminom (1 mg/kg).

3.4.4 Procedura socijalne diskriminacije

Procedura socijalne diskriminacije upoređuje vremena istraživanja juvenilnih pacova od strane odrasle jedinke i zasniva se na „olfaktornom potpisu“ juvenilne životinje (za razliku od testa prepoznavanja novog objekta gde je olfaktorni stimulus irelevantan). U brojnim radovima ova procedura je korišćena za ispitivanje uticaja psihofarmaka na socijalnu komponentu pamćenja (Terranova i sar., 2005, Watson i sar., 2012, Clifton i sar., 2013). Bitna prednost ovakvog testa, pored činjenice da su životinje u direktnom kontaktu, jeste i mogućnost jasnog razlikovanja nememorijske komponente istraživanja (ukupno istraživanje životinja) od ponašanja usko specifičnog za memoriju (diskriminacija). Bitne strukture za socijalno prepoznavanje su olfaktorna neuralna kola, amigdala, hipokampus i septum (Ferguson i sar., 2002; Insel i Fernald, 2004; Squires i sar, 2006).

Test se sastoji od dva perioda: period 1 (T1) – kada se pacov upoznaje sa juvenilnim, i period 2 (T2) – koji pored prethodno upoznatog, uključuje novog juvenilnog pacova. Postoje različiti protokoli u zavisnosti od cilja ispitivanja (farmakološko oštećenje podrazumeva da se T2 odmah nadovezuje na T1, pri čemu T1 traje 30, a T2 5 minuta; protokolarno oštećenje kod koga postoji smanjenje prepoznavanja kod kontrolnih životinja: T1 i T2 traju 5 minuta, a vreme između T1 i T2 je 30 minuta). U našim eksperimentima koristili smo protokol sa farmakološkim oštećenjem (0,1 mg/kg MK-801). Eksperiment se izvodio u kavezu u kome je adultna životinja čuvana; manuelno je praćeno vreme koje je životinja provela u istraživanju pri čemu je kao istraživanje podrazumevano anogenitalno

njuškanje, lizanje, blisko praćenje i kontakt šapicama (Engelmann i sar., 1995). Adultni pacovi su 48 h pre testiranja izdvajani u posebne kaveze, a na dan testiranja su primali tretman *i.p.* 20 minuta pre T1. Izabrani parametri su bili: ukupno vreme istraživanja u prvih 5 minuta T1 i tokom T2; diskriminacioni indeks ((vreme istraživanja novog – vreme istraživanja poznatog pacova) / ukupno vreme istraživanja u T2), i diskriminacioni odnos (vreme istraživanja novog / vreme istraživanja poznatog pacova u T2).

U proceduri socijalnog prepoznavanje urađena su dva eksperimenata:

- **Eksperiment 1:** Procena efekata 0,1 mg/kg dizocilpina;
- **Eksperiment 2:** Procena efekata PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na promene ponašanja izazvane dizocilpinom (0,1 mg/kg).

3.5 Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka bihevioralnih testova je urađena uz pomoć Sigma Plot 11.0 i 12.0 softvera. Za izračunavanje farmakokinetičkih podataka korišćena je funkcija u Microsoft Excel softveru (eng. *PK Functions for Microsoft Excel software*) napisana od strane Joel Usansky, Atul Desai i Diane Tang-Liuwere. Pre obrade analizom varijanse, podaci su testirani na homogenost i normalnu raspodelu. Podaci iz testa lokomotorne aktivnosti obrađeni su jednofaktorskom ANOVA-om (faktor Tretman) i dvofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanjem za petominutne intervale (faktori: Tretman i Vreme). Za NORT je korišćen t-test sa uparenim vrednostima za vremena istraživanja, one-sample t-test za diskriminacioni indeks (u odnosu na hipotetičku vrednost 0) i jednofaktorske ANOVA-e za ostale parametre (faktor Tretman). Vrednosti parametara iz vodenog lavirinta su blokovane po životinji (srednja vrednost četiri plivanja u toku dana) i analizirane dvofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanjem (faktori: Tretman i Dani) za fazu akvizicije. Jednofaktorskom ANOVA-om su obrađeni podaci iz testa pozivanja (faktor Tretman). U proceduri socijalne diskriminacije korišćen je neparametarski Kruskal–Wallisov test za diskriminacijske parametre. Kod analize dvofaktorskim ANOVA-ma ukoliko je interakcija između faktora bila značajna, rađene su jednofaktorske ANOVA-e za svaki dan tj.

vremenski interval. Za *post hoc* analizu korišćen je *Student-Newman-Keuls* (SNK) test. U svim testovima, razlike na nivou $p < 0,05$ uzimane su kao statistički značajne, a vrednosti $0,1 > p > 0,05$ smatrane su statističkim trendom. Na graficima su podaci prikazani kao aritmetička sredina + ili \pm standardna greška (SEM) a u tabelama su vrednosti bihevioralnih podataka dati kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija (SD). Određene koncentracije liganada u plazmi i homogenatu mozga su prikazane tabelarno kao aritmetička sredina \pm SEM.

4 REZULTATI

4.1 Određivanje koncentracije izabranih supstanci u plazmi i mozgu pacova

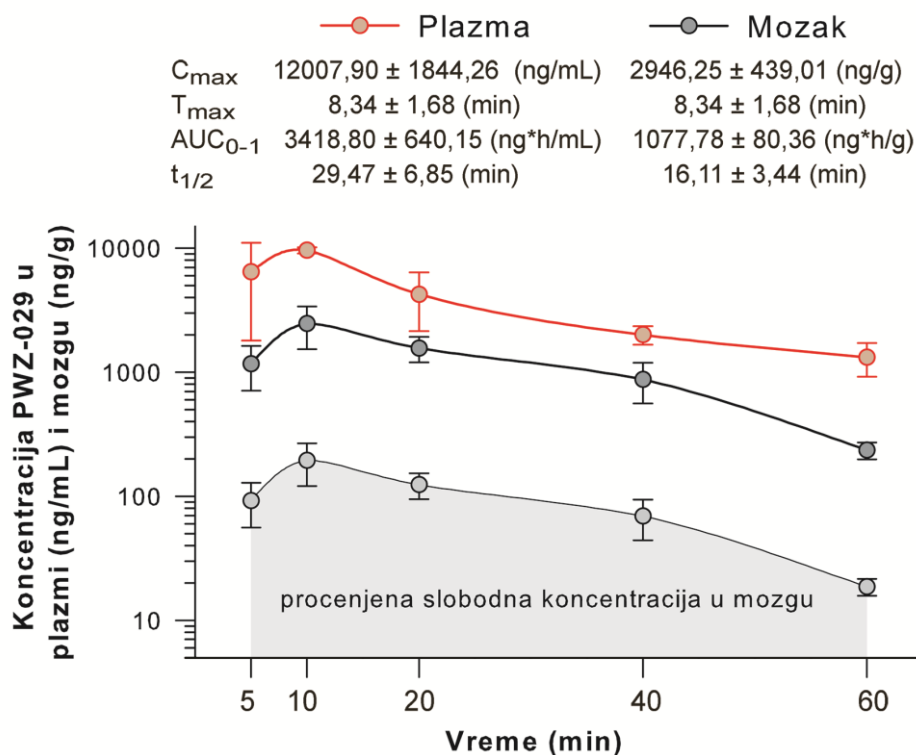
4.1.1 Eksperiment 1

Dvadeset minuta nakon *i.p.* injekcije PWZ-029 (u dozi od 2, 5 i 10 mg/kg) molarne koncentracije u plazmi i homogenatu mozga bile su u očekivanim granicama i u direktnoj vezi sa primenjenim dozama supstance (Tabela 4). Karakteristika PWZ-029 je u tome što, za razliku od pozitivnih modulatora GABA_A receptora koji sadrže α_5 subjedinicu (videti posle), dostiže ukupno veće koncentracije u plazmi i mozgu i što nema osobinu „nakupljanja“ u moždanom tkivu (koncentracije u mozgu su znatno niže).

Tabela 4. Ukupne molarne i procenjene slobodne koncentracije PWZ-029 (primenjen u dozi od 2, 5 i 10 mg/kg) u plazmi i moždanom tkivu pacova žrtvovanih 20 minuta nakon tretmana. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost \pm SEM za 3 uzorka.

Doza (mg/kg)		2	5	10
PWZ-029				
Plazma (nmol/L)	<i>Ukupno</i>	4647,93 \pm 880,16	11943,70 \pm 2878,27	20087,07 \pm 3997,23
	<i>Slobodno</i>	1113,18 \pm 210,80	2860,51 \pm 689,35	4810,85 \pm 957,34
Mozak (nmol/kg)	<i>Ukupno</i>	2323,12 \pm 129,98	4074,59 \pm 923,30	7002,81 \pm 1505,01
	<i>Slobodno</i>	183,76 \pm 10,28	322,30 \pm 73,03	553,92 \pm 119,05

Farmakokinetički parametri izračunati nakon primene doze od 5 mg/kg PWZ-029 dati su na Slici 12. Prikazane su masene koncentracije u datim vremenskim tačkama. Obradeni farmakokinetički parametri govore o brzom dostizanju maksimalne koncentracije u plazmi i moždanom tkivu (T_{max} je 8,34 minuta). Poluvreme eliminacije je 29,47 minuta za plazmu i 16,11 minuta za moždano tkivo. Prikazane su i procenjene slobodne koncentracije liganda u plazmi i moždanom tkivu, izračunate množenjem izmerenih ukupnih koncentracija i odgovarajućih slobodnih frakcija dobijenih brzom ekvilibrijumskom dijalizom, koje su za plazmu iznosile 23,95%, a za moždano tkivo 7,91%.



Sika 12. Farmakokinetički parametri, ukupne masene koncentracije u plazmi i moždanom tkivu i procenjena slobodna koncentracija u moždanom tkivu PWZ-029 (primenjen u dozi od 5 mg/kg) nakon 5, 10, 20, 40 i 60 minuta. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost ± SEM za 3 uzorka.

4.1.2 Eksperiment 2

Ukupne molarne koncentracije SH-053-2'F-R-CH₃, SH-I-047, SH-I-75 i MP-III-004 u plazmi i moždanom tkivu, kao i njihove procenjene slobodne koncentracije 20 minuta nakon jednokratne primene doza 0,5; 2 i 10 mg/kg, date su redom u Tabeli 5.

Vrednosti *in vitro* utvrđene slobodne frakcije datih liganada u plazmi i moždanom tkivu prikazane su u Tabeli 6. Procenat slobodne frakcije u mozgu je za SH-I-75 i MP-III-004 duplo veći nego za ostala dva liganda.

Dodatno su odrađeni *in vitro* testovi metaboličke stabilnosti tokom inkubacije u plazmi pacova za predstavnike metil i etil estara pozitivnih modulatora GABA_A receptora koji sadrže α_5 subjedinicu. Rezultati su prikazani u Tabeli 7 i pokazuju znatno veću stabilnost metil estara (predstavnik MP-III-004) u odnosu na etil estre (predstavnik SH-I-047).

Tabela 5. Ukupne molarne i procenjene slobodne koncentracije SH-053-2'F-R-CH₃, SH-I-047, SH-I-75 i MP-III-004 (primenjenih u dozi od 0,5; 2 i 10 mg/kg) u plazmi i moždanom tkivu pacova 20 minuta nakon tretmana. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost ± SEM za 3 uzorka.

Doza (mg/kg)		0,5	2	10
SH-053-2'F-R-CH₃				
Plazma (nmol/L)	<i>Ukupno</i>	38,83 ± 17,55	31,23 ± 14,89	337,57 ± 145,03
	<i>Slobodno</i>	26,62 ± 12,03	21,41 ± 10,21	231,41 ± 99,41
Mozak (nmol/kg)	<i>Ukupno</i>	43,88 ± 18,47	66,59 ± 34,13	552,72 ± 241,70
	<i>Slobodno</i>	1,70 ± 0,71	2,58 ± 1,32	21,39 ± 9,35
SH-I-047				
Plazma (nmol/L)	<i>Ukupno</i>	51,27 ± 16,24	41,94 ± 15,79	54,79 ± 15,60
	<i>Slobodno</i>	33,78 ± 10,70	27,64 ± 10,40	36,10 ± 10,28
Mozak (nmol/kg)	<i>Ukupno</i>	72,97 ± 14,97	202,13 ± 54,77	282,34 ± 92,19
	<i>Slobodno</i>	2,47 ± 0,51	6,85 ± 1,86	9,57 ± 3,12
SH-I-75				
Plazma (nmol/L)	<i>Ukupno</i>	51,66 ± 4,61	185,43 ± 41,46	1434,80 ± 673,24
	<i>Slobodno</i>	21,97 ± 1,96	78,84 ± 17,63	610,08 ± 286,26
Mozak (nmol/kg)	<i>Ukupno</i>	107,27 ± 12,89	319,80 ± 26,00	1716,32 ± 785,81
	<i>Slobodno</i>	6,57 ± 0,79	19,60 ± 1,59	105,21 ± 48,17
MP-III-004				
Plazma (nmol/L)	<i>Ukupno</i>	64,47 ± 23,02	415,89 ± 58,91	1182,49 ± 546,09
	<i>Slobodno</i>	22,78 ± 8,13	146,93 ± 20,81	417,77 ± 192,93
Mozak (nmol/kg)	<i>Ukupno</i>	125,88 ± 30,01	329,59 ± 26,55	1696,44 ± 269,70
	<i>Slobodno</i>	7,89 ± 1,88	20,66 ± 1,66	106,37 ± 16,91

Tabela 6. Procenjene *in vitro* slobodne frakcije (%). Svaki podatak predstavlja srednju vrednost za 3 uzorka.

		SH-053-2'F-R-CH ₃	SH-I-047	SH-I-75	MP-III-004
Slobodna frakcija (%)	<i>Plazma</i>	68,55	65,89	42,52	35,33
	<i>Mozak</i>	3,87	3,39	6,13	6,27

Tabela 7. Procenjena *in vitro* metabolička stabilnost (ukupna koncentracija SH-I-047 i MP-III-004 u plazmi pacova nakon 30, 60, 120 i 240 minuta). Svaki podatak predstavlja srednju vrednost ± SEM za 3 uzorka.

SH-I-047			MP-III-004		
	μM	%		μM	%
0 min	0,5556	100	0 min	0,5556	100
30 min	0,3149 ± 0,0180	56,68	30 min	0,5487 ± 0,0491	98,76
60 min	0,0693 ± 0,0031	12,47	60 min	0,4183 ± 0,0221	75,30
120 min	0,0034 ± 0,0001	0,61	120 min	0,2373 ± 0,0067	42,72
240 min	0,0019 ± 0,0001	0,33	240 min	0,1186 ± 0,0064	21,35

4.1.3 Eksperiment 3

U Tabeli 8 su prikazane ukupne molarne i procenjene slobodne koncentracije za MP-III-022 u plazmi i mozgu pacova žrtvovanih 20 minuta nakon primene jedne od doza (1; 2,5 i 10 mg/kg). Izmerene koncentracije su u skladu sa primenjenim dozama i očekivanim vrednostima.

Tabela 8. Ukupne molarne i procenjene slobodne koncentracije MP-III-022 (primenjen u dozi od 1; 2,5 i 10 mg/kg) u plazmi i moždanom tkivu pacova 20 minuta nakon tretmana. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost ± SEM za 3 uzorka.

Doza (mg/kg)		1	2,5	10
MP-III-022				
Plazma (nmol/L)	<i>Ukupno</i>	62,43 ± 4,97	120,01 ± 31,74	563,71 ± 54,04
	<i>Slobodno</i>	8,47 ± 0,67	16,29 ± 4,31	76,52 ± 7,34
Mozak (nmol/kg)	<i>Ukupno</i>	96,47 ± 12,04	156,46 ± 50,33	825,28 ± 99,33
	<i>Slobodno</i>	6,38 ± 0,80	10,34 ± 3,33	54,56 ± 6,57

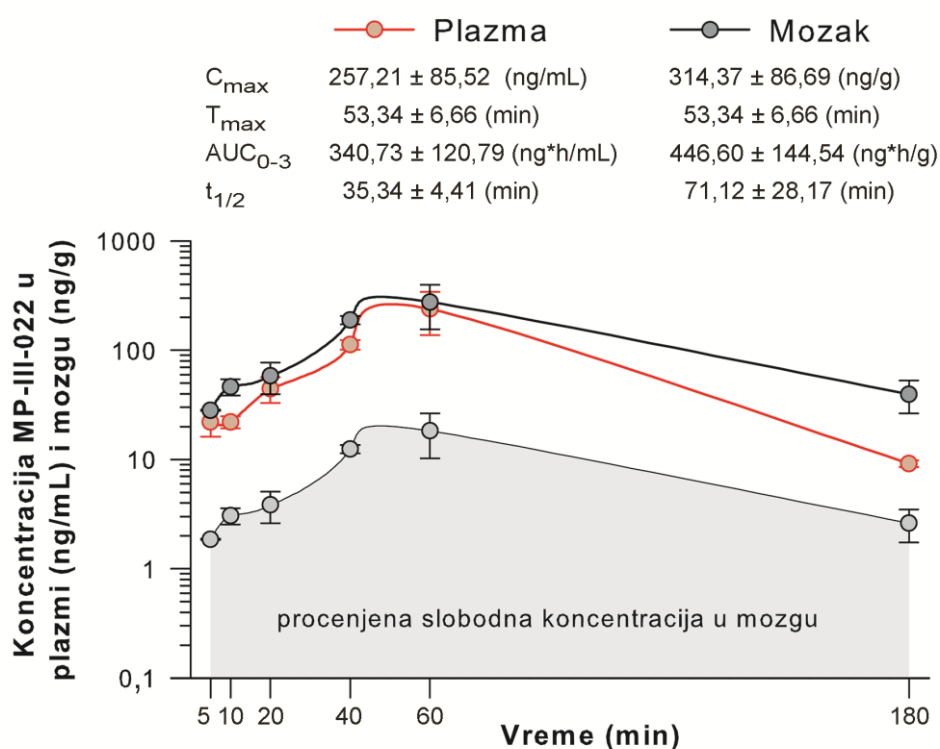
Farmakokinetički parametri i ukupne masene koncentracije u plazmi i moždanom tkivu za MP-III-022 izračunati nakon *i.p.* primene doze od 2,5 mg/kg dati su na Slici 13. Prikazana je i procenjena slobodna frakcija za moždano tkivo. Vremena postizanja maksimalnih koncentracija u plazmi i mozgu su приметно veća nego kod PWZ-029 (T_{max} je 53,34 minuta), kao i vremena polueliminacije ($t_{1/2}$ za plazmu i mozak je 71,12 min, odnosno 35,34 min). Pri primeni MP-III-022 postižu se veće koncentracije u mozgu nego u plazmi, što dodatno ističe razlike u farmakokinetičkim profilima ova dva liganda.

Slobodna frakcija MP-III-022 dobijena brzom ekvilibrijumskom dijalizom u plazmi iznosi 13,57%, a u mozgu 6,61%. Metabolička stabilnost u plazmi procenjena *in vitro* pokazuje da

nema razgradnje molekula u toku 4 h praćenja, što je i bilo očekivano s obzirom na hemijsku strukturu jedinjenja (Tabela 9).

Tabela 9. Procenjena *in vitro* metabolička stabilnost (ukupna koncentracija MP-III-022 u plazmi pacova 30, 60, 120 i 240 minuta nakon tretmana). Svaki podatak predstavlja srednju vrednost ± SEM za 3 uzorka.

MP-III-022	μM	%
0 min	0,5556	100
30 min	0,5402 ± 0,0146	97,23
60 min	0,5403 ± 0,0193	97,25
120 min	0,5472 ± 0,0007	98,50
240 min	0,5374 ± 0,0063	96,74

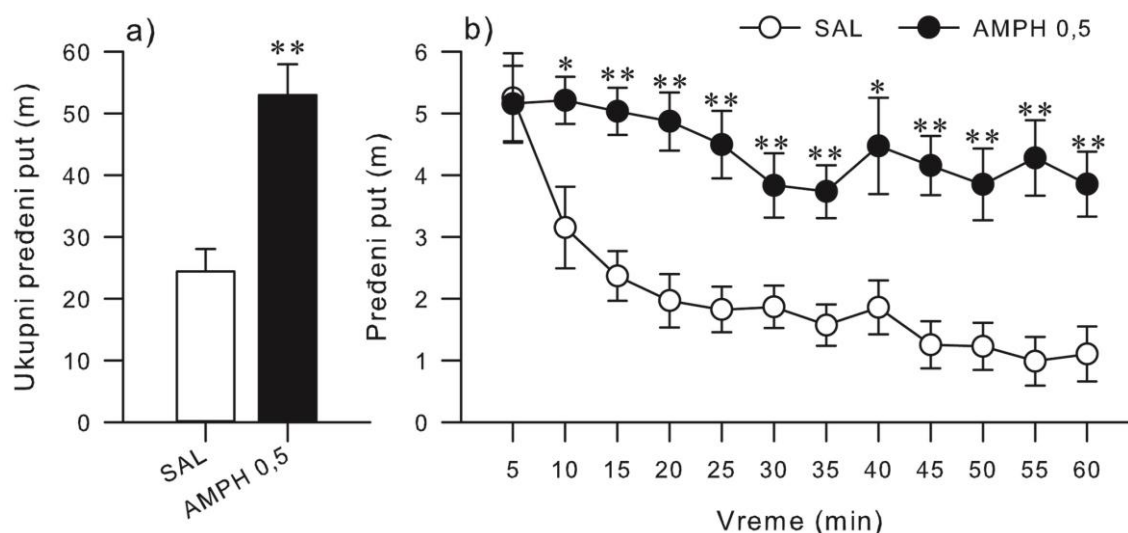


Slika 13. Farmakokinetički parametri, ukupne masene koncentracije u plazmi i moždanom tkivu i procenjena slobodna koncentracija u moždanom tkivu MP-III-022 (primenjen u dozi od 2,5 mg/kg) nakon 5, 10, 20, 40, 60 i 180 minuta. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost ± SEM za 3 uzorka.

4.2 Test lokomotorne aktivnosti

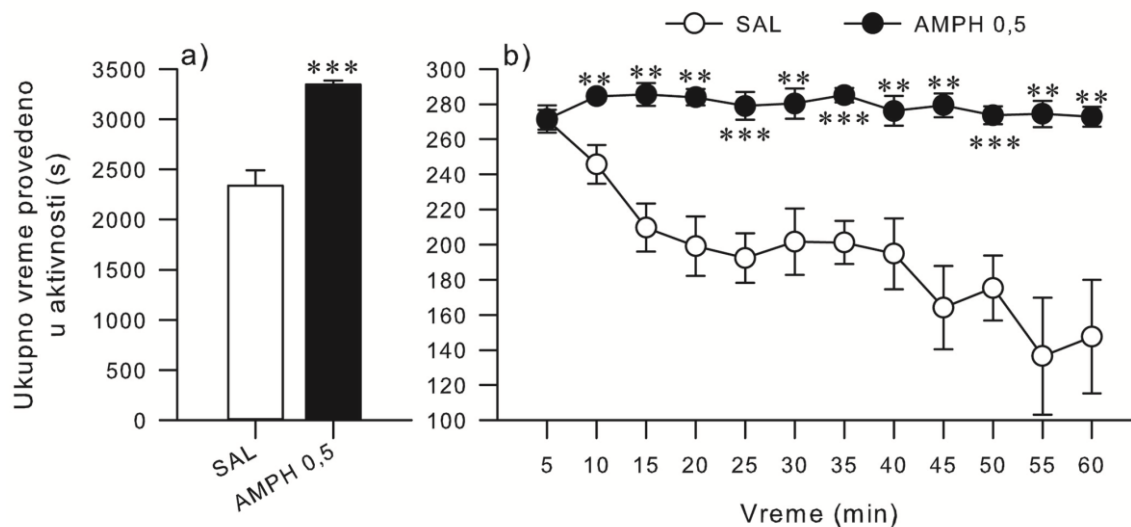
4.2.1 Eksperiment 1

Uticao amfetamina na spontanu lokomotornu aktivnost pacova procenili smo koristeći parametre ukupnog pređenog puta i vremena provedenog u mobilnosti tokom svih 60 minuta praćenja, kao i tokom petominutnih intervala. U prvih 20 minuta praćenja, pre primene amfetamina, utvrđeno je da ne postoje značajne razlike među grupama. Primenjeni t-test je pokazao značajno povećanje ukupnog pređenog puta u toku 60 minuta ($t(10)=4,61$; $p=0,001$; Slika 14a), i ukupnog vremena provedenog u mobilnosti ($t(10)=6,36$; $p<0,001$; Slika 15a). Hiperlokomotorni uticaj amfetamina je potvrđen kada je statistička analiza primenjena na petominutne intervale (dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem za pređeni put: Tretman - $F(1,10)=21,29$; $p=0,001$; Vreme - $F(11,110)=10,28$; $p<0,001$; Interakcija - $F(11,110)=2,93$; $p=0,002$; Slika 14b).



Slika 14. Uticaj 0,5 mg/kg amfetamina na a) ukupni pređeni put i b) pređeni put u petominutnim intervalima u toku 60 minuta. * $p<0,05$ i ** $p<0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SAL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 6.

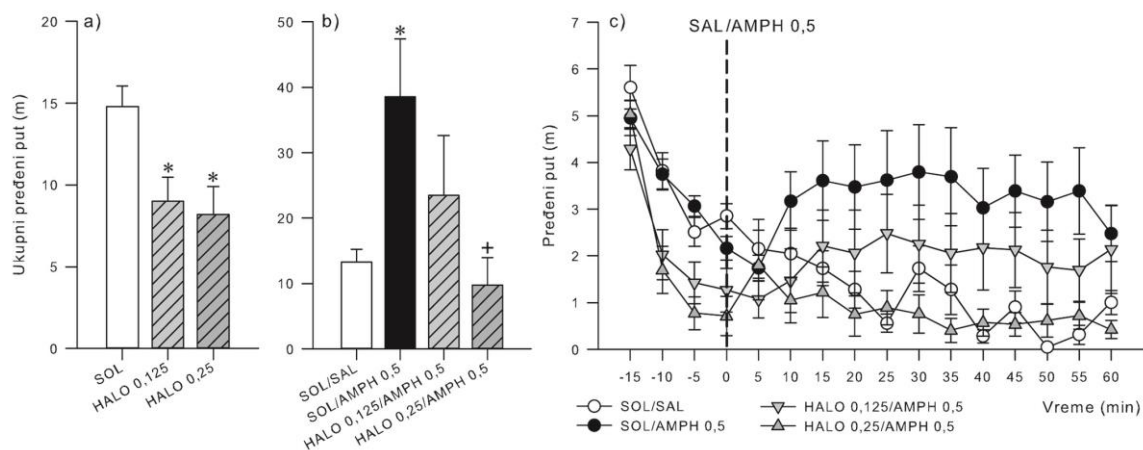
Vrednosti dvofaktorske ANOVA-e sa ponavljanjem u slučaju vremena mobilnosti tokom petominutnih intervala su za Tretman - $F(1,10)=40,41$; $p<0,001$; Vreme - $F(11,110)=5,28$; $p<0,001$ i Interakciju - $F(11,110)=4,63$; $p<0,001$; Slika 15b.



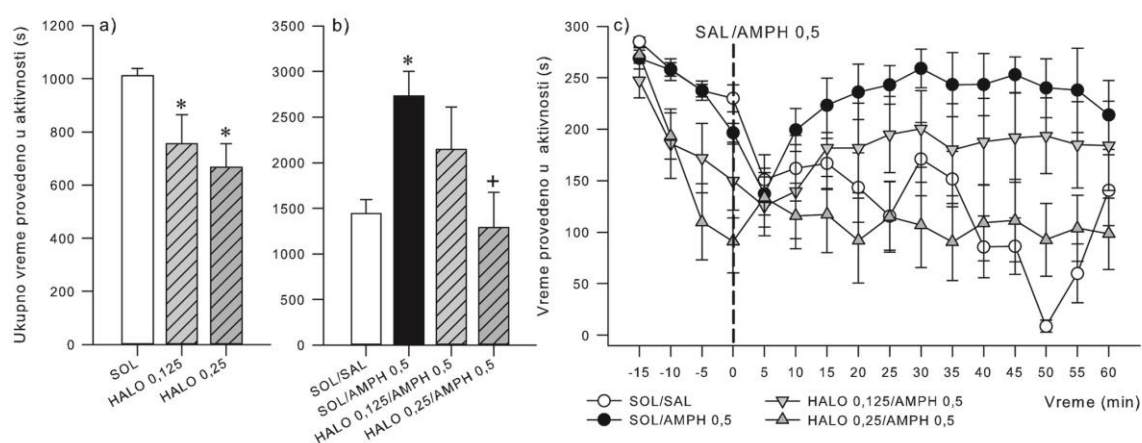
Slika 15. Uticaj 0,5 mg/kg amfetamina (AMPH 0,5) na a) ukupno vreme provedeno u mobilnosti i b) vreme provedeno u mobilnosti u petominutnim intervalima u toku 60 minuta. ** $p < 0,01$ i * $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SAL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 6.**

4.2.2 Eksperiment 2

U eksperimentu sa haloperidolom (primenjen *i.p.* u dozi od 0,125 i 0,25 mg/kg) jednofaktorska ANOVA je pokazala statistički značajan efekat tretmana na ukupni pređeni put tokom 20 min praćenja ($F(2,18)=5,85$; $p=0,011$). *Post hoc* SNK test je pokazao statistički značajno smanjenje pređenog puta posle primene obe doze haloperidola u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 16a). Isto se primećuje i posmatrenjem parametra ukupno vreme provedeno u aktivnosti (jednofaktorska ANOVA; $F(2,18)=4,67$; $p=0,023$; *post hoc* SNK test dat na Slici 17a). Kada se ista statistika primeni na ukupni pređeni put u toku 60 minuta nakon davanja amfetamina dobijaju se značajne vrednosti jednofaktorskih ANOVA (za pređeni put $F(3,24)=3,63$; $p=0,027$; za vreme provedeno u aktivnosti $F(3,24)=3,82$; $p=0,023$). Vrednosti *post hoc* SNK testova pokazuju da dok obe doze haloperidola deluju sedativno kada se same primene (prvih 20 minuta), jedino veća doza haloperidola (0,25 mg/kg) uspeva da prevenira hiperlokomotornu aktivnost izazvanu amfetaminom, kao i da smanji vreme provedeno u aktivnosti u odnosu na amfetamin (Slici 16b i 17b).



Slika 16. Uticaj haloperidola (0,125 i 0,25 mg/kg) na a) ukupni pređeni put pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 20 minuta, b) pređeni put tokom 60 minuta nakon primene amfetamina i c) pređeni put u petominutnim intervalima. * $p < 0,05$ odnosu na SOL/SAL grupu i † $p < 0,05$ u odnosu na SOL/AMPH 0,5 grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 7.



Slika 17. Uticaj haloperidola (0,125 i 0,25 mg/kg) na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti pacova tokom 20 min, b) vreme provedeno u aktivnosti 60 minuta nakon primene amfetamina i c) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima. * $p < 0,05$ odnosu na SOL/SAL grupu i † $p < 0,05$ odnosu na SOL/AMPH 0,5 grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 7.

Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem primenjena na pređeni put i vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima potkrepljuje značajnosti dobijene primenom jednofaktorske ANOVA-e na vrednosti datih parametara tokom celokupnog perioda od 60 min nakon davanja amfetamina (Tabela 10).

Tabela 10. Rezultati statističke analize uticaja haloperidola i amfetamina na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 12 petominutnih intervala u testu lokomotorne aktivnosti.

	<i>Faktori</i>	Vreme provedeno u aktivnosti (s)	
		Pređeni put (m)	Pređeni put (m)
		Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem	
<i>Tretman</i>	Tretman, F(3,24); p	3,63; 0,027	3,82; 0,023
	Vreme, F(11,264); p	2,46; 0,006	2,34; 0,009
	Interakcija, F(33,264); p	2,85; <0,001	3,26; <0,001
		SNK post hoc (p)	
	HALO 0,125/AMPH vs. SOL/AMPH	nz	nz
	HALO 0,25/AMPH vs. SOL/AMPH	0,029	0,030
	SOL/AMPH vs. SOL/SAL	0,038	0,035
		Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(3,24); p)	
	<i>Vreme</i>		
	5 min	0,70; 0,563	0,17; 0,913
	10 min	2,45; 0,088	1,12; 0,361
	15 min	2,42; 0,091	1,80; 0,174
	20 min	2,78; 0,063	2,71; 0,067
	25 min	4,07; 0,018	3,96; 0,020
	30 min	3,03; 0,049	3,37; 0,035
	35 min	3,60; 0,028	3,15; 0,043
	40 min	4,18; 0,016	4,26; 0,015
	45 min	4,71; 0,010	5,15; 0,007
	50 min	5,14; 0,007	12,41; <0,001
	55 min	5,30; 0,006	4,85; <0,001
	60 min	2,72; 0,067	1,89; 0,159
AMPH=0,5 mg/kg amfetamina; HALO 0,125=0,125 mg/kg haloperidola; HALO 0,25=0,25 mg/kg haloperidola; nz=nije statistički značajno			

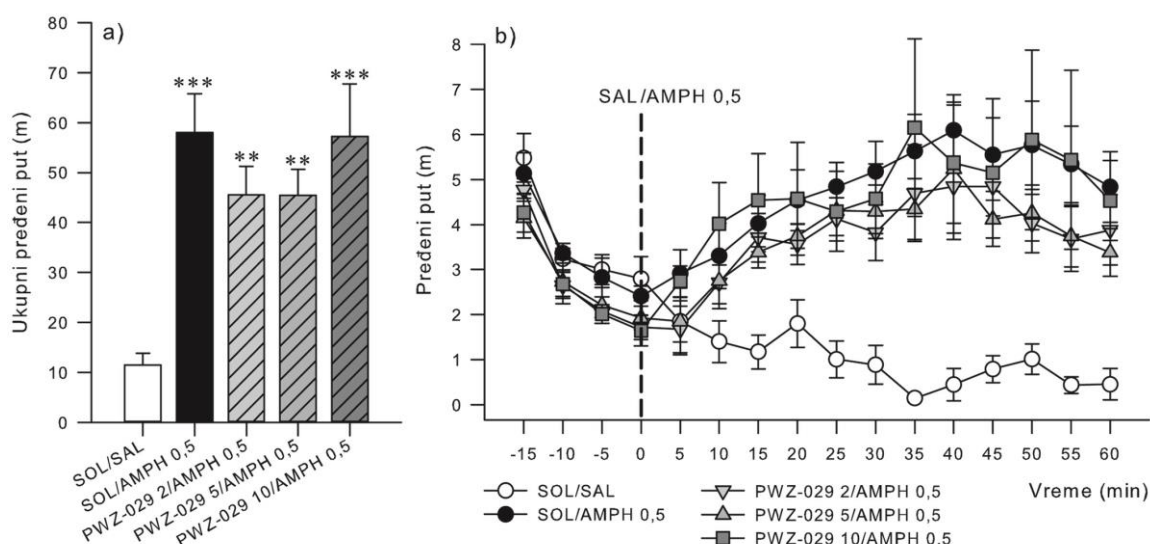
4.2.3 Eksperiment 3

Srednje vrednosti praćenih parametara za različite doze PWZ-029 (2, 5 i 10 mg/kg) u toku prvih 20 minuta testa date su u Tabeli 11. Jednofaktorska ANOVA nije bila statistički značajna za ukupni pređeni put i vreme provedeno u aktivnosti (Tabela 11), što pokazuje da PWZ-029, u datim dozama, nije uticao na bazalnu aktivnost u testu lokomotorne aktivnosti.

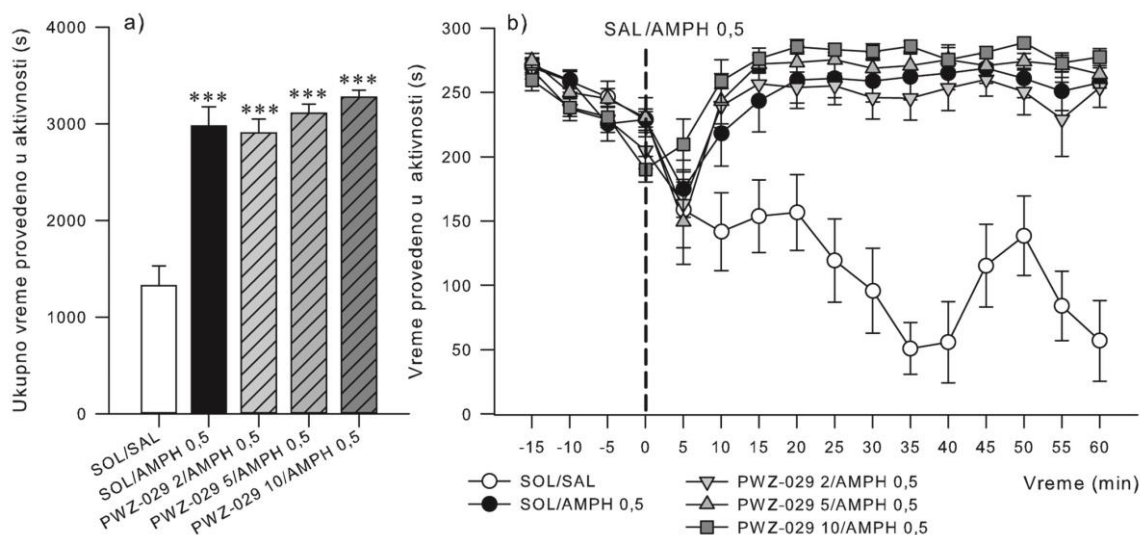
Tabela 11. Uticaj PWZ-029 na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 20 minuta u testu lokomotorne aktivnosti i vrednosti statističke analize za date parametre. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost \pm SD (N = 8, 10, 7, 7).

Tretman	Pređeni put (m)	Vreme provedeno u aktivnosti (s)
SOL	14,52 \pm 3,73	1003,04 \pm 65,73
PWZ-029 2	11,22 \pm 2,36	938,62 \pm 97,81
PWZ-029 5	11,01 \pm 3,46	1000,13 \pm 80,30
PWZ-029 10	10,61 \pm 2,65	918,70 \pm 61,86
Jednofaktorska ANOVA	F(3,28)=2,73 p=0,063	F(3,28)=2,21 p=0,109

Vrednosti jednofaktorske ANOVA-e za ukupni pređeni put i vreme provedeno u aktivnosti za 60 minuta praćenja testa su: F(4,35)=8,01; p<0,001, odnosno, F(4,35)=24,53; p<0,001; rezultati *post hoc* SNK testa dati su na Slici 18a i 19a.



Slika 18. Uticaj PWZ-029 (2, 5 i 10 mg/kg) na a) ukupni pređeni put pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 60 min i b) pređeni put u petominutnim intervalima pri *i.p.* primeni amfetamina (0,5 mg/kg). **p<0,01 i *p<0,001 u odnosu na SOL/SAL grupu. Broj životinja u grupama: 8, 8, 10, 7, 7.**



Slika 19. Uticaj PWZ-029 (2, 5 i 10 mg/kg) na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 60 min i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima pri *i.p.* primeni amfetamina (0,5 mg/kg). ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na SOL/SAL grupu. Broj životinja u grupama: 8, 8, 10, 7, 7.

Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem primenjena na petominutne intervale nakon primene amfetamina za pređeni put i vreme provedeno u aktivnosti (Tabela 12, Slika 18b, 19b) otkrila je značajan efekat tretmana. *Post hoc* SNK test je pokazao da ima značajnih razlika između kontrolne i svih ostalih grupa (Tabela 12). Jednofaktorske ANOVA-e po petominutnim intervalima sprovedene su kada je postojala statistički značajna interakcija između faktora (za parametar vreme provedeno u aktivnosti) i rezultati ovih analiza dati su u Tabeli 12.

Tabela 12. Rezultati statističke analize uticaja PWZ-029 i amfetamina na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 12 petominutnih intervala u testu lokomotorne aktivnosti.

<i>Faktori</i>	Vreme provedeno u aktivnosti (s)	
	Pređeni put (m)	Vreme provedeno u aktivnosti (s)
Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem		
Tretman, F(4,35); p	8,01; <0,001	24,53; <0,001
Vreme, F(11,385); p	5,06; <0,001	8,50; <0,001
Interakcija, F(44,385); p	1,17; 0,216	3,13; <0,001
<i>Tretman</i>	SNK post hoc (p)	
PWZ-029 2/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	0,002	<0,001
PWZ-029 5/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	0,001	<0,001
PWZ-029 10/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	<0,001	<0,001
SOL/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	<0,001	<0,001
<i>Vreme</i>	Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(4,35); p)	
5 min	–	0,82; 0,516
10 min	–	4,38; 0,006
15 min	–	7,71; <0,001
20 min	–	7,43; <0,001
25 min	–	13,30; <0,001
30 min	–	14,77; <0,001
35 min	–	36,51; <0,001
40 min	–	24,32; <0,001
45 min	–	15,95; <0,001
50 min	–	9,96; <0,001
55 min	–	12,74; <0,001
60 min	–	22,96; <0,001
AMPH 0,5=0,5 mg/kg amfetamina; PWZ-029 2=2 mg/kg PWZ-029; PWZ-029 5=5 mg/kg PWZ-029; PWZ-029 10=10 mg/kg PWZ-029		

4.2.4 Eksperiment 4

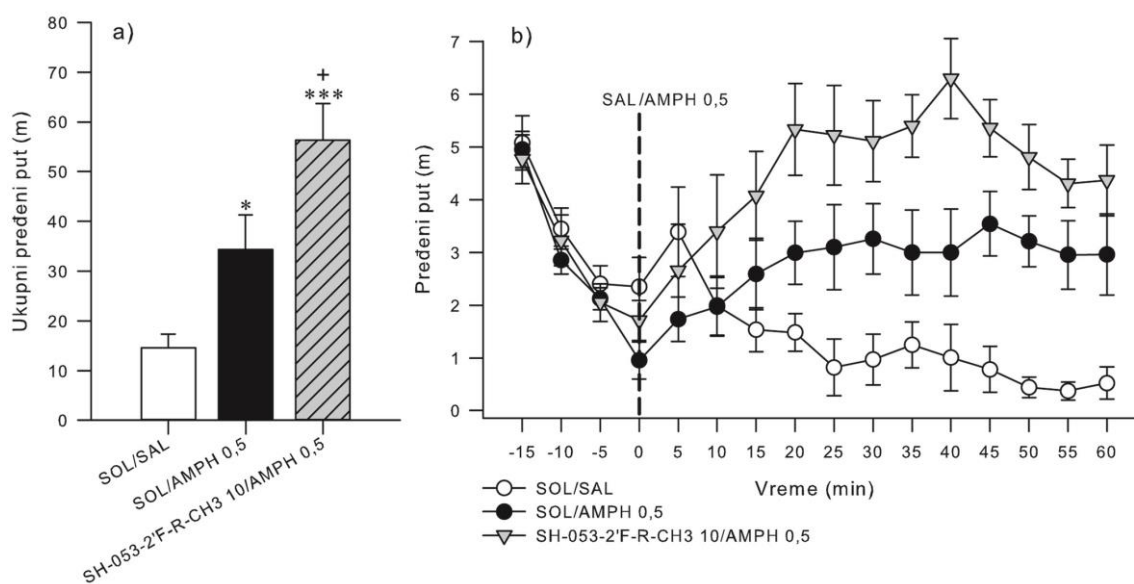
U eksperimentu sa SH-053-2'F-R-CH3 (10 mg/kg) t-test nije pokazao statistički značajnu razliku između aktivne i kontrolne grupe za praćene parametre u prvih 20 minuta testa (Tabela 13).

Tabela 13. Uticaj SH-053-2’F-R-CH3 na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 20 minuta u testu lokomotorne aktivnosti i vrednosti statističke analize za date parametre. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost \pm SD (N = 8).

Tretman	Pređeni put (m)	Vreme provedeno u aktivnosti (s)
SOL	13,29 \pm 4,50	952,20 \pm 122,36
SH-53-2’F-R 10	11,76 \pm 3,80	837,91 \pm 116,56
t test	t(14)=0,74 p=0,474	t(14)=1,89 p=0,076

Nakon davanja amfetamina jednofaktorska ANOVA je pokazala statistički značajan efekat tretmana na ukupni pređeni put tokom 60 min praćenja ($F(2,21)=11,88$; $p<0,001$; Slika 9a) i na ukupno vreme provedeno u aktivnosti ($F(2,21)=30,45$; $p<0,001$; Slika 21a).

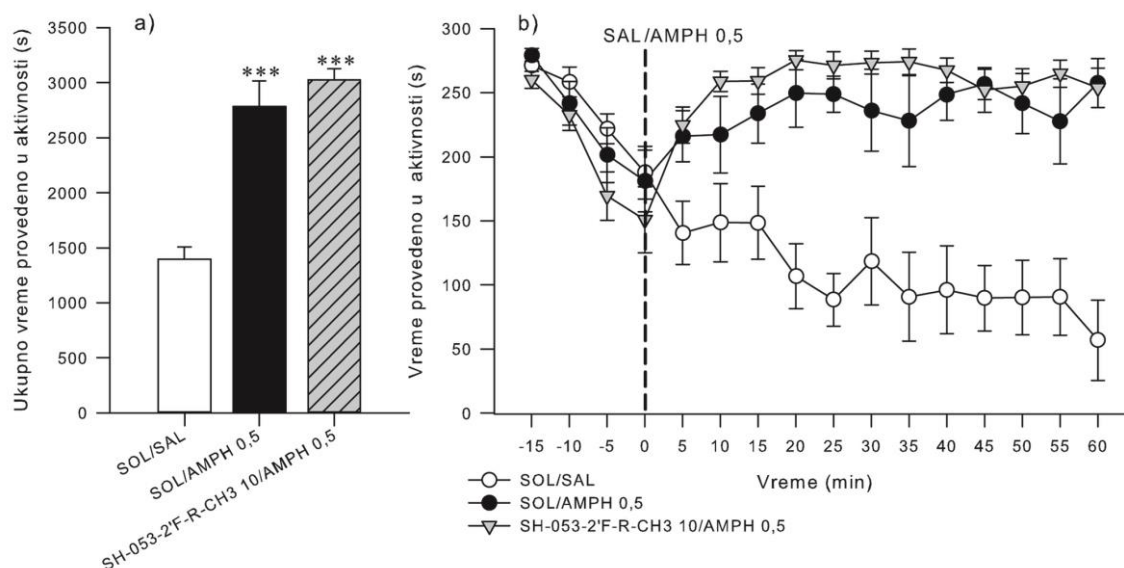
Post hoc SNK test je pokazao statistički značajno povećanje aktivnosti u grupi koja je primala SH-053-2’F-R-CH3 (10 mg/kg) u odnosu na kontrolnu grupu, ali i povećanje aktivnosti u ovoj grupi u odnosu na amfetamin, posmatrajući ukupni pređeni put nakon 60 minuta praćenja (Slika 20a).



Slika 20. Uticaj SH-053-2’F-R-CH3 (10 mg/kg) na a) ukupni pređeni put pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 60 min i b) pređeni put u petominutnim intervalima pri *i.p.* primeni amfetamina (0,5 mg/kg). * $p<0,05$ i * $p<0,001$ u odnosu na SOL/SAL grupu, + $p<0,05$ u odnosu na SOL/AMPH 0,5 grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.**

Dodatno, *post hoc* SNK test je pokazao statistički značajno povećanje vremena provedenog u aktivnosti u grupi koja je primala SH-053-2’F-R-CH3 (10 mg/kg) u odnosu na kontrolnu

grupu, ali povećanje ovog parametra u grupi koja je primila α_5 -selektivni ligand pre amfetamina u odnosu na sâm amfetamin nije primećeno nakon 60 minuta (Slika 21a).



Slika 21. Uticaj SH-053-2'F-R-CH3 (10 mg/kg) na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 60 min i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima pri *i.p.* primeni amfetamina (0,5 mg/kg). * $p < 0,001$ u odnosu na SOL/SAL grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.**

Kada je statistička analiza proširena na petominutne intervale (Slika 20b i 21b), pokazalo se da je hiperlokomotorni efekat tretmana bio izražen sve vreme trajanja testa. Vrednosti dvofaktorske ANOVA-e sa ponavljanjem su date u Tabeli 14. Pošto je interakcija faktora za oba prikazana parametra bila značajna, rađene su jednofaktorske ANOVA-e po intervalima (Tabela 14).

Tabela 14. Rezultati statističke analize uticaja 10 mg/kg SH-053-2'F-R-CH3 i amfetamina na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 60 minuta u testu lokomotorne aktivnosti.

	<i>Faktori</i>	Vreme provedeno u aktivnosti (s)	
		Pređeni put (m)	Vreme provedeno u aktivnosti (s)
Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem			
<i>Tretman</i>	Tretman, F(2,21); p	11,88; <0,001	30,45; <0,001
	Vreme, F(11,231); p	1,81; 0,053	0,88; 0,564
	Interakcija, F(22,231); p	4,43; <0,001	2,92; <0,001
SNK post hoc (p)			
	SH-053 10/AMPH vs. SOL/SAL	<0,001	<0,001
	SH-053 10/AMPH vs. SOL/AMPH	0,018	nz
	SOL/AMPH vs. SOL/SAL	0,032	<0,001
Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(2,21); p)			
	<i>Vreme</i>		
	5 min	1,23; 0,311	0,69; 0,514
	10 min	1,13; 0,342	5,28; 0,014
	15 min	3,66; 0,043	4,90; 0,018
	20 min	9,11; 0,001	6,92; 0,005
	25 min	7,98; 0,003	17,76; <0,001
	30 min	10,23; 0,001	40,30; <0,001
	35 min	10,97; 0,001	8,68; 0,002
	40 min	12,90; <0,001	10,65; 0,001
	45 min	18,59; <0,001	15,95; <0,001
	50 min	22,52; <0,001	24,71; <0,001
	55 min	18,17; <0,001	15,99; <0,001
	60 min	10,06; 0,001	11,90; <0,001
AMPH=0,5 mg/kg amfetamina; SH-053 10=10 mg/kg SH-053-2'F-R-CH3; nz=nije statistički značajno			

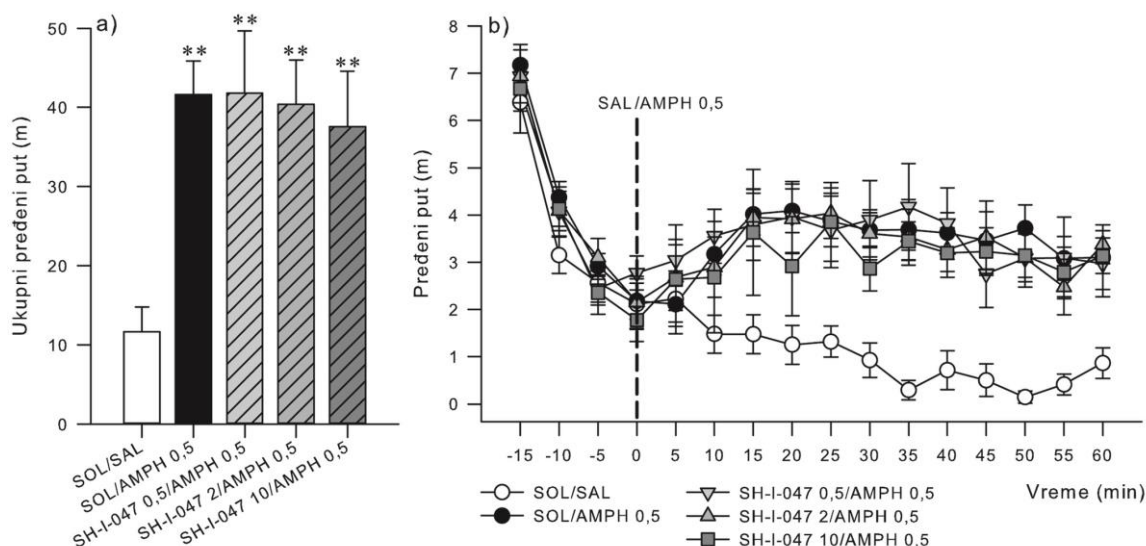
4.2.5 Eksperiment 5

U eksperimentu sa SH-I-047, analiza varijanse nije pokazala značajan efekat tretmana na ukupnu lokomotornu aktivnost kao ni na vreme provedeno u aktivnosti pacova tokom 20 min praćenja (Tabela 15).

Tabela 15. Uticaj SH-I-047 na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 20 minuta u testu lokomotorne aktivnosti i vrednosti statističke analize za date parametre. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost \pm SD (N = 8).

Tretman	Pređeni put (m)	Vreme provedeno u aktivnosti (s)
SOL	14,22 \pm 4,92	940,67 \pm 115,46
SH-I-047 0,5	16,23 \pm 3,22	1012,75 \pm 62,79
SH-I-047 2	16,28 \pm 3,44	946,57 \pm 132,12
SH-I-047 10	14,94 \pm 4,80	892,57 \pm 100,07
Jednofaktorska ANOVA	F(3,28)=0,47 p=0,705	F(3,28)=1,74 p=0,181

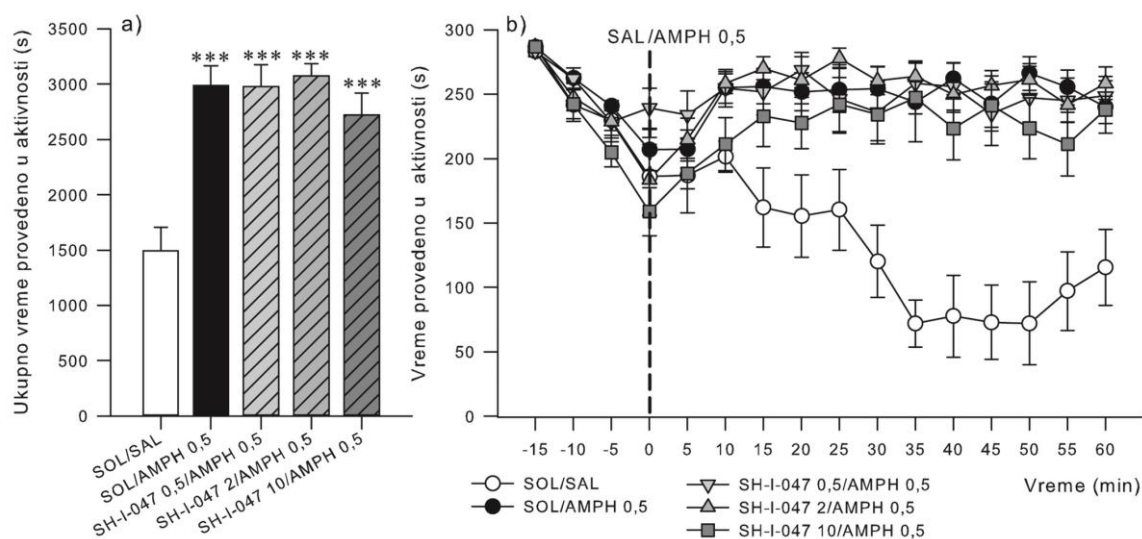
Uticaj amfetamina, kao i kombinacije SH-I-047 (0,5; 2 i 10 mg/kg) i amfetamina na pređeni put i vreme provedeno u aktivnosti tokom 60 minuta trajanja testa, dato je na Slici 22a. Jednofaktorska ANOVA za ukupni pređeni put otkriva značajnost tretmana ($F(4,35)=4,91$; $p=0,003$), a *post hoc* SNK test pokazuje da sve grupe prelaze duži put od kontrolne grupe (Slika 22a).



Slika 22. Uticaj SH-I-047 (0,5; 2 i 10 mg/kg) na a) ukupni pređeni put pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 60 min i b) pređeni put u petominutnim intervalima pri *i.p.* primeni amfetamina (0,5 mg/kg). ** $p<0,01$ u odnosu na SOL/SAL grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.

Isto se zapaža i praćenjem parametra ukupno vreme provedeno u aktivnosti (jednofaktorska ANOVA za faktor tretman: $F(4,35)=12,98$; $p<0,001$). Vrednosti *post hoc* SNK testa

potvrđuju da prisustvo SH-I-047 ne prevenira hiperlokomotornu aktivnost izazvanu amfetaminom (Slika 23).



Slika 23. Uticaj SH-I-047 (0,5; 2 i 10 mg/kg) na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 60 min i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima pri *i.p.* primeni amfetamina (0,5 mg/kg). * $p < 0,001$ u odnosu na SOL/SAL grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.**

Analiza petominutnih intervala pokazala je statistički značajan efekat kako amfetamina, tako i kombinacije SH-I-047 i amfetamina na parametre pređeni put i vreme provedeno u aktivnosti (Tabela 16).

Tabela 16. Rezultati statističke analize uticaja SH-I-047 i amfetamina na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 60 minuta u testu lokomotorne aktivnosti.

<i>Faktori</i>	Vreme provedeno u aktivnosti (s)	
	Pređeni put (m)	Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem
<i>Tretman</i>		
Tretman, F(4,35); p	4,91; 0,003	12,98; <0,001
Vreme, F(11,385); p	3,17; <0,001	3,17; <0,001
Interakcija, F(44,385); p	1,16; 0,236	3,21; <0,001
	SNK post hoc (p)	
SH-I-47 0,5/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	0,007	<0,001
SH-I-47 2/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	0,004	<0,001
SH-I-47 10/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	0,004	<0,001
SOL/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	0,005	<0,001
	Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(4,35); p)	
<i>Vreme</i>		
5 min	–	1,04; 0,401
10 min	–	3,77; 0,012
15 min	–	4,37; 0,006
20 min	–	4,86; 0,003
25 min	–	3,99; 0,009
30 min	–	7,48; <0,001
35 min	–	18,17; <0,001
40 min	–	13,12; <0,001
45 min	–	12,80; <0,001
50 min	–	13,08; <0,001
55 min	–	9,71; <0,001
60 min	–	9,71; <0,001
AMPH 0,5=0,5 mg/kg amfetamina; SH-I-47 0,5=0,5 mg/kg SH-I-047; SH-I-47 2=2 mg/kg SH-I-047; SH-I-47 10=10 mg/kg SH-I-047		

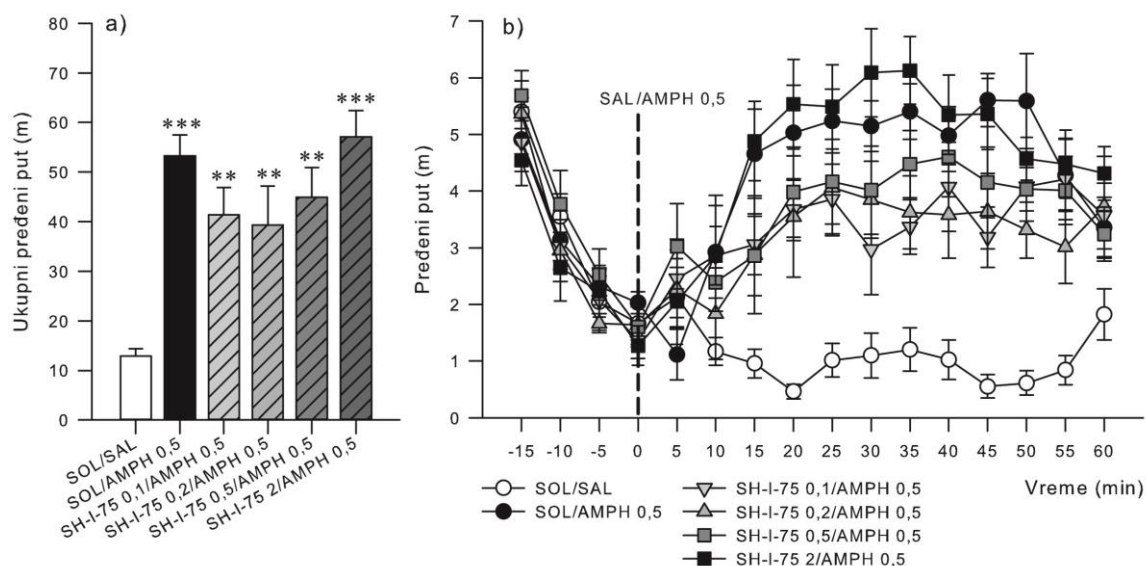
4.2.6 Eksperiment 6

U eksperimentu sa SH-I-75, još jednim pozitivnim modulatorom α_5 GABA_A receptora, analiza varijanse nije pokazala značajan efekat tretmana na ukupnu lokomotornu aktivnost kao ni na vreme provedeno u aktivnosti pacova tokom 20 min praćenja (Tabela 17).

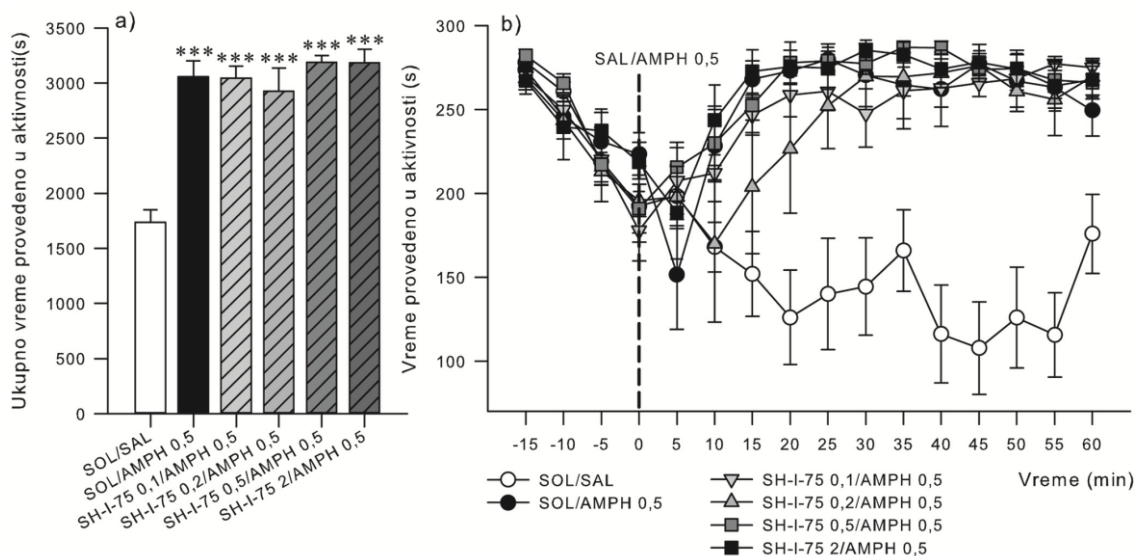
Tabela 17. Uticaj SH-I-75 na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 20 minuta u testu lokomotorne aktivnosti i vrednosti statističke analize za date parametre. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost \pm SD (N = 8, 7, 7, 7, 7).

Tretman	Pređeni put (m)	Vreme provedeno u aktivnosti (s)
SOL	12,67 \pm 3,40	950,70 \pm 57,33
SH-I-75 0,1	11,33 \pm 2,68	918,00 \pm 80,24
SH-I-75 0,2	11,63 \pm 2,15	921,37 \pm 61,43
SH-I-75 0,5	13,59 \pm 3,58	956,27 \pm 61,86
SH-I-75 2	10,70 \pm 3,59	962,79 \pm 112,60
Jednofaktorska ANOVA	F(4,31)=0,94 p=0,453	F(4,31)=0,51 p=0,729

Nakon davanja amfetamina jednofaktorska ANOVA je pokazala statistički značajan efekat tretmana na ukupni pređeni put tokom 60 min praćenja ($F(5,37)=9,34$; $p<0,001$) i na ukupno vreme provedeno u aktivnosti ($F(5,37)=18,92$; $p<0,001$). *Post hoc* SNK test je dat na Slici 24a za ukupni pređeni put, a na Slici 25a za ukupno vreme provedeno u aktivnosti. Na osnovu praćenih parametara, primenom SH-I-75 nije moguće prevenirati promene ponašanja nastale delovanjem amfetamina u toku 60 minuta testa.



Slika 24. Uticaj SH-I-75 (0,1; 0,2; 0,5 i 2 mg/kg) na a) ukupni pređeni put pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 60 min i b) pređeni put u petominutnim intervalima pri *i.p.* primeni amfetamina (0,5 mg/kg). ** $p<0,01$ i * $p<0,001$ u odnosu na SOL/SAL grupu. Broj životinja u grupama: 8, 7, 7, 7, 7, 7.**



Slika 25. Uticaj SH-I-75 (0,1; 0,2; 0,5 i 2 mg/kg) na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti pacova u kavezu za praćenje lokomotorne aktivnosti tokom 60 min i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima pri *i.p.* primeni amfetamina (0,5 mg/kg). * $p < 0,001$ u odnosu na SOL/SAL grupu. Broj životinja u grupama: 8, 7, 7, 7, 7, 7.**

Analiza petominutnih intervala potvrdila je statistički značajan efekat amfetamina, kao i kombinacije SH-I-75 i amfetamina na parametre pređeni put i vreme provedeno u aktivnosti (Tabela 18).

Tabela 18. Rezultati statističke analize uticaja SH-I-75 i amfetamina na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 60 minuta u testu lokomotorne aktivnosti.

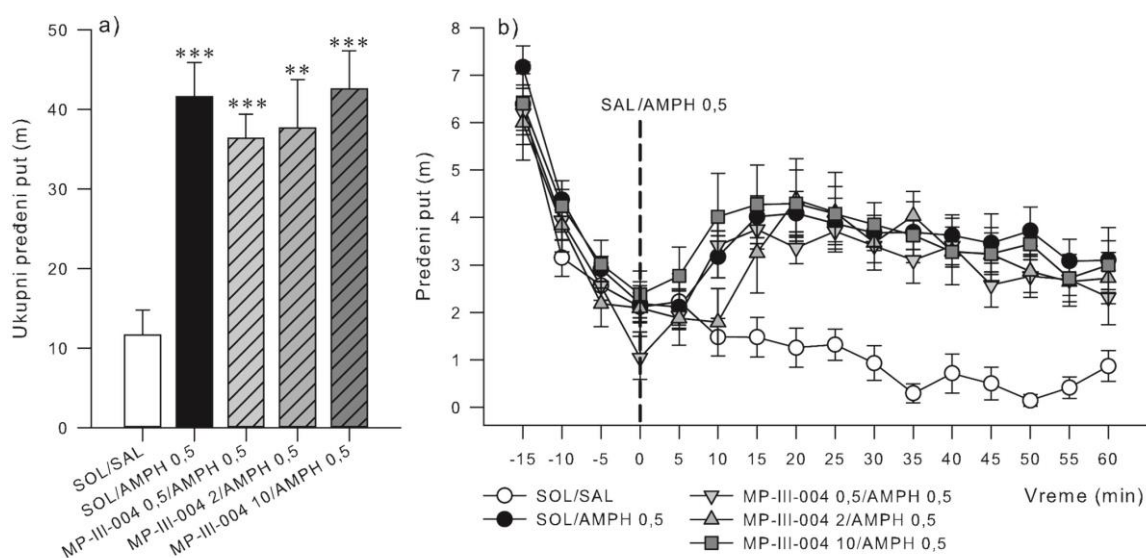
	<i>Faktori</i>	Vreme provedeno u		
		Pređeni put (m)	aktivnosti (s)	
		Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem		
<i>Tretman</i>	Tretman, F(5,37); p	9,34; <0,001	18,92; <0,001	
	Vreme, F(11,407); p	10,04; <0,001	7,48; <0,001	
	Interakcija, F(55,407); p	2,32; <0,001	2,27; <0,001	
			SNK post hoc (p)	
	SH-I-75 0,1/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	0,001	<0,001	
SH-I-75 0,2/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	0,001	<0,001		
SH-I-75 0,5/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	<0,001	<0,001		
SH-I-75 2/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	<0,001	<0,001		
SOL/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	<0,001	<0,001		
		Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(5,37); p)		
	<i>Vreme</i>			
	5 min	0,95; 0,463	0,96; 0,456	
	10 min	1,14; 0,357	1,63; 0,177	
	15 min	4,75; 0,002	4,59; 0,002	
	20 min	6,21; <0,001	7,76; <0,001	
	25 min	6,32; <0,001	7,92; <0,001	
	30 min	7,25; <0,001	9,52; <0,001	
	35 min	10,46; <0,001	7,16; <0,001	
	40 min	6,02; <0,001	14,29; <0,001	
	45 min	12,73; <0,001	23,38; <0,001	
	50 min	9,00; <0,001	12,84; <0,001	
	55 min	5,77; <0,001	14,37; <0,001	
	60 min	2,00; 0,102	7,33; <0,001	
AMPH 0,5=0,5 mg/kg amfetamina; SH-I-75 0,1=0,1 mg/kg SH-I-75; SH-I-75 0,2=0,2 mg/kg SH-I-75; SH-I-75 0,5=0,5 mg/kg SH-I-75; SH-I-75 2=2 mg/kg SH-I-75; SH-I-75 10=10 mg/kg SH-I-75				

4.2.7 Eksperiment 7

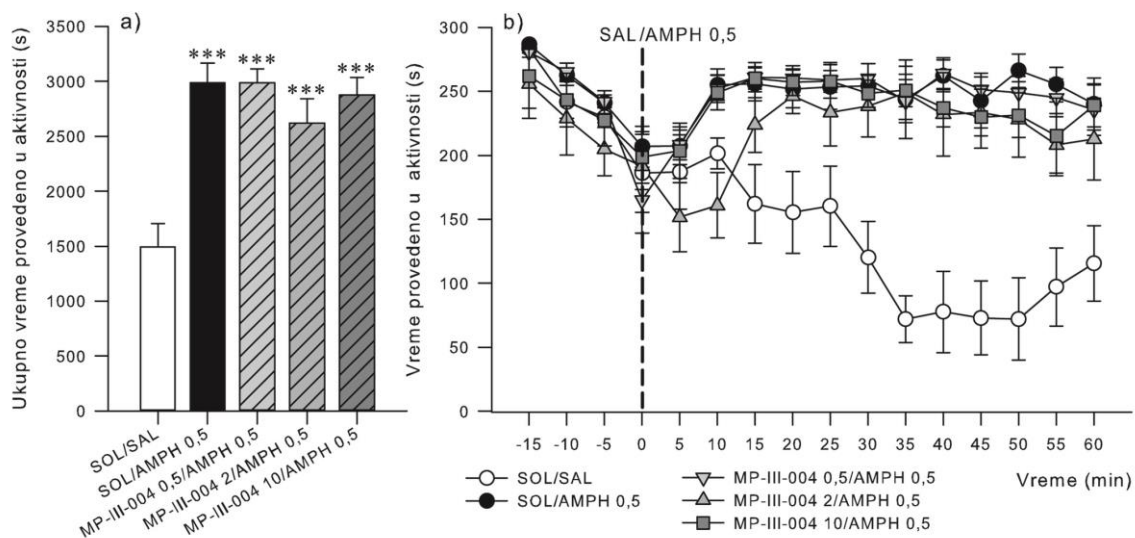
Uticaj tretmana MP-III-004 na ukupni pređeni put i u ovom eksperimentu nije bio statistički značajan u prvih 20 minuta (Tabela 19), dok je nakon injiciranja amfetamina jednofaktorska ANOVA bila značajna za faktor tretman u toku 60 minuta trajanja testa (za pređeni put: $F(4,35)=8,37$; $p<0,001$; za vreme provedeno u aktivnosti: $F(4,35)=11,88$; $p<0,001$) *Post hoc* analiza SNK testom pokazala je da su grupa koja je primala sâm amfetamin, kao i grupe koju su pre amfetamina primale ispitivani ligand (u svim dozama) bile statistički značajno različite u odnosu na kontrolu (Slika 26a i 27a).

Tabela 19. Uticaj MP-III-004 (0,5; 2 i 10 mg/kg) na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 20 minuta u testu lokomotorne aktivnosti i vrednosti statistike za date parametre. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost \pm SD (N = 8).

<i>Tretman</i>	Pređeni put (m)	Vreme provedeno u aktivnosti (s)
SOL	14,22 \pm 4,92	940,67 \pm 115,46
MP-III-004 0,5	13,73 \pm 3,21	952,11 \pm 83,92
MP-III-004 2	14,11 \pm 5,49	880,77 \pm 238,52
MP-III-004 10	16,05 \pm 6,08	930,54 \pm 184,58
Jednofaktorska ANOVA	F(3,28)=0,34 p=0,798	F(3,28)=0,28 p=0,837



Slika 26. Uticaj MP-III-004 (0,5; 2 i 10 mg/kg) na a) ukupni pređeni put pacova tokom 60 minuta i b) petominutne intervale. **p<0,01 i *p<0,001 u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL). Broj životinji u svakoj grupi bio je 8.**



Slika 27. Uticaj MP-III-004 (0,5; 2 i 10 mg/kg) na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti pacova tokom 60 min, b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima nakon primene amfetamina. *p<0,001 u odnosu na SOL/SAL grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.**

Kada je statistička analiza proširena na petominutne intervale (Slika 26b i 27b), pokazalo se da je hiperlokomotorni efekat tretmana bio izražen sve vreme trajanja testa. Vrednosti dvofaktorske ANOVA-e sa ponavljanjem su date u Tabeli 20. Pošto je interakcija faktora za oba prikazana parametra bila značajna, rađene su jednofaktorske ANOVA-e po intervalima (Tabela 20).

Tabela 20. Rezultati statističke analize uticaja MP-III-004 i amfetamina na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 60 minuta u testu lokomotorne aktivnosti.

<i>Faktori</i>	Vreme provedeno u aktivnosti (s)	
	Pređeni put (m)	Vreme provedeno u aktivnosti (s)
	Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem	
Tretman, F(4,35); p	8,37; <0,001	11,88; <0,001
Vreme, F(11,385); p	6,93; <0,001	3,92; <0,001
Interakcija, F(44,385); p	1,86; 0,001	3,41; <0,001
<i>Tretman</i>	SNK post hoc (p)	
MP-III-004 0,5/AMPH vs. SOL/SAL	<0,001	<0,001
MP-III-004 2/AMPH vs. SOL/SAL	<0,001	<0,001
MP-III-004 10/AMPH vs. SOL/SAL	<0,001	<0,001
SOL/AMPH vs. SOL/SAL	<0,001	<0,001
	Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(4,35); p)	
<i>Vreme</i>		
5 min	0,50; 0,733	1,19; 0,333
10 min	3,32; 0,021	6,87; <0,001
15 min	3,23; 0,024	5,02; 0,003
20 min	4,80; 0,003	5,97; 0,001
25 min	4,62; 0,004	3,89; 0,010
30 min	7,66; <0,001	8,98; <0,001
35 min	11,12; <0,001	14,18; <0,001
40 min	6,64; <0,001	11,63; <0,001
45 min	6,08; 0,001	12,18; <0,001
50 min	13,72; <0,001	12,06; <0,001
55 min	6,50; 0,001	7,14; <0,001
60 min	2,83; 0,039	4,74; 0,004
AMPH=0,5 mg/kg amfetamina; MP-III-004 0,5=0,5 mg/kg MP-III-004; MP-III-004 2=2 mg/kg MP-III-004; MP-III-004 10=10 mg/kg MP-III-004		

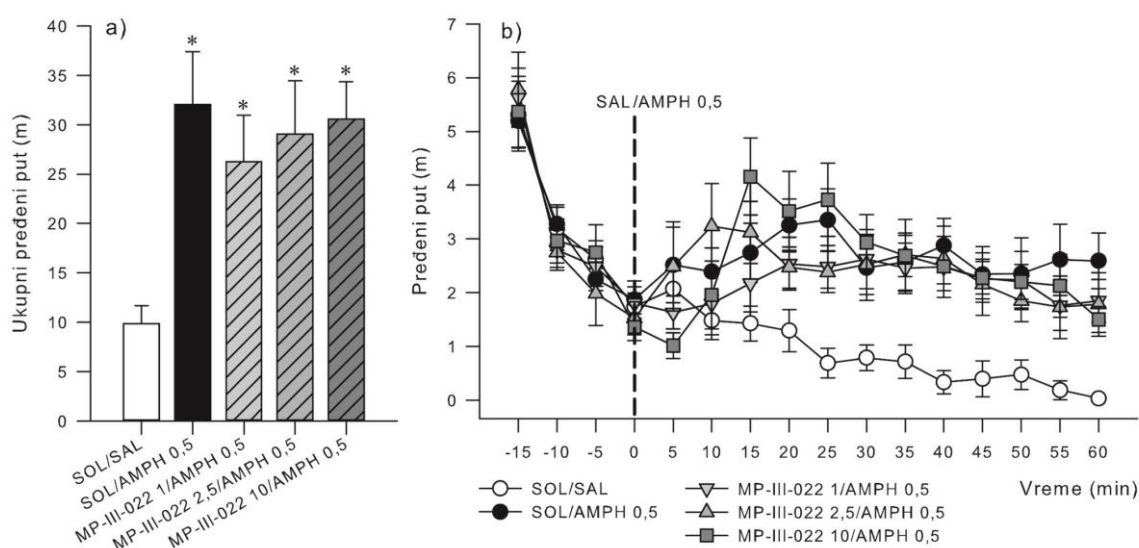
4.2.8 Eksperiment 8

Kako bi se procenila bazalna lokomotorna aktivnost MP-III-022 (dat *i.p.* u dozama od 1; 2,5 i 10 mg/kg), životinje su nakon tretmana praćene 20 minuta. Vrednosti ukupnog pređenog puta i ukupnog vremena provedenog u aktivnosti date su u Tabeli 17. Jednofaktorska ANOVA za oba parametra nije bila značajna za period pre davanja amfetamina (Tabela 21).

Tabela 21. Uticaj MP-III-022 (1; 2,5 i 10 mg/kg) na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 20 minuta u testu lokomotorne aktivnosti i vrednosti statističke analize za date parametre. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost \pm SD (N = 8).

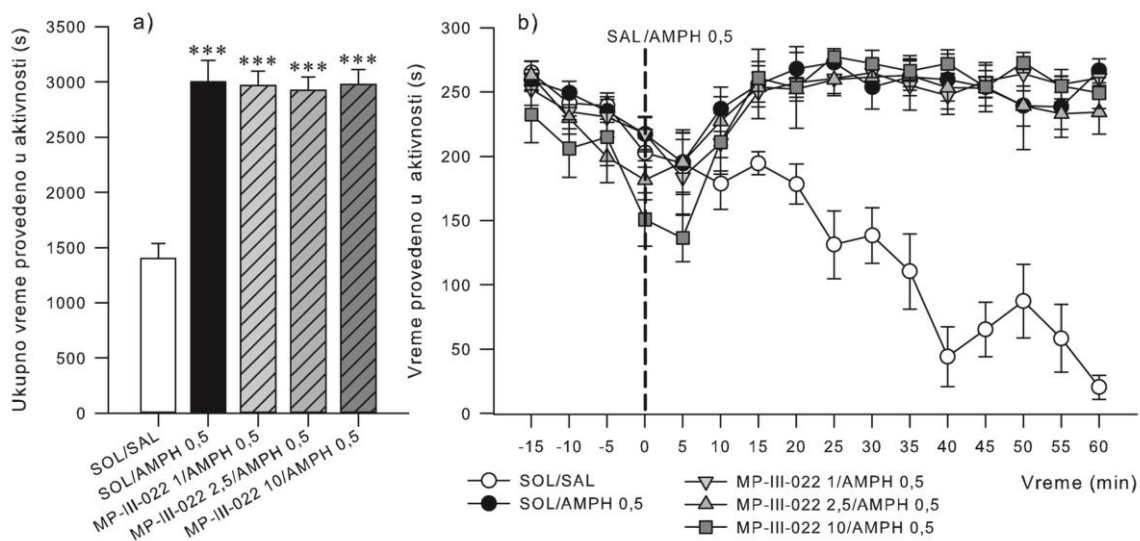
Tretman	Pređeni put (m)	Vreme provedeno u aktivnosti (s)
SOL	12,85 \pm 3,80	947,86 \pm 99,25
MP-III-022 1	12,70 \pm 1,45	934,84 \pm 141,67
MP-III-022 2,5	12,03 \pm 4,20	872,99 \pm 91,70
MP-III-022 10	12,43 \pm 4,08	804,04 \pm 212,67
Jednofaktorska ANOVA	F(3,28)=0,08 p=0,970	F(3,28)=1,66 p=0,197

Jednofaktorska ANOVA primenjena na podatke nakon primene amfetamina otkriva značajan efekat tretmana (za ukupni pređeni put u toku 60 minuta: $F(4,35)=4,16$; $p=0,007$; za ukupno vreme provedeno u aktivnosti: $F(4,35)=22,95$; $p<0,001$). Detaljnija analiza upotrebom *post hoc* SNK testa pokazuje da pacovi koji su pre amfetamina primali MP-III-022, kao i životinje tretirane samo amfetaminom, prelaze statistički značajno veći put od kontrola (Slika 28a).



Slika 28. Uticaj MP-III-022 (1; 2,5 i 10 mg/kg) na a) ukupni pređeni put pacova tokom 60 minuta i b) petominutne intervale. * $p<0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.

Isto se zapaža i ako se analiziraju rezultati SNK *post hoc* testa primenjenog na ukupno vreme provedeno u aktivnosti; MP-III-022 ni u jednoj ispitivanoj dozi nije uspeo da prevenira hiperaktivnost izazvanu amfetaminom (Slika 29a).



Slika 29. Uticaj MP-III-022 (1; 2,5 i 10 mg/kg) na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti pacova tokom 60 min, b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima nakon primene amfetamina. *** $p < 0,001$ odnosu na SOL/SAL grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.

Proširivanjem statističke analize na petominutne intervale potvrđuje se nemogućnost primenjenog modulatora da prevenira promene ponašanja nastale pod dejstvom amfetamina. Rezultati analize dati su u Tabeli 22.

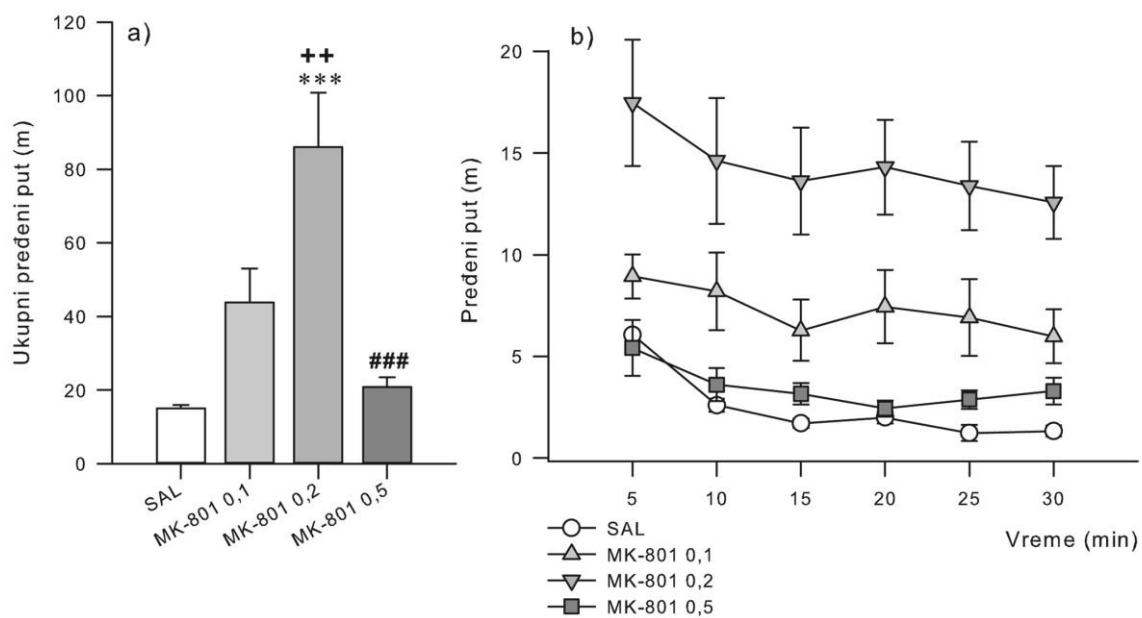
Tabela 22. Rezultati statističke analize uticaja MP-III-022 (1; 2,5 i 10 mg/kg) i amfetamina na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 60 minuta u testu lokomotorne aktivnosti.

	Vreme provedeno u aktivnosti (s)	
	Pređeni put (m)	
<i>Faktori</i>	Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem	
Tretman, F(4,35); p	4,16; 0,007	22,95; <0,001
Vreme, F(11,385); p	5,47; <0,001	9,06; <0,001
Interakcija, F(44,407); p	2,02; <0,001	6,65; <0,001
<i>Tretman</i>	SNK post hoc (p)	
MP-III-022 1/AMPH vs. SOL/SAL	0,013	<0,001
MP-III-022 2,5/AMPH vs. SOL/SAL	0,011	<0,001
MP-III-022 10/AMPH vs. SOL/SAL	0,011	<0,001
SOL/AMPH 0,5 vs. SOL/SAL	0,010	<0,001
<i>Vreme</i>	Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(4,35); p)	
5 min	1,31; 0,284	1,09; 0,375
10 min	1,38; 0,261	1,15; 0,351
15 min	3,41; 0,019	2,58; 0,054
20 min	2,82; 0,039	3,99; 0,009
25 min	5,83; 0,001	16,51; <0,001
30 min	2,77; 0,042	15,21; <0,001
35 min	3,04; 0,030	13,47; <0,001
40 min	4,92; 0,003	31,76; <0,001
45 min	3,67; 0,014	29,38; <0,001
50 min	2,85; 0,038	11,79; <0,001
55 min	3,04; 0,030	22,18; <0,001
60 min	5,33; 0,002	84,20; <0,001
AMPH 0,5=0,5 mg/kg amfetamina; SH-I-75 0,1=0,1 mg/kg SH-I-75; SH-I-75 0,2=0,2 mg/kg SH-I-75; SH-I-75 0,5=0,5 mg/kg SH-I-75; SH-I-75 2=2 mg/kg SH-I-75; SH-I-75 10=10 mg/kg SH-I-75		

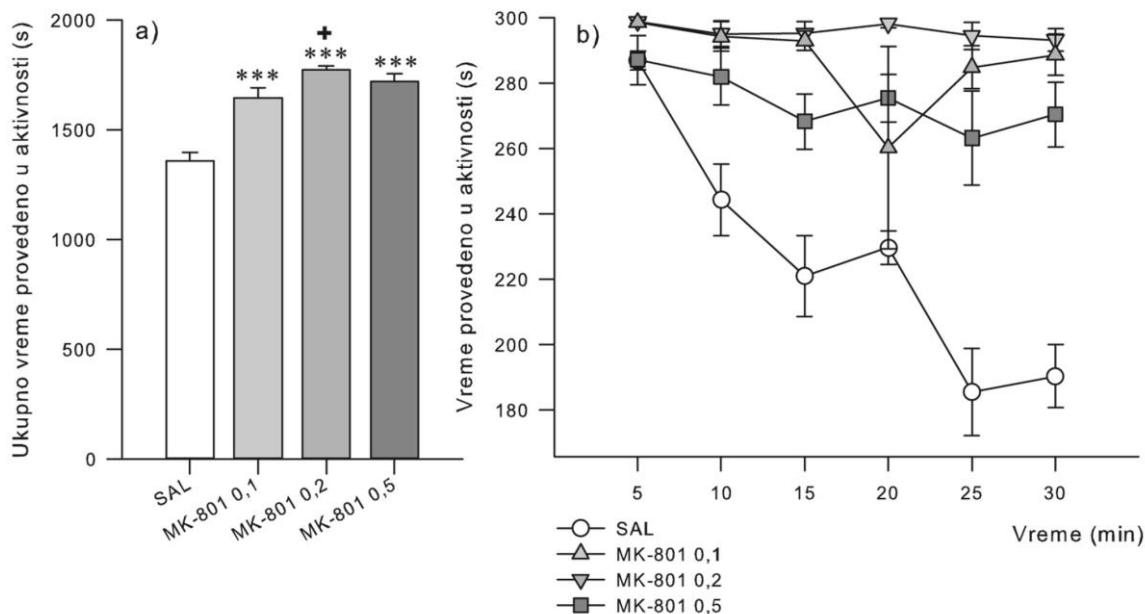
4.2.9 Eksperiment 9

Procena uticaja MK-801 na lokomotornu aktivnost sprovedena je praćenjem ukupnog pređenog puta i ukupnog vremena provedenog u aktivnosti u toku 30 minuta. Jednofaktorska ANOVA je pokazala statistički značajan efekat tretmana za pređeni put ($F(3,27)=12,47$; $p<0,001$, SNK *post hoc* test je prikazan na Slici 30a), kao i za faktor vreme provedeno u aktivnosti ($F(3,27)=25,07$; $p<0,001$). *Post hoc* SNK test za ovaj parametar (Slika 31a) jasno upućuje da su sve doze MK-801 dovele do promene ponašanja u odnosu na kontrolu (grupe koje su primale MK-801 provode više vremena u aktivnosti), ali i da je

aktivnost posle primene doze od 0,2 mg/kg MK-801 veća u odnosu na dozu od 0,1 mg/kg MK-801.



Slika 30. Uticaj MK-801 (0,1; 0,2 i 0,5 mg/kg) na a) ukupni pređeni put pacova tokom 30 minuta i b) pređeni put u petominutim intervalima. $*p<0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SAL), $++p<0,01$ u odnosu na 0,1 mg/kg MK-801 (MK-801 0,1) i $###p<0,001$ u odnosu na 0,5 mg/kg MK-801 (MK-801 0,5). Broj životinja u grupama: 7, 8, 8, 8.**



Slika 31. Uticaj MK-801 (0,1; 0,2 i 0,5 mg/kg) na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti tokom 30 minuta i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima. * $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SAL), + $p < 0,05$ u odnosu na 0,1 mg/kg MK-801 (MK-801 0,1). Broj životinja u grupama: 7, 8, 8, 8.**

Kada se statistička analiza proširi na petominutne intervale, faktor tretman ostaje statistički značajan i za pređeni put i za vreme provedeno u aktivnosti (vrednosti analize date u Tabeli 23).

Tabela 23. Rezultati statističke analize uticaja MK-801 (0,1; 0,2 i 0,5 mg/kg) na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 30 minuta u testu lokomotorne aktivnosti.

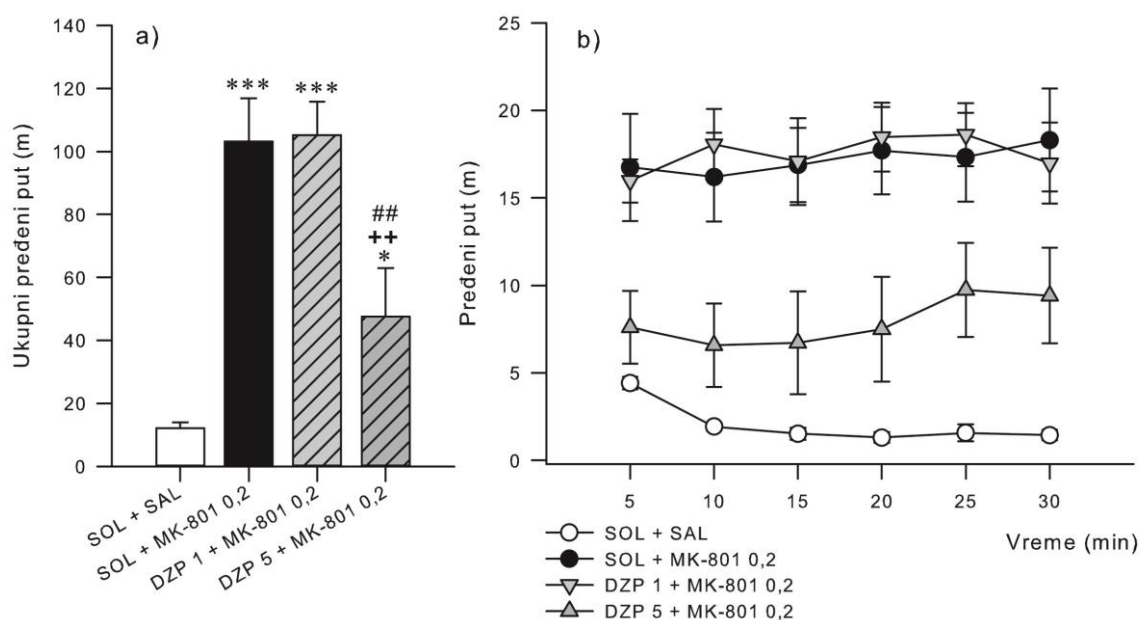
	<i>Faktori</i>	Vreme provedeno u		
		Pređeni put (m)	aktivnosti (s)	
		Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem		
<i>Tretman</i>	Tretman, F(3,27); p	12,47; <0,001	25,07; <0,001	
	Vreme, F(5,135); p	19,17; <0,001	9,86; <0,001	
	Interakcija, F(15,135); p	1,03; 0,432	4,37; <0,001	
			SNK post hoc (p)	
	SAL vs. MK 0,1	nz	<0,001	
	SAL vs. MK 0,2	<0,001	<0,001	
	SAL vs. MK 0,5	nz	<0,001	
MK 0,1 vs. MK 0,2	0,003	0,045		
MK 0,1 vs. MK 0,5	nz	nz		
MK 0,2 vs. MK 0,5	<0,001	nz		
		Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(3,27); p)		
<i>Vreme</i>	5 min	–	2,64; 0,070	
	10 min	–	9,91; <0,001	
	15 min	–	20,19; <0,001	
	20 min	–	2,88; 0,054	
	25 min	–	21,61; <0,001	
	30 min	–	36,67; <0,001	
MK 0,1=0,1 mg/kg MK-801; MK 0,2=0,2 mg/kg MK-801; MK 0,5=0,5 mg/kg MK-801; nz=nije statistički značajno				

Na osnovu rezultata ovog eksperimenta odabrana je doza od 0,2 mg/kg MK-801 kao doza koja pouzdano izaziva hiperlokomotorni efekat u testu lokomotorne aktivnosti i koja povećava aktivnost životinje u odnosu na kontrolu, a pri kojoj nije viđena ataksija (velika aktivnost, ali mali pređeni put) kao pri većim dozama (0,5 mg/kg MK-801).

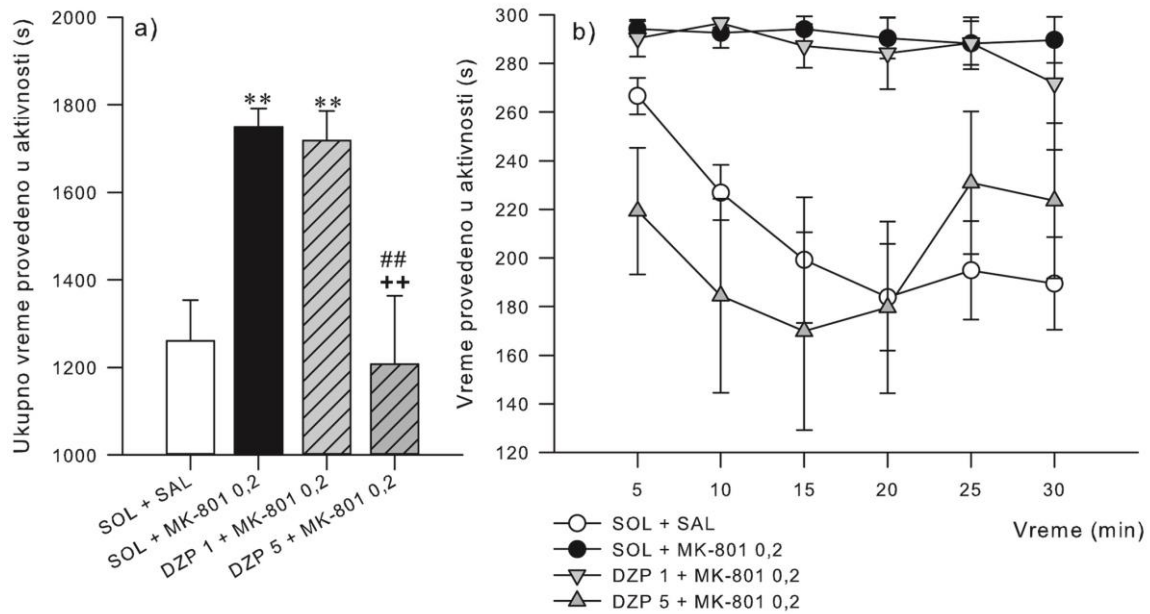
4.2.10 Eksperiment 10

Uticaj diazepama (1 i 5 mg/kg) na hiperlokomotorni efekat izazvan primenom 0,2 mg/kg MK-801 dat je na Slici 32 i 33. Jednofaktorska ANOVA pokazuje statistički značajan efekat faktora tretman za oba posmatrana parametra, ukupni pređeni put i ukupno vreme provedeno u aktivnosti (F(3,28)=15,22; p<0,001, odnosno F(3,28)=8,49; p<0,001). Interesantno je da ni visoka doza diazepama (5 mg/kg) ne uspeva u potpunosti da prevenira

hiperlokomotorni efekat MK-801, budući da postoji statistička razlika DZP 5+MK-801 0,2 grupe u odnosu na sve ostale tretmane (Slika 32a). Ova parcijalna reverzija efekta MK-801 se primećuje i analizom rezultata po petominutnim intervalima (Slika 32b). Ukupno vreme provedeno u aktivnosti je parametar koji dodatno govori o parcijalnom efektu 5 mg/kg diazepama na promene ponašanja koje izaziva MK-801. Velika standardna greška (devijacija) u grupi koja je primala 5 mg/kg DZP i 0,2 mg/kg MK-801 upućuje na dihotomnost ponašanja pacova u ovoj grupi (životinja je u toku 30 minuta praćenja ili budna i veoma aktivna pod pretežnim dejstvom MK-801 ili sedirana, pod pretežnim dejstvom diazepama). S obzirom da doza od 5 mg/kg diazepama, kada se primeni sama, dovodi do izražene sedacije, dobijeni nalaz nije iznenađujući, ali se devijacija i njen uzrok moraju imati u vidu pri interpretaciji rezultata.



Slika 32. Uticaj diazepama (1 i 5 mg/kg) i MK-801 0,2 mg/kg na a) ukupni pređeni put pacova tokom 30 minuta i b) pređeni put u petominutnim intervalima. * $p < 0,001$ i * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL), ++ $p < 0,01$ u odnosu na 0,2 mg/kg MK-801 (SOL+MK-801 0,2) i ## $p < 0,01$ u odnosu na kombinaciju 1 mg/kg DZP i 0,2 mg/kg MK-801 (DZP 1+MK-801 0,2). Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.**



Slika 33. Uticaj diazepama (1 i 5 mg/kg) i MK-801 0,2 mg/kg na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti tokom 30 minuta i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima. ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL), ++ $p < 0,01$ u odnosu na 0,2 mg/kg MK-801 (SOL+MK-801 0,2) i ## $p < 0,01$ u odnosu na kombinaciju 1 mg/kg DZP i 0,2 mg/kg MK-801 (DZP 1+MK-801 0,2). Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.

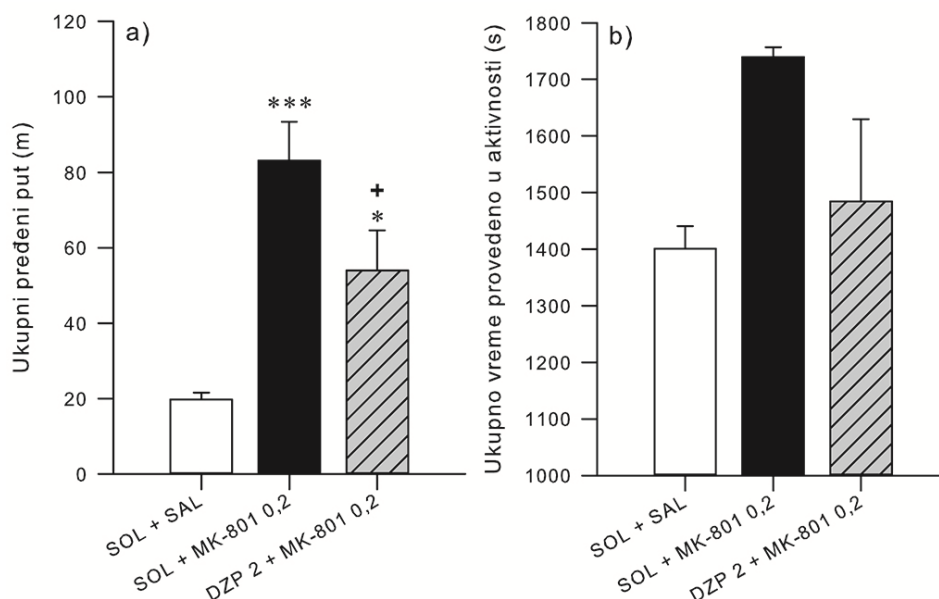
Rezultati dvofaktorske ANOVA sa ponavljanjem za petominutne intervale, kao i vrednosti jednofaktorskih ANOVA po intervalima kada je interakcija faktora bila značajna, prikazani su u Tabeli 24.

Tabela 24. Rezultati statističke analize uticaja diazepama (1 i 5 mg/kg) i 0,2 mg/kg MK-801 na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 30 minuta u testu lokomotorne aktivnosti.

Faktori	Vreme provedeno u	
	Pređeni put (m)	aktivnosti (s)
	Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem	
Tretman, F(3,28); p	15,22; <0,001	8,49; <0,001
Vreme, F(5,140); p	0,99; 0,428	2,74; 0,022
Interakcija, F(15,140); p	1,37; 0,172	1,92; 0,026
<i>Tretman</i>	SNK post hoc (p)	
SOL+SAL vs. SOL+MK 0,2	<0,001	<0,001
DZP 1+MK 0,2 vs. SOL+SAL	<0,001	<0,001
DZP 5+MK 0,2 vs. SOL+SAL	<0,001	nz
DZP 5+MK 0,2 vs. SOL+MK 0,2	<0,001	<0,001
DZP 5+MK 0,2 vs. DZP 1+MK 0,2	<0,001	<0,001
	Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(3,28); p)	
<i>Vreme</i>		
5 min	–	5,92; 0,003
10 min	–	6,67; 0,002
15 min	–	6,43; 0,002
20 min	–	7,37; 0,001
25 min	–	5,77; 0,003
30 min	–	3,76; 0,022
MK 0,2=0,2 mg/kg MK-801; DZP 1=1 mg/kg diazepama; DZP 5=5 mg/kg diazepama; nz=nije statistički značajno		

4.2.11 Eksperiment 11

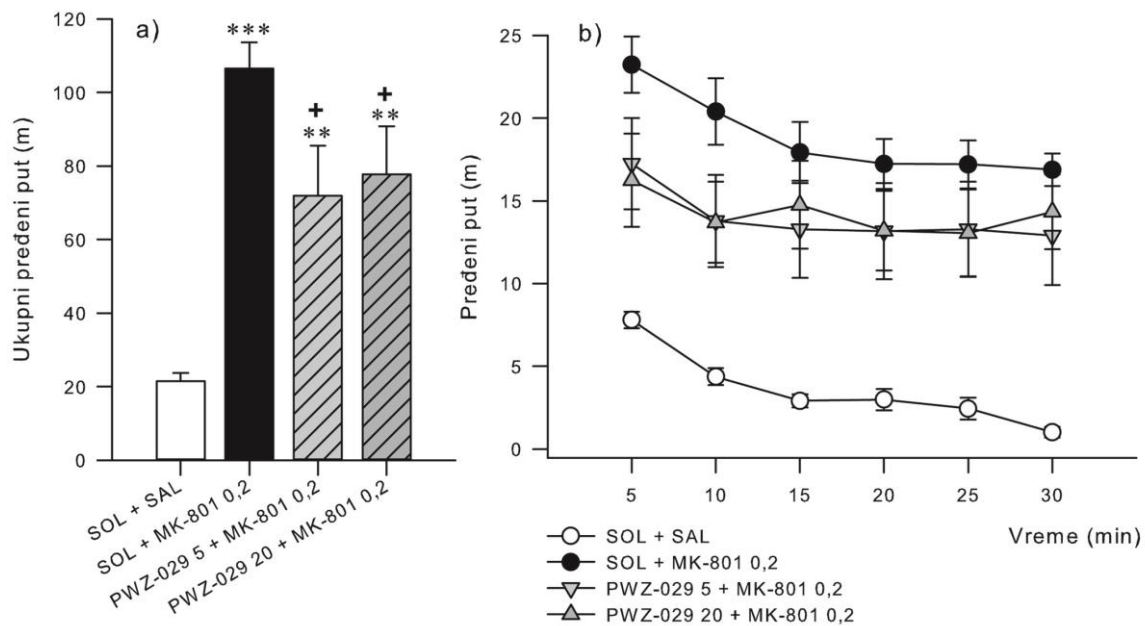
U cilju daljeg ispitivanja mogućnosti diazepama da bez izražene sedacije izvrši reverziju promene ponašanja nastalog primenom MK-801, sproveden je eksperiment sa 2 mg/kg diazepama. Jednofaktorska ANOVA je bila statistički značajna za parametar ukupni pređeni put u toku 30 minuta ($F(2,29)=11,94$; $p<0,001$), ali nije dostigla značajnost za ukupno vreme provedeno u aktivnosti ($F(2,29)=3,08$; $p=0,061$). *Post hoc* SNK analiza je pokazala parcijalno vraćanje parametra pređeni put u grupi životinja koje su primale 2 mg/kg DZP i 0,2 mg/kg MK-801 (Slika 34a).



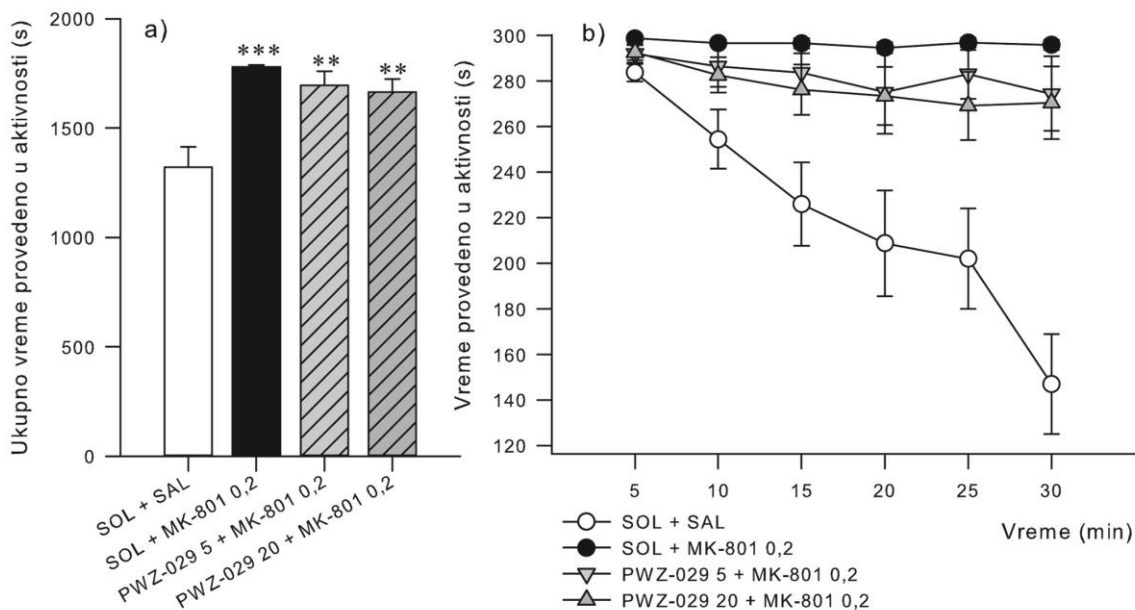
Slika 34. Uticaj diazepama 2 mg/kg i MK-801 0,2 mg/kg na a) ukupni pređeni put i b) ukupno vreme provedeno u aktivnosti tokom 30 minuta. * $p < 0,001$; * $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL), + $p < 0,05$ u odnosu na 0,2 mg/kg MK-801 (SOL+MK-801 0,2). Broj životinja u grupama: 10, 10, 12.**

4.2.12 Eksperiment 12

Efekat primene PWZ-029 (5 i 20 mg/kg) na povećanje lokomotorne aktivnosti pacova pod dejstvom 0,2 mg/kg MK-801 ispitan je obrađivanjem parametara pređeni put (Slika 35) i vreme provedeno u aktivnosti (Slika 36). Oba parametra su bila statistički značajna po faktoru tretman (jednofaktorska ANOVA za pređeni put $F(3,33)=13,29$; $p < 0,001$; za vreme provedeno u aktivnosti: $F(3,33)=9,67$; $p < 0,001$). Vrednosti *post hoc* SNK testa ukazuju na parcijalnu reverziju hiperlokomotornog efekta po parametru pređeni put (Slika 35a). Međutim, očekivani efekat PWZ-029 nije viđen posmatranjem parametra vreme provedeno u aktivnosti (*post hoc* SNK test dat na Slici 36a).



Slika 35. Uticaj PWZ-029 (5 i 20 mg/kg) i MK-801 0,2 mg/kg na a) ukupni pređeni put pacova tokom 30 minuta i b) pređeni put u petominutnim intervalima. *** $p < 0,001$ i ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL), + $p < 0,05$ u odnosu na 0,2 mg/kg MK-801 (SOL+MK-801 0,2). Broj životinja u grupama: 10, 9, 9, 9.



Slika 36. Uticaj PWZ-029 (5 i 20 mg/kg) i MK-801 0,2 mg/kg na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti tokom 30 minuta i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima. *** $p < 0,001$ i ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL). Broj životinja u grupama: 10, 9, 9, 9.

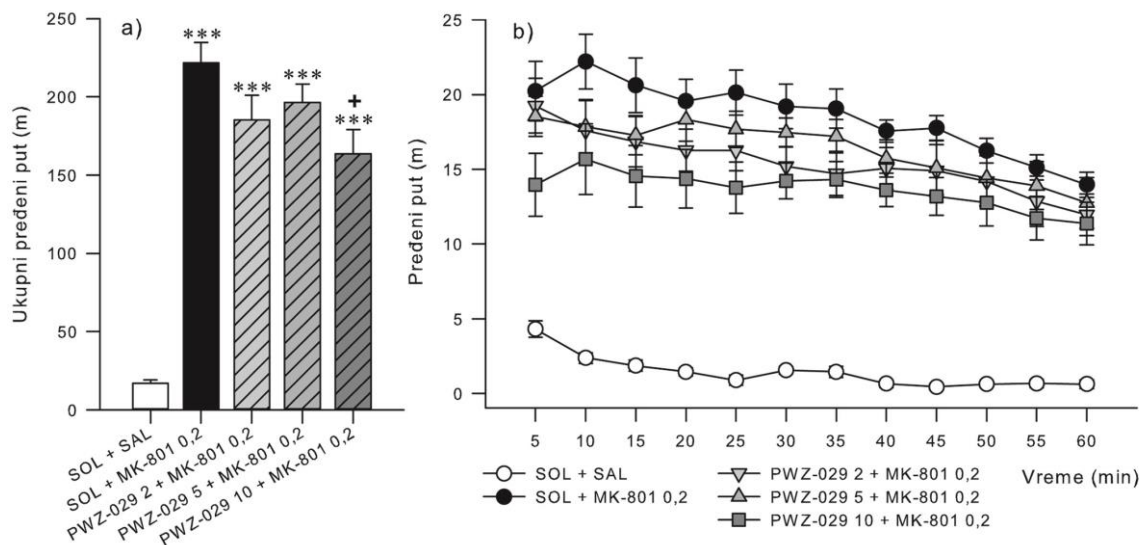
Statistička analiza petominutnih intervala za oba praćena parametra prikazana je u Tabeli 25.

Tabela 25. Rezultati statističke analize uticaja PWZ-029 (5 i 20 mg/kg) i 0,2 mg/kg MK-801 na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 30 minuta u testu lokomotorne aktivnosti.

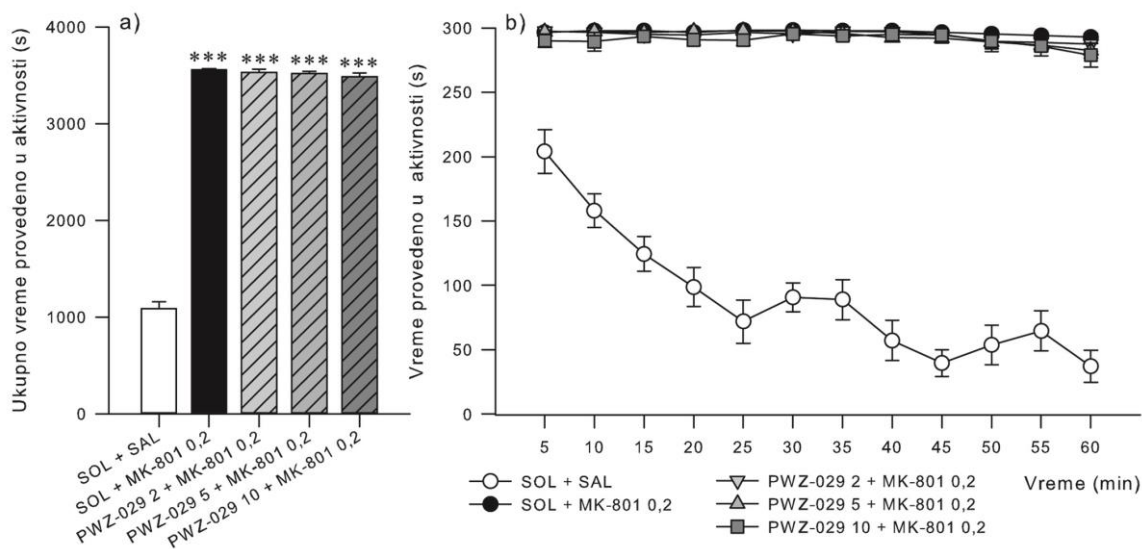
	Faktori	Vreme provedeno u aktivnosti (s)	
		Pređeni put (m)	
		Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem	
	Tretman, F(3,33); p	13,29; <0,001	9,67; <0,001
	Vreme, F(5,165); p	21,75; <0,001	17,47; <0,001
	Interakcija, F(15,165); p	1,69; 0,057	8,73; <0,001
<i>Tretman</i>		SNK post hoc (p)	
	SOL+SAL vs. SOL+MK 0,2	<0,001	<0,001
	PWZ 5+MK 0,2 vs. SOL+SAL	0,001	0,001
	PWZ 20+MK 0,2 vs. SOL+SAL	0,001	0,001
	PWZ 5+MK 0,2 vs. SOL+MK 0,2	0,048	nz
	PWZ 20+MK 0,2 vs. SOL+MK 0,2	0,047	nz
	<i>Vreme</i>	Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(4,35); p)	
	5 min	–	3,58; 0,024
	10 min	–	4,08; 0,014
	15 min	–	6,85; 0,001
	20 min	–	5,30; 0,004
	25 min	–	8,26; <0,001
	30 min	–	17,94; <0,001
MK 0,2=0,2 mg/kg MK-801; PWZ 5=5 mg/kg PWZ-029; PWZ 20=20 mg/kg PWZ-029; nz=nije statistički značajno			

4.2.13 Eksperiment 13

U cilju potvrđivanja uticaja PWZ-029 na efekte 0,2 mg/kg MK-801 sproveden je eksperiment sa tri doze PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) u trajanju od 60 minuta. Jednofaktorska ANOVA za ukupni pređeni put bila je statistički značajna ($F(4,38)=42,34$; $p<0,001$). Istom analizom ukupnog vremena provedenog u aktivnosti dobija se vrednost za faktor tretman: $F(4,38)=721,30$; $p<0,001$. *Post hoc* SNK analiza pređenog puta (Slika 37a) otkrila je antagonistički efekat dodatka 10 mg/kg PWZ-029 u odnosu na samu MK-801 grupu (smanjenje hiperlokomotorne aktivnosti), ali *post hoc* analiza prikazana na Slici 38a jasno pokazuje snažan uticaj MK-801 na vreme koje životinja provodi u aktivnosti i nemogućnost tretmana sa PWZ-029 da ovakav efekat ublaži.



Slika 37. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i MK-801 0,2 mg/kg na a) ukupni pređeni put pacova tokom 60 minuta i b) pređeni put u petominutnim intervalima. *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL), + $p < 0,05$ u odnosu na 0,2 mg/kg MK-801 (SOL+MK-801 0,2). Broj životinja u grupama: 9, 8, 9, 9, 8.



Slika 38. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i MK-801 0,2 mg/kg na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti tokom 60 minuta i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima. *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL). Broj životinja u grupama: 9, 8, 9, 9, 8.

U Tabeli 26 su dati rezultati statističke analize ova dva parametra po petominutnim intervalima.

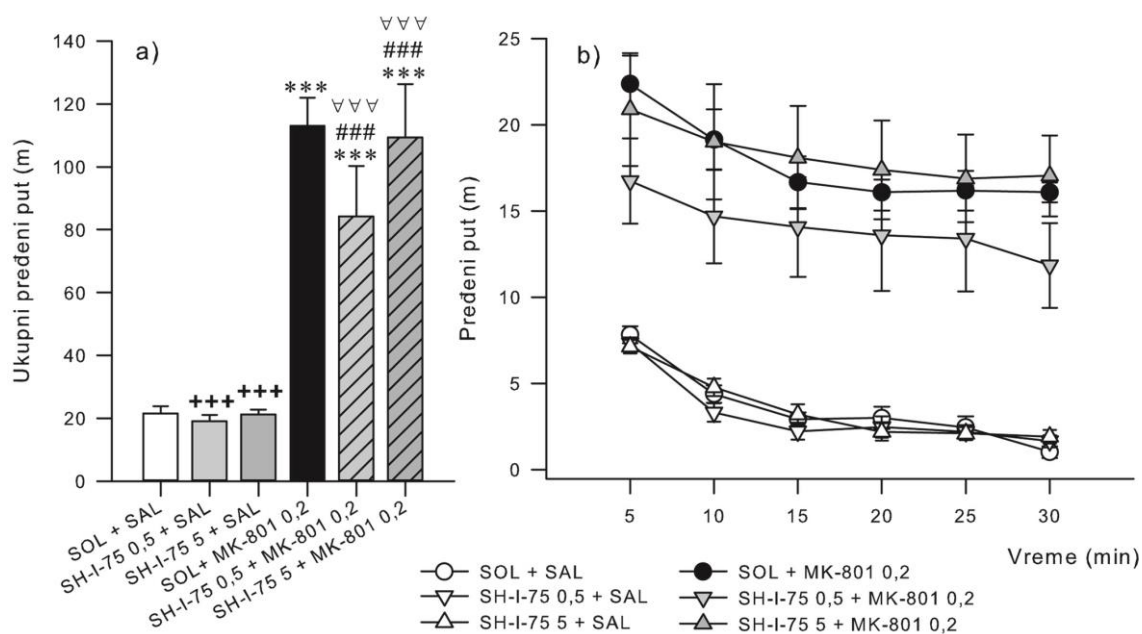
Tabela 26. Rezultati statističke analize uticaja PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,2 mg/kg MK-801 na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 60 minuta u testu lokomotorne aktivnosti.

	<i>Faktori</i>	Vreme provedeno u	
		Pređeni put (m)	aktivnosti (s)
Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem			
	Tretman, F(4,38); p	42,34; <0,001	721,17; <0,001
	Vreme, F(11,418); p	15,51; <0,001	13,71; <0,001
	Interakcija, F(44,418); p	0,96; 0,547	10,06; <0,001
SNK post hoc (p)			
	<i>Tretman</i>		
	SOL+SAL vs. SOL+MK 0,2	<0,001	<0,001
	PWZ 2+MK 0,2 vs. SOL+SAL	<0,001	<0,001
	PWZ 5+MK 0,2 vs. SOL+SAL	<0,001	<0,001
	PWZ 10+MK 0,2 vs. SOL+SAL	<0,001	<0,001
	PWZ 10+MK 0,2 vs. SOL+MK 0,2	0,012	nz
Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(4,38); p)			
	<i>Vreme</i>		
	5 min	–	25,60; <0,001
	10 min	–	83,22; <0,001
	15 min	–	133,84; <0,001
	20 min	–	145,67; <0,001
	25 min	–	159,05; <0,001
	30 min	–	293,39; <0,001
	35 min	–	156,26; <0,001
	40 min	–	203,38; <0,001
	45 min	–	445,13; <0,001
	50 min	–	151,92; <0,001
	55 min	–	129,14; <0,001
	60 min	–	195,31; <0,001
MK 0,2=0,2 mg/kg MK-801; PWZ 2=2 mg/kg PWZ-029; PWZ 5=5 mg/kg PWZ-029; PWZ 10=10 mg/kg PWZ-029; nz=nije statistički značajno			

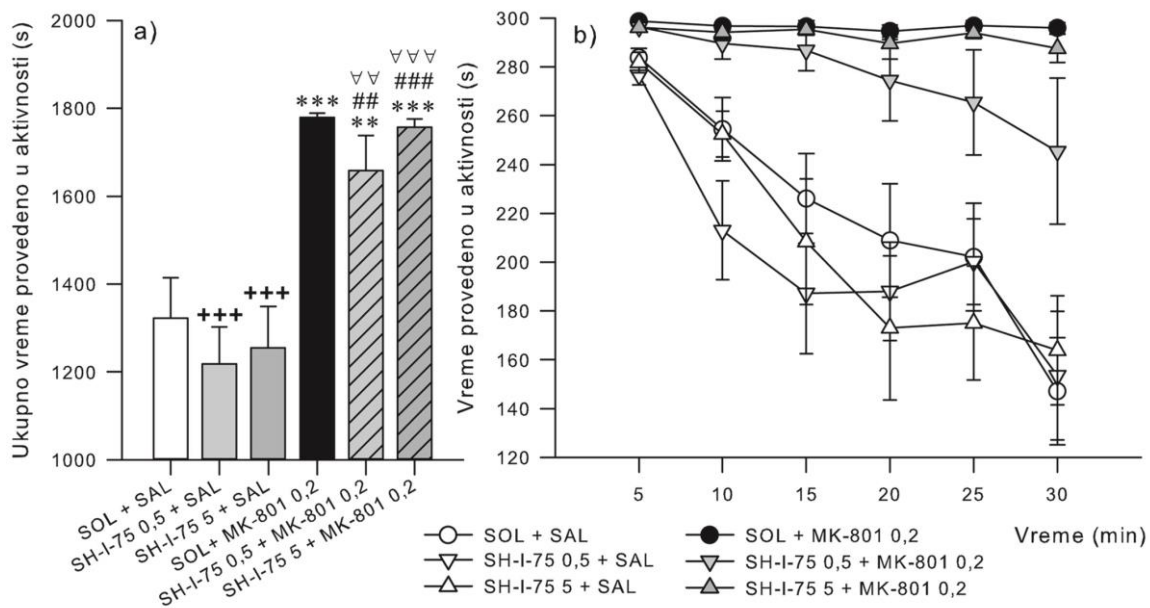
4.2.14 Eksperiment 14

U eksperimentu sa SH-I-75 praćen je uticaj ovog pozitivnog modulatora na promene ponašanja izazvane tretmanom sa MK-801. Jednofaktorska ANOVA je bila značajna za faktor tretman tokom 30 minuta praćenja za ukupni pređeni put i vreme provedeno u aktivnosti ($F(5,53)=18,97$; $p<0,001$ i $F(5,53)=12,44$; $p<0,001$; redom). *Post hoc* SNK testovi su dati na Slici 39a i 40a i jasno upućuju na nemogućnost smanjivanja hiperlokomotorne aktivnosti i velikog ukupnog vremena aktivnosti izazvanih primenom 0,2

mg/kg MK-801. U odnosu na kontrolnu grupu, pri primenjenim dozama nije došlo do promena lokomotorne aktivnosti kod grupa koje su primale samo SH-I-75.



Slika 39. Uticaj SH-I-75 (0,5 i 5 mg/kg) i MK-801 0,2 mg/kg na a) ukupni pređeni put pacova tokom 60 minuta i b) pređeni put u petominutim intervalima. *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom (SOL+SAL) grupom, +++ $p < 0,001$ u poređenju sa 0,2 mg/kg MK-801 (SOL+MK-801 0,2) grupom, ### $< 0,001$ u poređenju sa 0,5 mg/kg SH-I-75 (SH-I-75 0,5+SAL) grupom i ∇∇∇ $< 0,001$ u poređenju sa 5 mg/kg SH-I-75 (SH-I-75 5+SAL) grupom. Broj životinja u grupama: 10, 10, 10, 9, 10, 10.



Slika 40. Uticaj SH-I-75 (0,5 i 5 mg/kg) i MK-801 0,2 mg/kg na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti tokom 60 minuta i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima. ** $p < 0,01$ i * $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom (SOL+SAL) grupom, +++ $p < 0,001$ u poređenju sa 0,2 mg/kg MK-801 (SOL+MK-801 0,2) grupom, ## $< 0,01$ i ### $< 0,001$ u poređenju sa 0,5 mg/kg SH-I-75 (SH-I-75 0,5+SAL) grupom, ∇∇ $< 0,01$ i ∇∇∇ $< 0,001$ u poređenju sa 5 mg/kg SH-I-75 (SH-I-75 5+SAL) grupom. Broj životinja u grupama: 10, 10, 10, 9, 10, 10.**

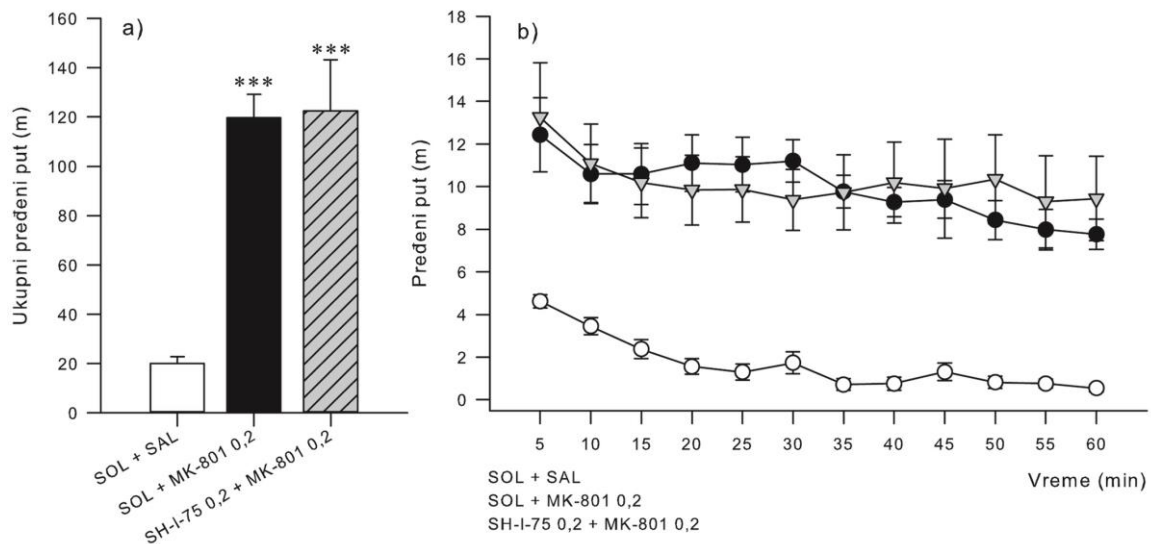
U Tabeli 27 su date vrednosti dvofaktorske ANOVA-e sa ponavljanjem za oba parametra posmatrajući promene u petominutnim intervalima.

Tabela 27. Rezultati statističke analize uticaja PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,2 mg/kg MK-801 na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 60 minuta u testu lokomotorne aktivnosti.

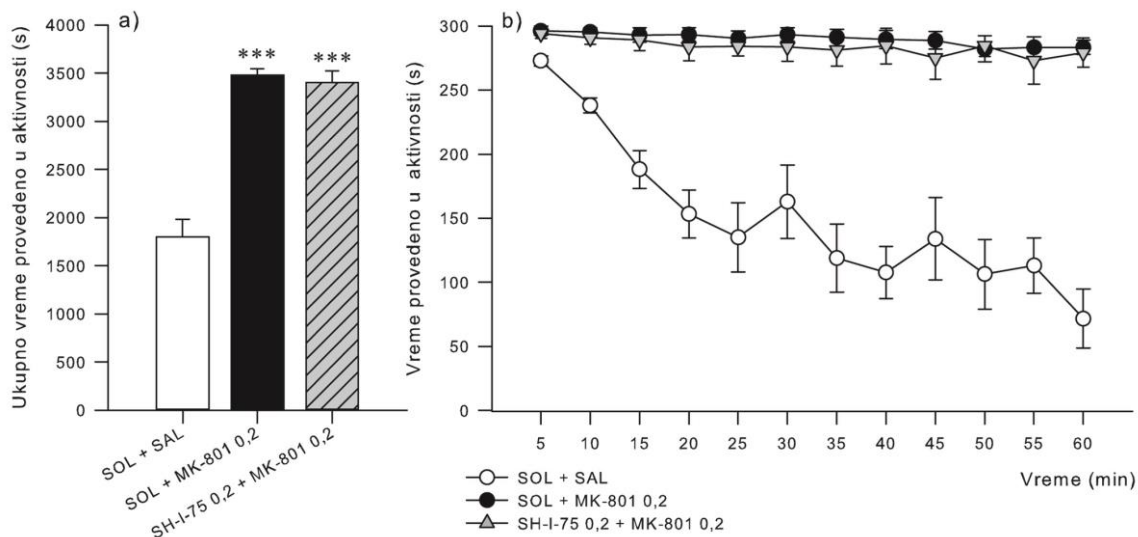
	Faktori	Vreme provedeno u aktivnosti (s)	
		Pređeni put (m)	
		Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem	
	Tretman, F(5,53); p	18,97; <0,001	12,44; <0,001
	Vreme, F(5,265); p	56,61; <0,001	29,77; <0,001
	Interakcija, F(25,265); p	0,79; 0,758	4,13; <0,001
<i>Tretman</i>		SNK post hoc (p)	
	SOL+SAL vs. SOL+MK	<0,001	<0,001
	SH-75 0,5+MK vs. SOL+SAL	<0,001	0,002
	SH-75 5+MK 0,2 vs. SOL+SAL	<0,001	<0,001
	SH-75 0,5+MK vs. SOL+MK	nz	nz
	SH-75 0,5+SAL vs. SOL+MK	<0,001	<0,001
	SH-75 5+SAL vs. SOL+MK	<0,001	<0,001
	SH-75 0,5+MK vs. SH-75 5+MK	nz	nz
	SH-75 0,5+MK vs. SH-75 0,5+SAL	<0,001	0,001
	SH-75 0,5+MK vs. SH-75 5+SAL	<0,001	0,001
	SH-75 5+MK vs. SH-75 0,5+SAL	<0,001	<0,001
	SH-75 5+MK vs. SH-75 5+SAL	<0,001	<0,001
		Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(4,35); p)	
	Vreme		
	5 min	–	9,22; <0,001
	10 min	–	8,74; <0,001
	15 min	–	8,10; <0,001
	20 min	–	7,97; <0,001
	25 min	–	8,89; <0,001
	30 min	–	10,42; <0,001
MK=0,2 mg/kg MK-801; SH-75 0,5=0,5 mg/kg SH-I-75; SH-75 5=5 mg/kg SH-I-75; nz=nije statistički značajno			

4.2.15 Eksperiment 15

Radi detaljnijeg ispitivanja uticaja SH-I-75 u dozi od 0,2 mg/kg na promene ponašanja izazvane delovanjem MK-801 na lokomotornu aktivnost dodatno je sproveden eksperiment u kome je trajanje testa produženo na 60 minuta. Jednofaktorska ANOVA za tretman bila je značajna za oba praćena parametra: pređeni put – F(2,24)=19,30; p<0,001; vreme provedeno u aktivnosti – F(2,24)=50,67; p<0,001. Na Slici 41 i 42 su date vrednosti *post hoc* SNK testova.



Slika 41. Uticaj SH-I-75 (0,2 mg/kg) i MK-801 (0,2 mg/kg) na a) ukupni pređeni put pacova tokom 60 minuta i b) pređeni put u petominutnim intervalima. * $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 9.**



Slika 42. Uticaj SH-I-75 (0,2 mg/kg) i MK-801 (0,2 mg/kg) na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti tokom 60 minuta i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima. * $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 9.**

U Tabeli 28 su prikazane vrednosti statističke analize petominutnih intervala.

Tabela 28. Rezultati statističke analize uticaja SH-I-75 (0,2 mg/kg) i 0,2 mg/kg MK-801 na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku petominutnih intervala u testu lokomotorne aktivnosti.

	<i>Faktori</i>	Vreme provedeno u aktivnosti (s)	
		Pređeni put (m)	Pređeni put (m)
Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem			
	Tretman, F(2,24); p	19,30; <0,001	50,67; <0,001
	Vreme, F(11,264); p	7,34; <0,001	13,34; <0,001
	Interakcija, F(22,264); p	0,87; 0,637	8,68; <0,001
SNK post hoc (p)			
	<i>Tretman</i>		
	SOL+SAL vs. SOL+MK 0,2	<0,001	<0,001
	SH-I-75 0,2+MK 0,2 vs. SOL+SAL	<0,001	<0,001
	SH-I-75 0,2+MK 0,2 vs. SOL+MK 0,2	nz	nz
Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(4,38); p)			
	<i>Vreme</i>		
	5 min	–	11,96; <0,001
	10 min	–	39,82; <0,001
	15 min	–	34,08; <0,001
	20 min	–	37,25; <0,001
	25 min	–	28,32; <0,001
	30 min	–	16,45; <0,001
	35 min	–	30,95; <0,001
	40 min	–	48,45; <0,001
	45 min	–	16,28; <0,001
	50 min	–	34,54; <0,001
	55 min	–	31,00; <0,001
	60 min	–	62,87; <0,001
MK 0,2=0,2 mg/kg MK-801; SH-I-75 0,2=0,2 mg/kg SH-I-75; nz=nije statistički značajno			

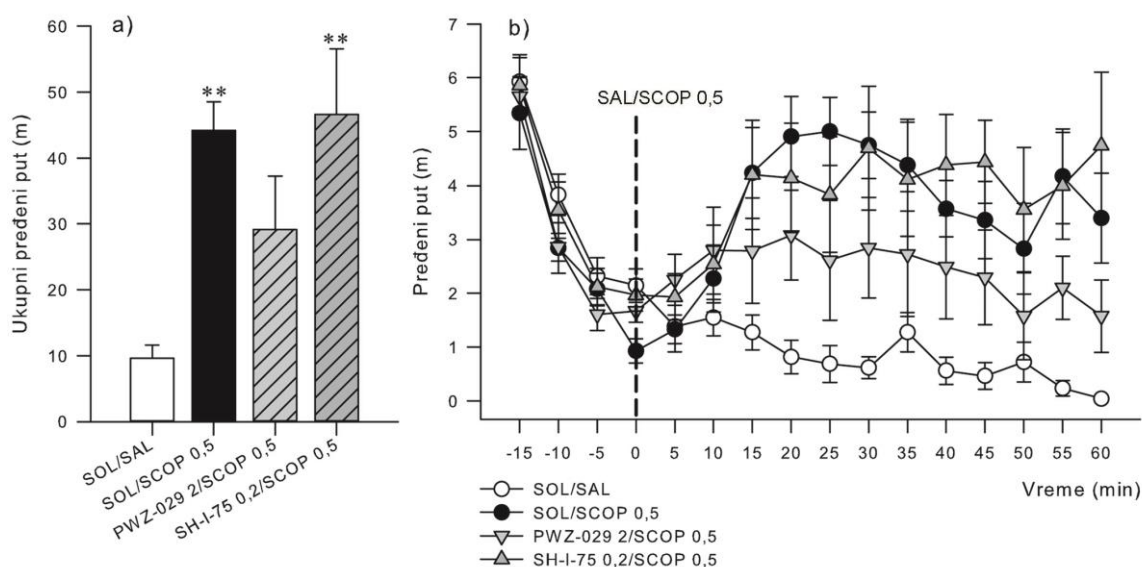
4.2.16 Eksperiment 16

Efekat 2 mg/kg PWZ-029 i 0,2 mg/kg SH-I-75 na lokomotornu aktivnost u toku 20 minuta dat je u Tabeli 29. Jednofaktorska ANOVA nije otkrila statistički značajne razlike između grupa za posmatrane parametre.

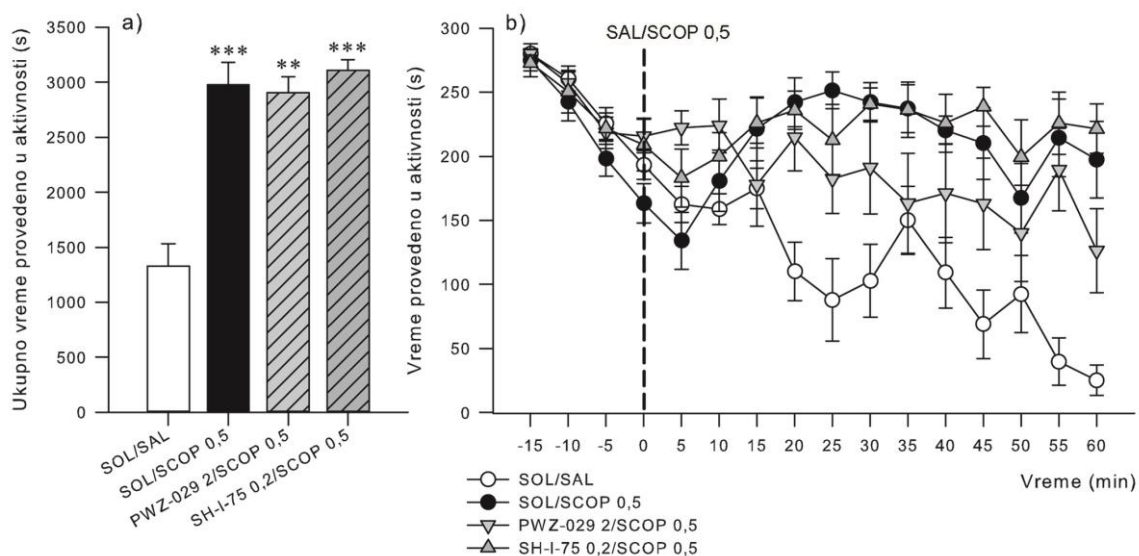
Tabela 29. Uticaj PWZ-029 (2 mg/kg) i SH-I-75 (0,2 mg/kg) na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku 20 minuta u testu lokomotorne aktivnosti i vrednosti statistike za date parametre. Svaki podatak predstavlja srednju vrednost \pm SD (N = 8).

<i>Tretman</i>	Pređeni put (m)	Vreme provedeno u aktivnosti (s)
SOL	14,21 \pm 3,67	958,99 \pm 89,54
PWZ-029 2	11,79 \pm 2,36	970,93 \pm 82,41
SH-I-75 0,2	13,48 \pm 3,98	953,96 \pm 137,76
Jednofaktorska ANOVA	F(2,21)=1,07 p=0,361	F(4,31)=0,05 p=0,948

S druge strane, nakon primene skopolamina, jednofaktorska ANOVA je pokazala značajnost uticaja tretmana na pređeni put: $F(3,28)=6,16$; $p=0,002$; *post hoc* SNK test je prikazan na Slici 43a. Značajnost je postignuta i za ukupno vreme provedeno u aktivnosti ($F(3,28)=12,71$; $p<0,001$), s time što je po ovom parametru prethodna primena PWZ-029 bila nedovoljna da izostane značajnost razlike tokom 60 minuta praćenja aktivnosti pod dejstvom skopolamina u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 44a).



Slika 43. Uticaj 2 mg/kg PWZ-029; 0,2 mg/kg SH-I-75 i 0,5 mg/kg skopolamina na a) ukupni pređeni put pacova tokom 60 minuta i b) pređeni put u petominutnim intervalima. ** $p<0,01$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.



Slika 44. Uticaj 2 mg/kg PWZ-029; 0,2 mg/kg SH-I-75 i 0,5 mg/kg skopolaminana na a) ukupno vreme provedeno u aktivnosti tokom 60 minuta i b) vreme provedeno u aktivnosti u petominutnim intervalima. * $p < 0,001$ i ** $p < 0,01$ u poređenju sa kontrolnom grupom (SOL+SAL). Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.**

U Tabeli 30 su prikazane vrednosti statističke analize petominutnih intervala.

Tabela 30. Rezultati statističke analize uticaja 2 mg/kg PWZ-029; 0,2 mg/kg SH-I-75 i 0,5 mg/kg skopolamina na pređeni put (m) i vreme provedeno u aktivnosti (s) u toku petominutnih intervala u testu lokomotorne aktivnosti.

<i>Faktori</i>	Vreme provedeno u	
	Pređeni put (m)	aktivnosti (s)
Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem		
Tretman, F(3,28); p	6,16; 0,002	12,71; <0,001
Vreme, F(11,308); p	3,16; <0,001	3,15; <0,001
Interakcija, F(33,308); p	1,75; 0,008	2,39; <0,001
<i>Tretman</i>	SNK post hoc (p)	
SOL+SAL vs. SOL+SCOP	0,004	<0,001
PWZ 2+SCOP vs. SOL+SAL	nz	0,001
SH-I-75 0,2+SCOP vs. SOL+SAL	0,004	<0,001
PWZ 2+SCOP vs. SOL+SCOP	nz	nz
PWZ 2+SCOP vs. SH-I-75 0,2+SCOP	nz	nz
<i>Vreme</i>	Jednofaktorska ANOVA po intervalima (F(3,28); p)	
5 min	1,13; 0,355	3,98; 0,018
10 min	0,69; 0,564	2,05; 0,129
15 min	2,83; 0,056	1,30; 0,294
20 min	5,31; 0,005	8,42; <0,001
25 min	4,67; 0,009	7,15; 0,001
30 min	5,83; 0,003	6,93; 0,001
35 min	2,46; 0,083	2,85; 0,056
40 min	5,11; 0,006	4,06; 0,016
45 min	5,92; 0,003	7,38; 0,001
50 min	2,25; 0,104	2,10; 0,123
55 min	6,44; 0,002	10,32; <0,001
60 min	5,65; 0,004	12,55; <0,001
SCOP=0,5 mg/kg skopolamina; PWZ 2=2 mg/kg PWZ-029; SH-I-75 0,2=0,2 mg/kg SH-I-75; nz=nije statistički značajno		

4.3 Test prepoznavanja novog objekta

Rezultati statističke analize za svih pet eksperimenata u testu prepoznavanja novog objekta dati su u Tabelama 31 i 32.

Tabela 31. Rezultati statističke analize uticaja ispitivanih liganda na vreme istraživanja objekta u T1 i vreme istraživanja novog i poznatog objekta u T2 u testu prepoznavanja novog objekta. MK-801 0,05=0,05 mg/kg MK-801; MK-801 0,1=0,1 mg/kg MK-801; MK-801 0,2=0,2 mg/kg MK-801; SCOP 0,1=0,1 mg/kg skopolamina; SCOP 0,3=0,3 mg/kg skopolamina; SCOP 1=1 mg/kg skopolamina; PWZ-029 2=2 mg/kg PWZ-029; PWZ-029 5=5 mg/kg PWZ-029; PWZ-029 10=10 mg/kg PWZ-029; SAL=fiziološki rastvor; SOL=rastvarač; nz=nije statistički značajno; T1=5 minuta; T2=3 minuta

<i>Tretman</i>	Vreme u istraživanju objekta A i B u T1 (s)	Vreme u istraživanju novog i poznatog objekta u T2 (s)
Eksperiment I	t-test sa uparenim uzorcima	
SAL + SOL	t(9)=-1,14; p=0,282	t(9)=-1,26; p=0,238
SCOP 0,3 + SOL	t(9)=0,09; p=0,931	t(9)=0,11; p=0,915
SAL + DMCM 0,25	t(9)=-0,58; p=0,575	t(9)=-0,68; p=0,514
SAL +PWZ-029 2	t(9)=-0,77; p=0,463	t(9)=-5,88; p <0,001
SAL +PWZ-029 5	t(9)=0,86; p=0,412	t(9)=-2,71; p=0,024
SAL +PWZ-029 10	t(9)=-0,50; p=0,632	t(9)=-3,53; p=0,006
Eksperiment II	t-test sa uparenim uzorcima	
SAL	t(6)=0,70; p=0,512	t(6)=-2,70; p=0,035
MK-801 0,05	t(5)=-1,53; p=0,187	t(5)=-2,31; p=0,069
MK-801 0,1	t(6)=-2,22; p=0,068	t(6)=0,40; p=0,704
MK-801 0,2	t(5)=-0,41; p=0,700	t(5)=-0,96; p=0,383
Eksperiment III	t-test sa uparenim uzorcima	
SAL + SOL	t(22)=-1,00; p=0,328	t(22)=2,38; p=0,026
MK-801 0,1 + SOL	t(19)=0,83; p=0,415	t(19)=1,44; p=0,165
MK-801 0,1 +PWZ-029 2	t(15)=-1,34; p=0,199	t(15)=-0,44; p=0,669
MK-801 0,1 +PWZ-029 5	t(16)=0,18; p=0,857	t(16)=3,49; p=0,003
MK-801 0,1 +PWZ-029 10	t(18)=-1,55; p=0,139	t(18)=0,94; p=0,357
Eksperiment IV	t-test sa uparenim uzorcima	
SAL	t(7)=0,80; p=0,450	t(7)=-2,65; p=0,033
DZP 2	t(9)=-0,67; p=0,520	t(9)=-1,82; p=0,102
SCOP 0,1	t(9)=-0,28; p=0,789	t(9)=-2,10; p=0,065
SCOP 0,3	t(7)=1,18; p=0,278	t(7)=1,22; p=0,261
SCOP 1	t(8)=-0,21; p=0,836	t(8)=-0,28; p=0,783
Eksperiment V	t-test sa uparenim uzorcima	
SAL + SOL	t(11)=-0,76; p=0,462	t(11)=-2,28; p=0,044
SCOP 0,3 + SOL	t(13)=1,30; p=0,216	t(13)=-0,82; p=0,428
SCOP 0,3 +PWZ-029 2	t(14)=0,73; p=0,477	t(14)=-3,11; p=0,008
SCOP 0,3 +PWZ-029 5	t(14)=-0,05; p=0,962	t(14)=-1,27; p=0,224
SCOP 0,3 +PWZ-029 10	t(13)=1,84; p=0,089	t(13)=-1,62; p=0,129

Tabela 32. Rezultati jednofaktorske ANOVA-e uticaja ispitivanih liganda na ukupno vreme istraživanja objekta u T1 i T2 (s), ukupni pređeni put u T1 i T2 (m) i brzinu kretanja u T1 i T2 u testu prepoznavanja novog objekta. T1=5 minuta; T2=3 minuta

<i>Tretman</i>	Ukupno vreme u istraživanju objekata (s)		Ukupni pređeni put (m)		Brzina kretanja (m/s)	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Eksperiment I	Jednofaktorska ANOVA					
F(5,54)	0,47	1,20	1,75	2,87	1,78	2,88
p	0,794	0,321	0,138	0,023	0,133	0,022
Eksperiment II	Jednofaktorska ANOVA					
F(3,22)	0,78	1,65	5,67	2,77	5,68	2,73
p	0,516	0,206	0,005	0,065	0,005	0,068
Eksperiment III	Jednofaktorska ANOVA					
F(4,90)	6,05	0,96	2,50	3,91	2,53	3,95
p	<0,001	0,435	0,048	0,006	0,046	0,005
Eksperiment IV	Jednofaktorska ANOVA					
F(4,40)	1,27	1,91	10,54	3,41	10,62	3,41
p	0,299	0,127	<0,001	0,017	<0,001	0,017
Eksperiment V	Jednofaktorska ANOVA					
F(4,65)	3,46	3,17	0,20	0,84	0,21	0,88
p	0,013	0,019	0,939	0,503	0,930	0,482

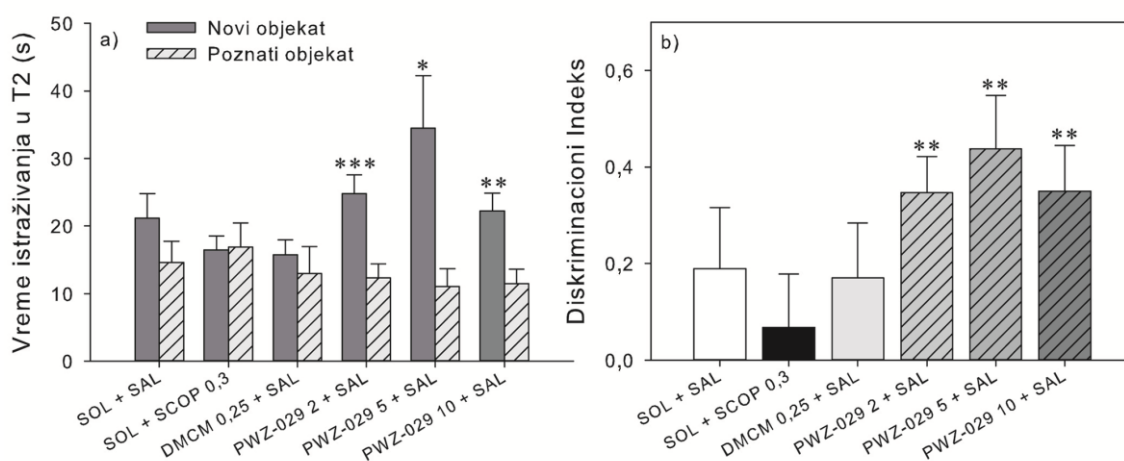
4.3.1 Eksperiment 1

Korišćenjem t-testa sa uparenim uzorcima pokazana je značajnost u okviru pojedinih grupa u T2, bez efekta na istraživanje objekata u toku faze familijarizacije, T1 (Tabela 31). Jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan efekat tretmana na ukupni pređeni put i brzinu kretanja u T2 (parametri koji se mogu povezati sa opštom aktivnošću životinje), dok je bila bez značaja za ostale prikazane parametre (Tabela 32). *Post hoc* SNK test je pokazao da grupa koja je primala 5 mg/kg PWZ-029 ispoljava sporije kretanje od grupe koja je primila skopolamin 0,3 mg/kg (Slika 46b), dok je za pređeni put postojao statistički trend ($p=0,052$; Slika 46a). Statistički trend se primećuje i kod kontrolne grupe i one koja je bila pod uticajem 5 mg/kg PWZ-029 za oba parametra (za pređeni put $p=0,063$; za brzinu kretanja $p=0,064$). Parametri koji opisuju uticaj tretmana na prepoznavanje novog objekta bili su značajni za grupe koje su kao tretman primile PWZ-029 u svim ispitivanim dozama: t-test sa uparenim uzorcima za vreme provedeno u istraživanju novog i poznatog objekta dat je u Tabeli 27 (Slika 45a); one-sample t-test za diskriminacioni indeks je prikazan u Tabeli

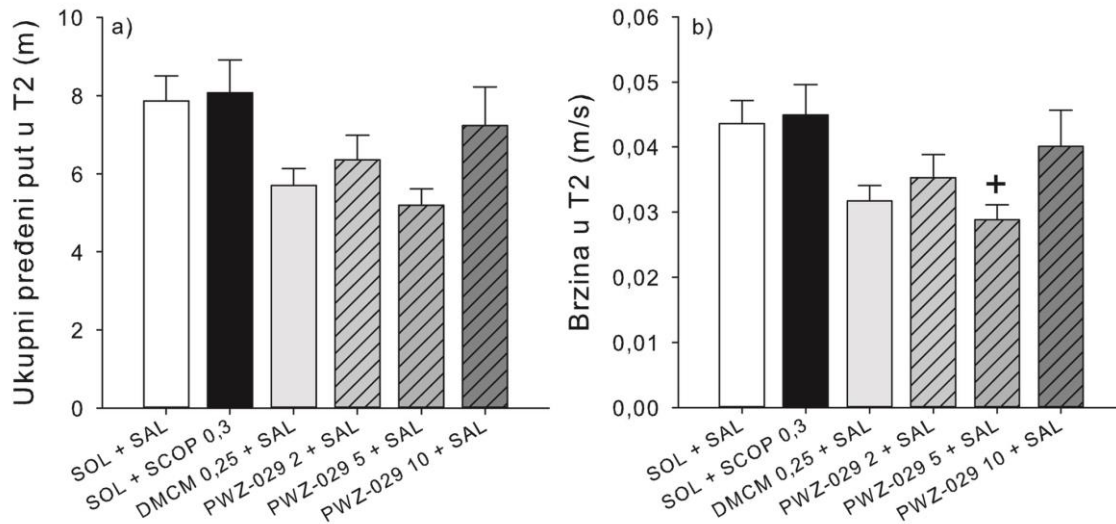
33 (Slika 45b). Na osnovu datih parametara, prokognitivni efekat je primećen samo kod grupa tretiranih sa PWZ-029, dok životinje iz drugih grupa nisu bile sposobne da nakon 24 h prepoznaju novi objekat.

Tabela 33. Rezultati statistike za diskriminacioni indeks u eksperimentu ispitivanja uticaja skopolamina (0,3 mg/kg), DMCM (0,25 mg/kg) i PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg).

<i>Tretman</i>	Diskriminacioni Indeks
	One-Sample t-test
SAL + SOL	t(9)=1,48; p=0,171
SCOP 0,3 + SOL	t(9)=0,61; p=0,559
SAL + DMCM 0,25	t(9)=1,49; p=0,171
SAL +PWZ-029 2	t(9)=4,62; p=0,001
SAL +PWZ-029 5	t(9)=3,97; p=0,003
SAL +PWZ-029 10	t(9)=3,67; p=0,005



Slika 45. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg), DMCM (0,25 mg/kg) i 0,3 mg/kg skopolamina na a) vreme istraživanja novog i poznatog objekta u T2 i b) diskriminacioni indeks. *p<0,05; **p<0,01 i *p<0,001 prema t-testu sa uparenim uzorcima za vreme istraživanja novog i poznatog objekta; **p<0,01 u odnosu na hipotetičku vrednost 0 (one-sample t-test) za diskriminacioni indeks. Broj životinje u svakoj grupi bio je 10.**



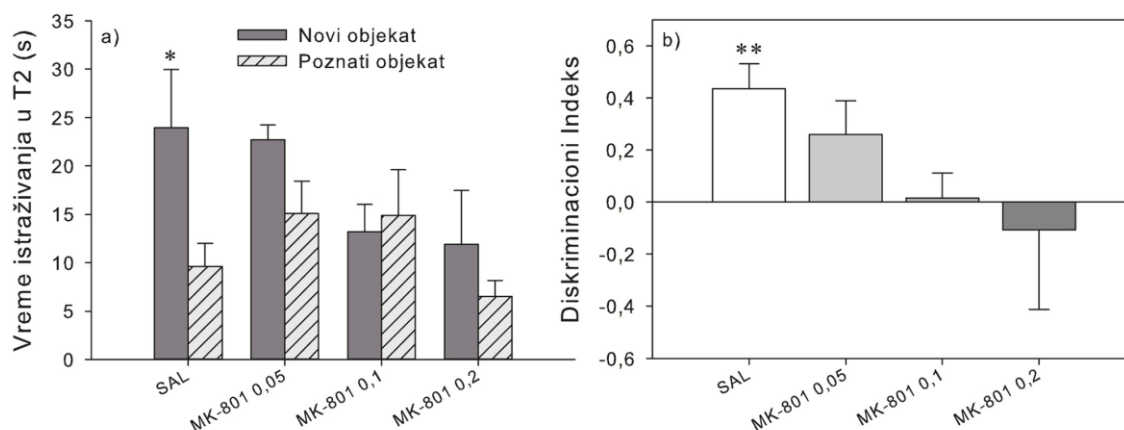
Slika 46. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg), DMCM (0,25 mg/kg) i 0,3 mg/kg skopolamina na a) ukupni pređeni put u T2 i b) brzinu kretanja u T2. + $p < 0,05$ u odnosu na skopolamin (SOL+SCOP 0,3) grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 10.

4.3.2 Eksperiment 2

Korišćenjem t-testa sa uparenim uzorcima pokazan je statistički značajan efekat samo za kontrolnu grupu (Tabela 31; Slika 47a), dok je primećen trend za grupu 0,05 mg/kg MK-801 ($p=0,069$). U Tabeli 34 date su vrednosti statistike za diskriminacioni indeks, po kome je jedino u kontrolnoj grupi došlo do prepoznavanja novog objekta (Slika 47b).

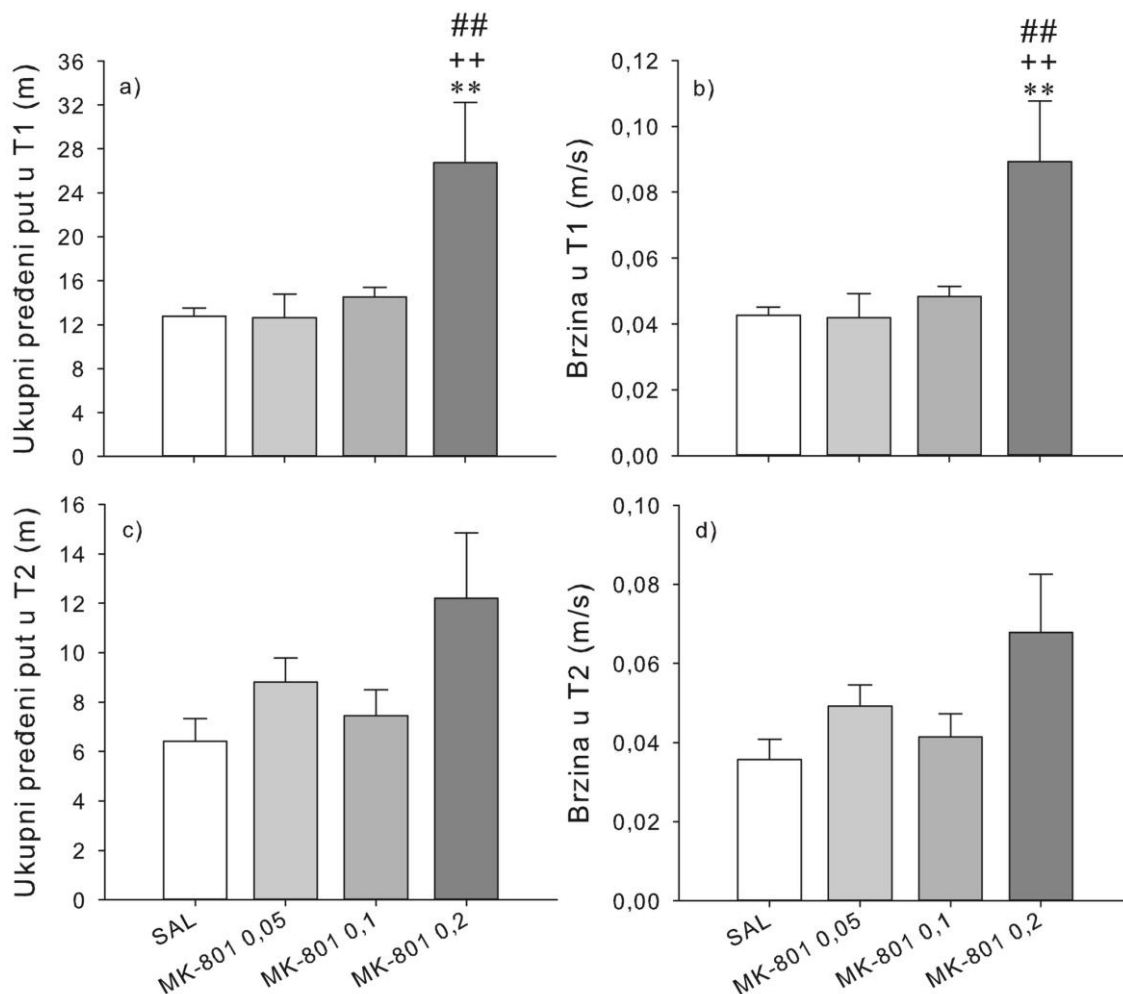
Tabela 34. Rezultati statistike za diskriminacioni indeks u eksperimentu ispitivanja uticaja MK-801 (0,05; 0,1 i 0,2 mg/kg).

<i>Tretman</i>	Diskriminacioni indeks
	One-Sample t-test
SAL	$t(6)=4,48; p=0,004$
MK-801 0,05	$t(5)=1,99; p=0,103$
MK-801 0,1	$t(6)=0,15; p=0,882$
MK-801 0,2	$t(5)=-0,35; p=0,738$



Slika 47. Uticaj MK-801 (0,05; 0,1 i 0,2 mg/kg) na a) vreme istraživanja novog i poznatog objekta u T2 i b) diskriminacioni indeks. * $p < 0,05$ prema t-testu sa uparenim uzorcima za vreme istraživanja; ** $p < 0,01$ u odnosu na hipotetičku vrednost 0 (one-sample t-test) za diskriminacioni indeks. Broj životinja u grupama: 7, 6, 7, 6.

Oba parametra opšte aktivnosti (ukupni pređeni put i brzina kretanja (Tabela 32) bila su statistički značajna za T1. SNK *post hoc* testovi su prikazani na Slici 48a i 48b: grupa koja je primila 0,2 mg/kg MK-801 prelazila je duži put i bila je brža od svih ostalih grupa. Ovo pokazuje da MK-801 u dozi od 0,2 mg/kg pored umanjenja kognitivnih sposobnosti izaziva i promene u opštoj aktivnosti životinje u testu prepoznavanja novog objekta. Jednofaktorska ANOVA za iste parametre u T2 nije bila statistički značajna (Tabela 32, Slika 48c i 48d). Na osnovu ovih rezultata se zaključuje da doza od 0,1 mg/kg MK-801 može selektivno da ošteti kognitivnu sposobnost u testu prepoznavanja novog objekta, bez sporednih nekognitivnih poremećaja.



Slika 48. Uticaj MK-801 (0,05; 0,1 i 0,2 mg/kg) na a) ukupni pređeni put u T1, b) brzinu kretanja u T1, c) ukupni pređeni put u T2 i d) brzinu kretanja u T2. ****** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu (SAL) grupu, **++** $p < 0,01$ u odnosu na 0,05 mg/kg MK-801 (MK-801 0,05) grupu, **##** $p < 0,01$ u odnosu na 0,1 mg/kg MK-801 (MK-801 0,1) grupu. Broj životinja u grupama: 7, 6, 7, 6.

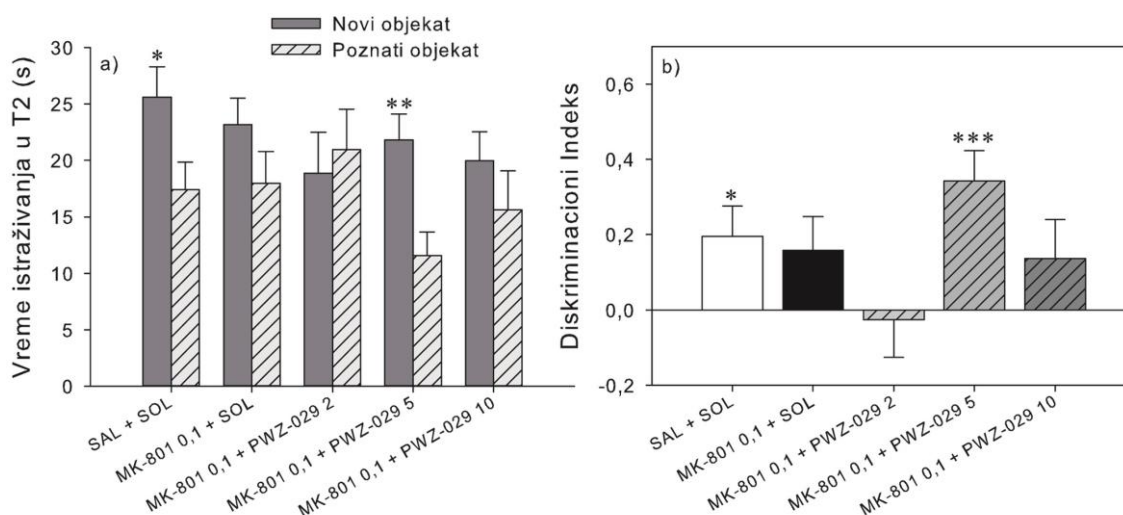
4.3.3 Eksperiment 3

U Tabeli 35 prikazani su rezultati statističke analize za diskriminacioni indeks. Uočavaju se statistički značajne razlike kod kontrolne (SAL+SOL) grupe i kombinacije MK-801 i PWZ-029 5 mg/kg (MK-801 0,1+PWZ-029 5); Slika 49b. Tabela 31 i Slika 49a prikazuju drugi parametar kognitivne sposobnosti u testu prepoznavanja novog objekta, vremena istraživanja novog i poznatog objekta u T2, čijom analizom se može doći do istog zaključka kao i posmatranjem parametra diskriminacioni indeks: jedini tretman koji se ponaša kao i

kontrolna grupa i koji poništava oštećujući efekat MK-801 na kognitivnu sposobnost jeste srednja doza PWZ-029 (5 mg/kg), što ukazuje na doznu zavisnost farmakološke aktivnosti u obliku obrnutog slova „U”.

Tabela 35. Rezultati statistike za diskriminacioni indeks u eksperimentu ispitivanja uticaja MK-801 (0,1 mg/kg) i PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg).

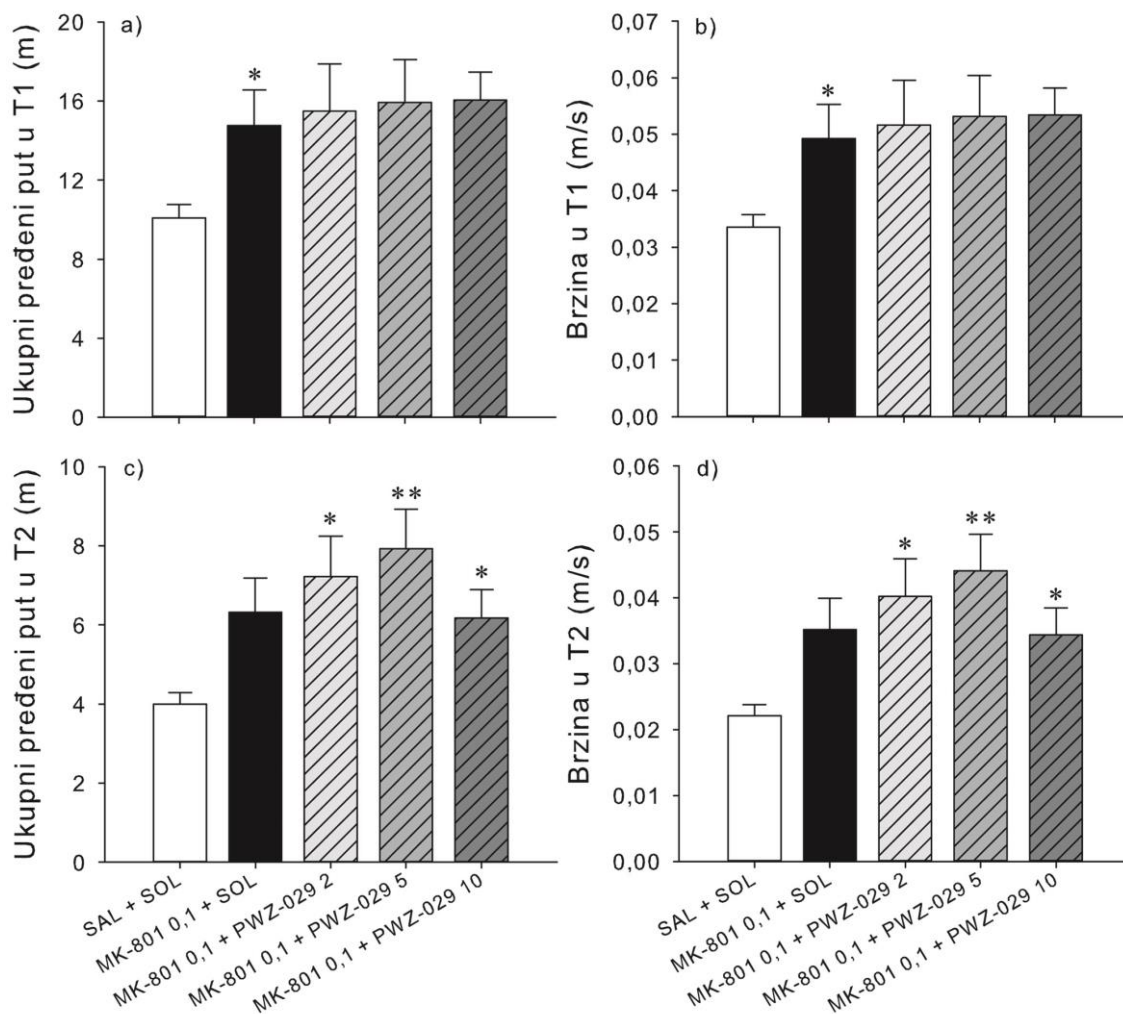
Tretman	diskriminacioni indeks
	One-Sample t-test
SAL + SOL	t(22)=2,45; p=0,023
MK-801 0,1 + SOL	t(19)=1,79; p=0,090
MK-801 0,1 + PWZ-029 2	t(15)=-0,27; p=0,790
MK-801 0,1 + PWZ-029 5	t(16)=4,22; p < 0,001
MK-801 0,1 + PWZ-029 10	t(18)=1,32; p=0,202



Slika 49. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,1 mg/kg MK-801 na a) vreme istraživanja novog i poznatog objekta u T2 i b) diskriminacioni indeks. *p<0,05 i **p<0,01 prema t-testu sa uparenim uzorcima za vreme istraživanja novog i starog objekta; *p<0,05 i *p<0,001 u odnosu na hipotetičku vrednost 0 (one-sample t-test) za diskriminacioni indeks. Broj životinja u grupama: 23, 20, 16, 17, 19.**

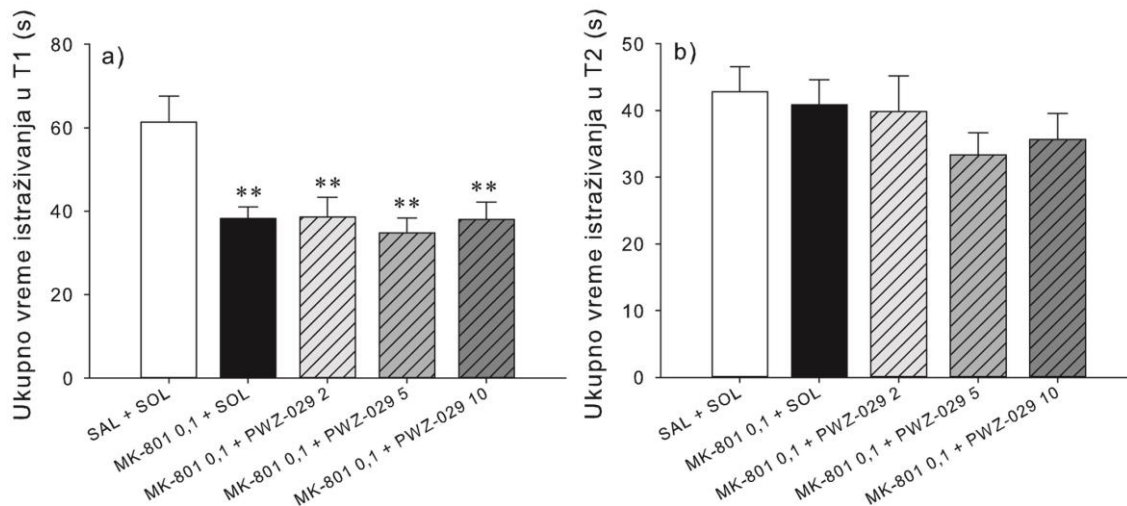
Analiza uticaja PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na parametre aktivnosti (Slika 50) pokazuje da je ukupan efekat tretmana dostigao statističku značajnost za pređeni put, brzinu kretanja u T1 i T2, ali i za ukupno vreme istraživanja objekata u T1 (Tabela 32). *Post hoc* analiza SNK testom otkrila je signifikantan efekat kod grupe tretirane sa 0,1 mg/kg MK-801 za pređeni put u T1, kao i kombinacije MK-801 i PWZ-029 (u sve tri doze) u T2 u odnosu na kontrolu (Slika 50a i 50c). Dodatno je u T1 primećen statistički trend za kombinacije tretmana MK-

801 i PWZ-029 u odnosu na kontrolu (p vrednosti 0,066; 0,068 i 0,075 za, redom, 2; 5 i 10 mg/kg PWZ-029 + 0,1 mg/kg MK-801), dok je u T2 za pređeni put trend viđen za MK-801 i kontrolnu grupu (p=0,069). Posmatrajući brzinu kretanja uočavaju se iste statističke značajnosti i trendovi (Slika 50b i 50d). Ovim se može zaključiti da sâm MK-801 u dozi od 0,1 mg/kg nije u ovom eksperimentu uticao isključivo na umanjenje kognitivne sposobnosti, već i na ukupnu aktivnost životinje, izazivajući hiperaktivnost, dok ni jedna od primenjenih doza PWZ-029 nije bila u stanju da ove efekte na aktivnost potpuno prevenira.



Slika 50. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,1 mg/kg MK-801 na a) ukupni pređeni put u T1, b) brzinu kretanja u T1, c) ukupni pređeni put u T2 i d) brzinu kretanja u T2. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu (SAL+SOL) grupu. Broj životinja u grupama: 23, 20, 16, 17 i 19.

Dodatno, sve grupe koje su primale MK-801, sâm ili u kombinaciji sa PWZ-029, provele su manje vremena istražujući objekte u T1 (Tabela 32, Slika 51a). Ovaj efekat nije primećen u toku perioda T2 kada su životinje izložene novom objektu (Slika 51b).



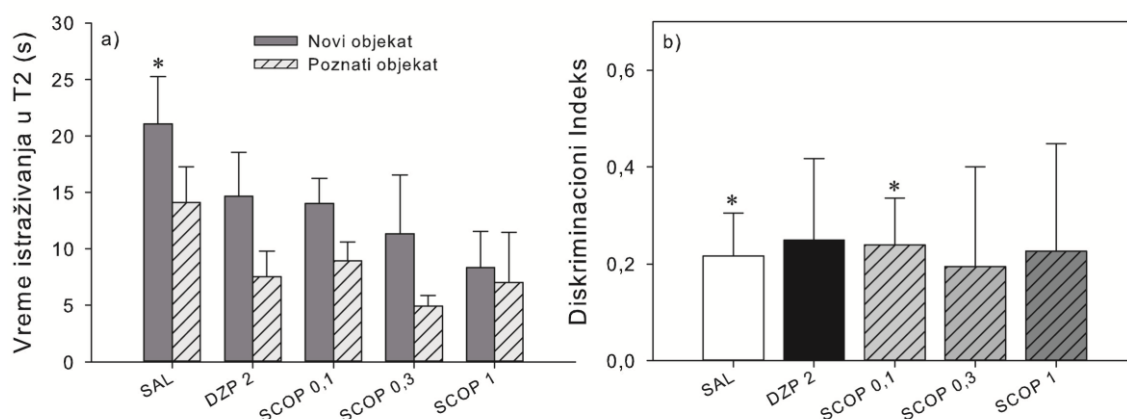
Slika 51. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,1 mg/kg MK-801 na ukupno vreme istraživanja u a) T1 i b) T2. ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu (SAL+SOL) grupu. Broj životinja u grupama: 23, 20, 16, 17 i 19.

4.3.4 Eksperiment 4

Oštećujući efekat skopolamina na kognitivnu sposobnost ispitivan je u opsegu doza od 0,1 do 1 mg/kg. Primećeno je da životinje iz kontrolne, kao i grupe koja je primala 0,1 mg/kg skopolamina mogu da prepoznaju novi objekat (statistika za diskriminacioni indeks prikazana u Tabeli 36 i na Slici 52b). Statistički više vremena u istraživanju novog objekta provodile su kontrolne životinje (Tabela 31; Slika 52a), dok se kod pacova tretiranih skopolaminom (0,1 mg/kg) javio statistički trend (0,065; Tabela 31). Grupa životinja koja je primila 2 mg/kg diazepama nije bila u mogućnosti da prepozna novi objekat, potvrđujući i u testu prepoznavanja novog objekta amnezijski potencijal benzodiazepina (Tabela 31 i 36).

Tabela 36. Rezultati statistike za diskriminacioni indeks u eksperimentu ispitivanja uticaja skopolamina (0,1; 0,3 i 1 mg/kg, SCOP) i diazepama (2 mg/kg, DZP).

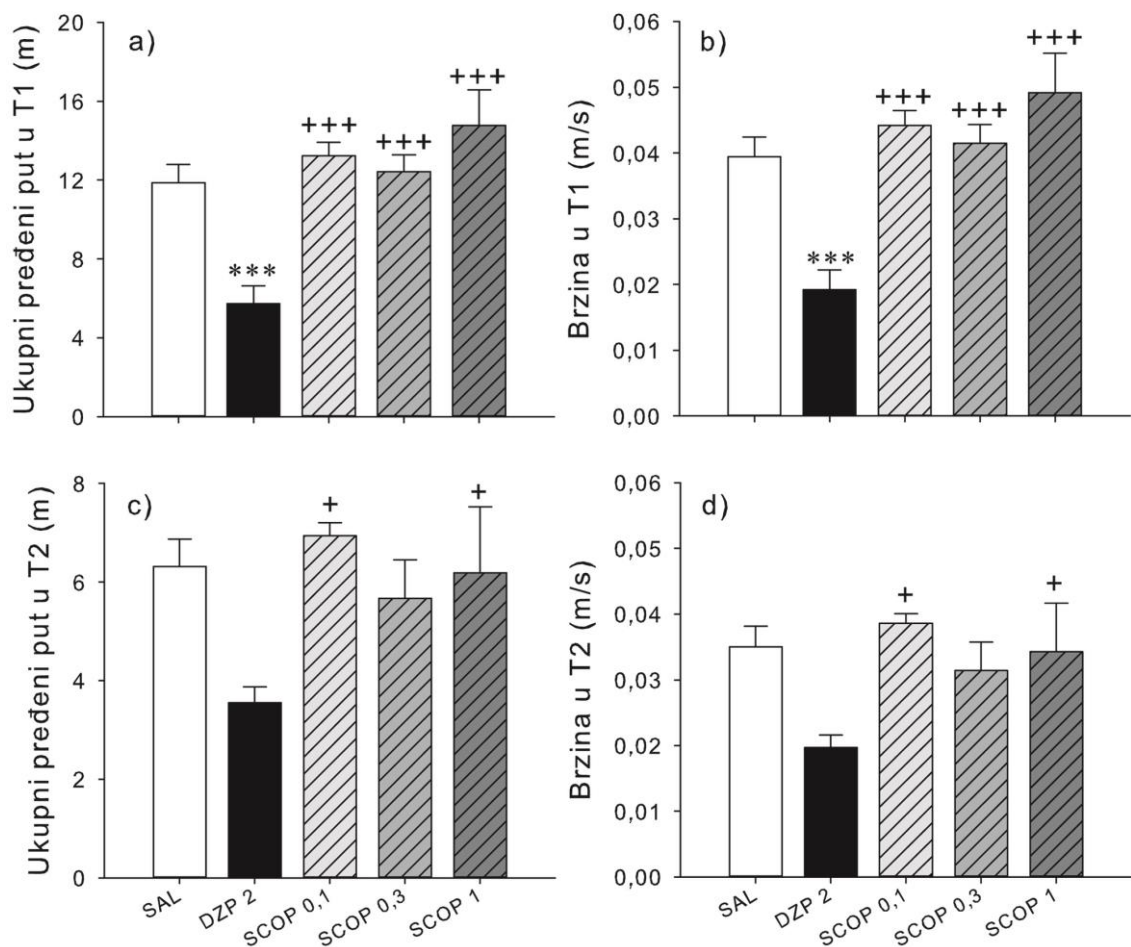
Tretman	Diskriminacioni Indeks
	One-Sample t-test
SAL	t(7)=2,43; p=0,046
DZP 2	t(9)=1,40; p=0,195
SCOP 0,1	t(9)=2,35; p=0,043
SCOP 0,3	t(7)=0,95; p=0,374
SCOP 1	t(8)=1,02; p=0,337



Slika 52. Uticaj 2 mg/kg diazepama i skopolamina (0,1; 0,3 i 1 mg/kg) na a) vreme istraživanja novog i poznatog objekta u T2 i b) diskriminacioni indeks. *p<0,05 prema t-testu sa uparenim uzorcima za vreme istraživanja novog i starog objekta; *p<0,05 u odnosu na hipotetičku vrednost 0 (one-sample t-test) za diskriminacioni indeks. Broj životinja u grupama: 8, 10, 10, 8, 9.

Proširujući analizu na parametre aktivnosti primećuje se statistički značajan efekat tretmana na ukupni pređeni put i brzinu kretanja u T1 i T2 (Tabela 32). *Post hoc* SNK analiza za date parametre (Slika 53) ukazuje na smanjenje pređenog puta i manju brzinu kretanja pacova iz grupe tretirane sa 2 mg/kg diazepama, što ukazuje na sedativni potencijal date doze diazepama. Ukupna vremena istraživanja objekata nisu se statistički razlikovala među grupama u T1 i T2 (Tabela 32).

Na osnovu ovog eksperimenta utvrđeno je da doza od 0,3 mg/kg skopolamina nije uz umanjenje kognitivnih sposobnosti pokazala efekte na opštu aktivnost životinje.



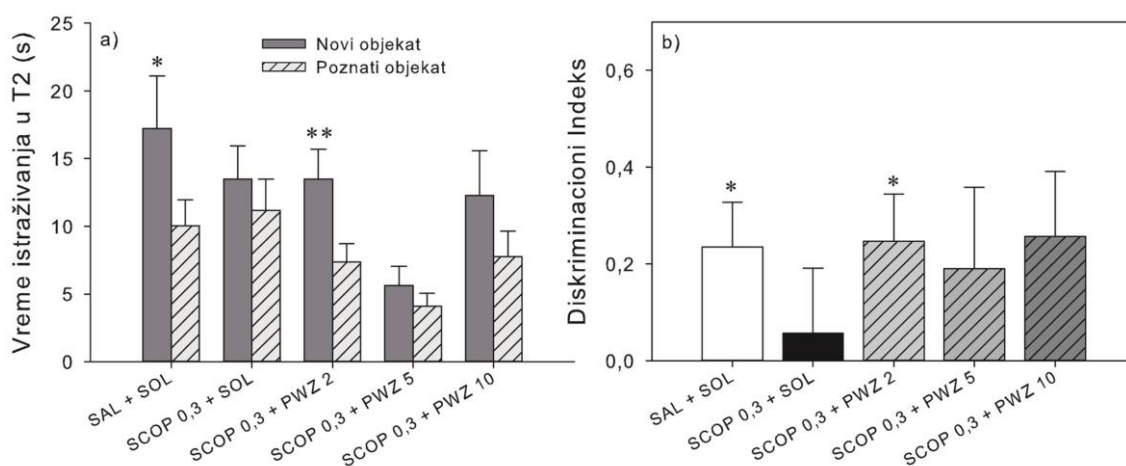
Slika 53. Uticaj 2 mg/kg diazepam i skopolamina (0,1; 0,3 i 1 mg/kg) na a) ukupni pređeni put u T1, b) brzinu kretanja u T1, c) ukupni pređeni put u T2 i d) brzinu kretanja u T2. *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu (SAL+SOL) grupu; + $p < 0,05$ i +++ $p < 0,001$ u odnosu na diazepam 2 mg/kg (DZP 2) grupu. Broj životinja u grupama: 8, 10, 10, 8, 9.

4.3.5 Eksperiment 5

Efekti PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,3 mg/kg skopolamina na prepoznavanje novog objekta dati su kroz diskriminacioni indeks (Tabela 37, Slika 54b) i vremena provedena uz novi i poznati objekat (Tabela 31 i Slika 54a). Skopolaminom izazvane promene u kogniciji je uspela da prevenira jedino najmanja ispitivana doza PWZ-029 (2 mg/kg), dok je doza od 5 mg/kg bila bez pozitivnog efekta (Slika 54a i 54b). Dodatno, kod najveće doze je bio prisutan statistički trend za diskriminacioni indeks ($p=0,078$; Tabela 37).

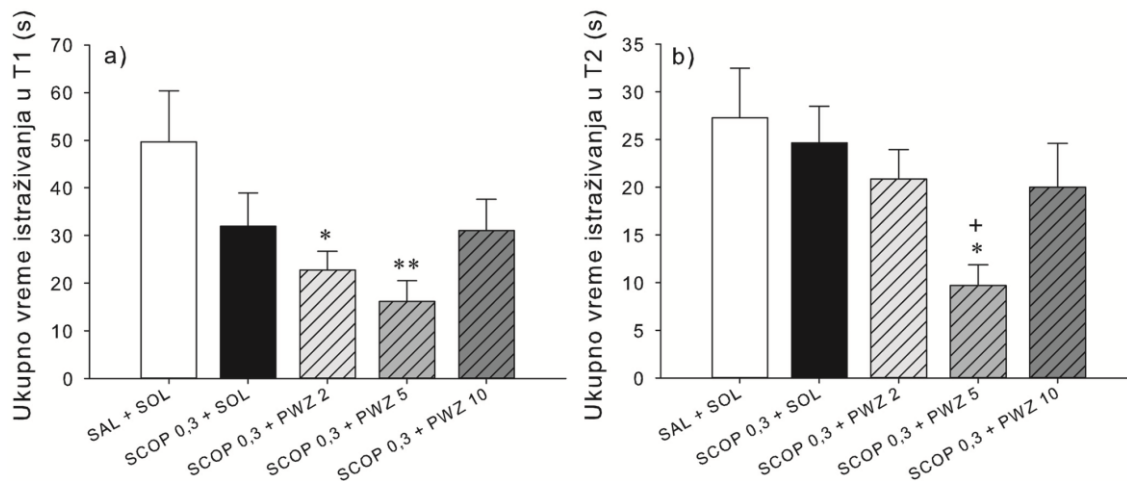
Tabela 37. Rezultati statistike za diskriminacioni indeks u eksperimentu ispitivanja uticaja skopolamina (0,3 mg/kg, SCOP) i PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg).

<i>Tretman</i>	diskriminacioni indeks	
	One-Sample t-test	
SAL + SOL	t(11)=2,52; p=0,028	
SCOP 0,3 + SOL	t(13)=0,42; p=0,684	
SCOP 0,3 +PWZ-029 2	t(14)=2,55; p=0,023	
SCOP 0,3 +PWZ-029 5	t(14)=1,13; p=0,277	
SCOP 0,3 +PWZ-029 10	t(13)=1,91; p=0,078	



Slika 54. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,3 mg/kg skopolamina na a) vreme istraživanja novog i poznatog objekta u T2 i b) diskriminacioni indeks. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ prema t-testu sa uparenim uzorcima za vreme istraživanja novog i starog objekta; * $p < 0,05$ u odnosu na hipotetičku vrednost 0 (one-sample t-test) za diskriminacioni indeks. Broj životinja u grupama: 12, 14, 15, 15, 14.

Jedofaktorska ANOVA je bila statistički značajna za ukupno vreme istraživanja objekata u T1 i T2, dok za ostale parametre aktivnosti nije bilo značajnosti (Tabela 32). Dodatna SNK *post hoc* analiza data je na Slici 55a i 55b. Jasno se primećuju manja ukupna vremena istraživanja kod doze 2 i 5 mg/kg PWZ-029 u kombinaciji sa skopolaminom u T1. Ovo ukazuje na smanjenje motivacije ovih životinja za istraživanjem i upućuje na moguće promene ponašanja do kojih može da dovede PWZ-029 pri manjim dozama. U T2, pacovi koji su primali PWZ-029 u dozi od 5 mg/kg u kombinaciji sa skopolaminom manje vremena provode u istraživanju u odnosu na kontrolne životinje, ali i one tretirane skopolaminom, dok statistički značajan trend postoji između 5 mg/kg PWZ-029 i ostale dve doze PWZ-029 (2 i 10 mg/kg) u kombinaciji sa skopolaminom ($p=0,087$, odnosno $0,054$).



Slika 55. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,3 mg/kg skopolaminana na ukupno vreme istraživanja u a) T1 i b) T2. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (SAL+SOL) grupu; + $p < 0,05$ u odnosu na skopolamin (SCOP 0,3+SOL) grupu. Broj životinja u grupama: 12, 14, 15, 15, 14.

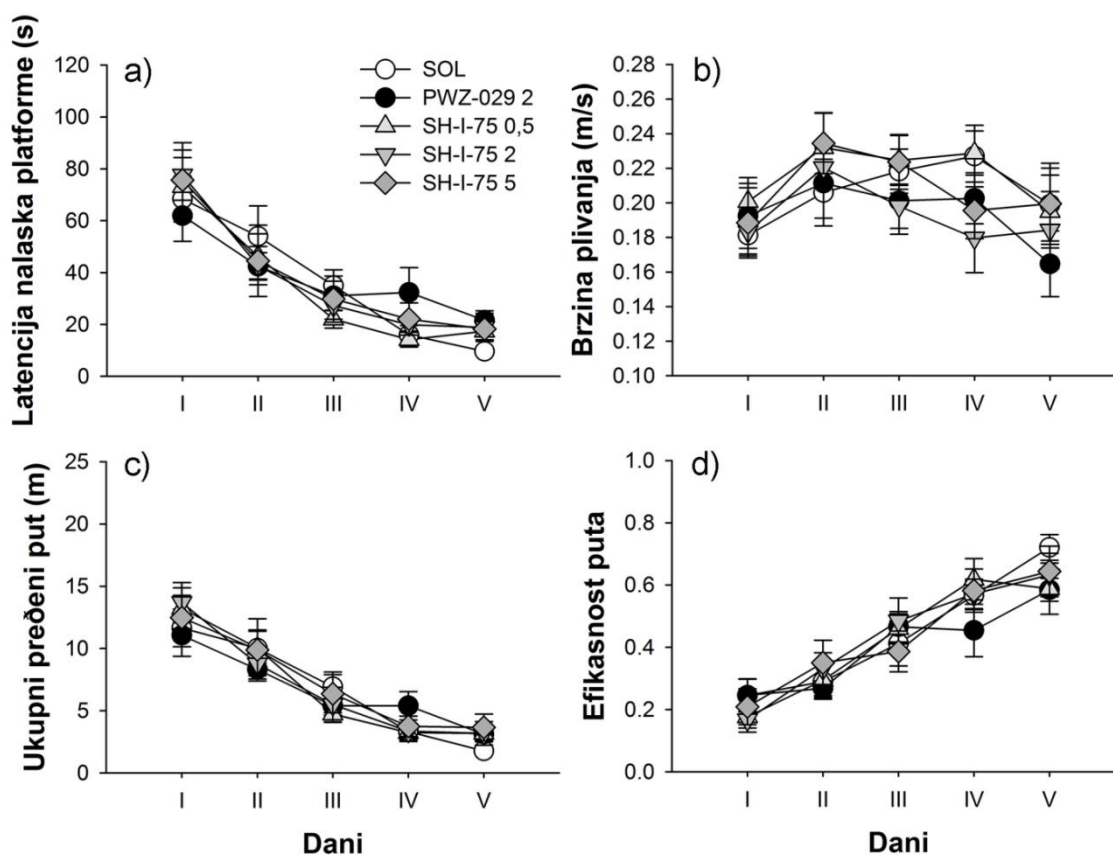
4.4 Morisov vodeni lavirint

4.4.1 Eksperiment 1

U toku faze učenja, dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem nije pokazala značajan uticaj faktora tretman ni interakcije, već je utvrđen samo statistički značajan uticaj faktora dani na posmatrane parametre (Tabela 38, Slika 56).

Tabela 38. Rezultat statističke analize efekta 2 mg/kg PWZ-029 i SH-I-75 (0,5; 2 i 5 mg/kg) na ponašanje pacova tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu.

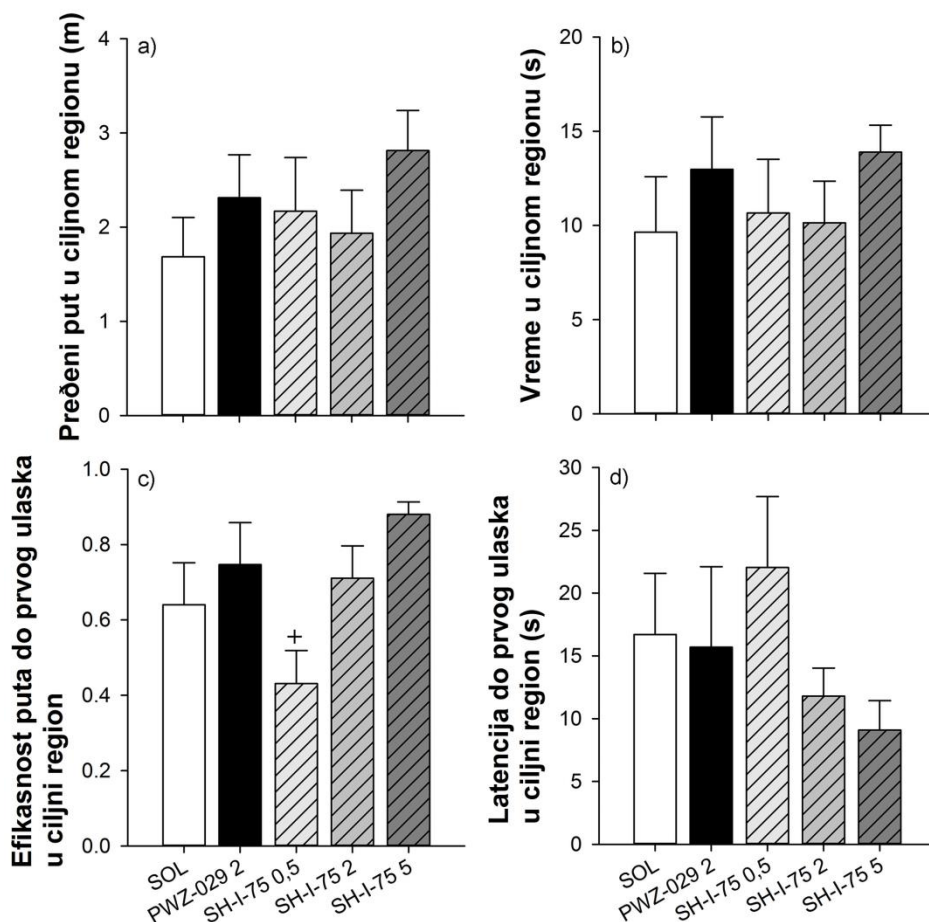
Faktor	Latencija (s)	Ukupni pređeni put (m)	Brzina plivanja (m/s)	Efikasnost puta
	Dvo-faktorska ANOVA sa ponavljanjem			
Tretman, F(4,33); p	0,10; 0,980	0,09; 0,983	0,48; 0,748	0,24; 0,912
Dani, F(4,132); p	50,42; <0,001	62,46; <0,001	8,04; <0,001	51,03; <0,001
Interakcija, F(16,132); p	0,75; 0,735	0,74; 0,749	1,05; 0,405	0,81; 0,669



Slika 56. Uticaj 2 mg/kg PWZ-029 i SH-I-75 (0,5; 2 i 5 mg/kg) na latenciju nalaska platforme (a), brzinu plivanja (b), pređeni put (c) i efikasnost puta (d) tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu. Broj životinja u grupama: 7, 8, 8, 8, 7.

Vrednosti parametara praćenih tokom testa pozivanja za oba ispitivana liganda bile su bliske kontrolnim vrednostima. Jednofaktorska ANOVA bila je statistički značajna jedino za parametar efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region ($F(4,33)=3,25$; $p=0,024$). *Post hoc* SNK test je dat na Slici 57c i ukazuje na manju efikasnost ulaska u ciljni region kod pacova koji su prethodnih pet dana, tokom učenja, primali 0,5 mg/kg SH-I-75 u odnosu na 5 mg/kg SH-I-75. U odnosu na najmanju dozu SH-I-75 (0,5 mg/kg), dodatno je postojao

statistički trend i sa grupama koje su primale 2 mg/kg SH-I-75 i 2 mg/kg PWZ-029 (p vrednosti 0,095, odnosno 0,092).



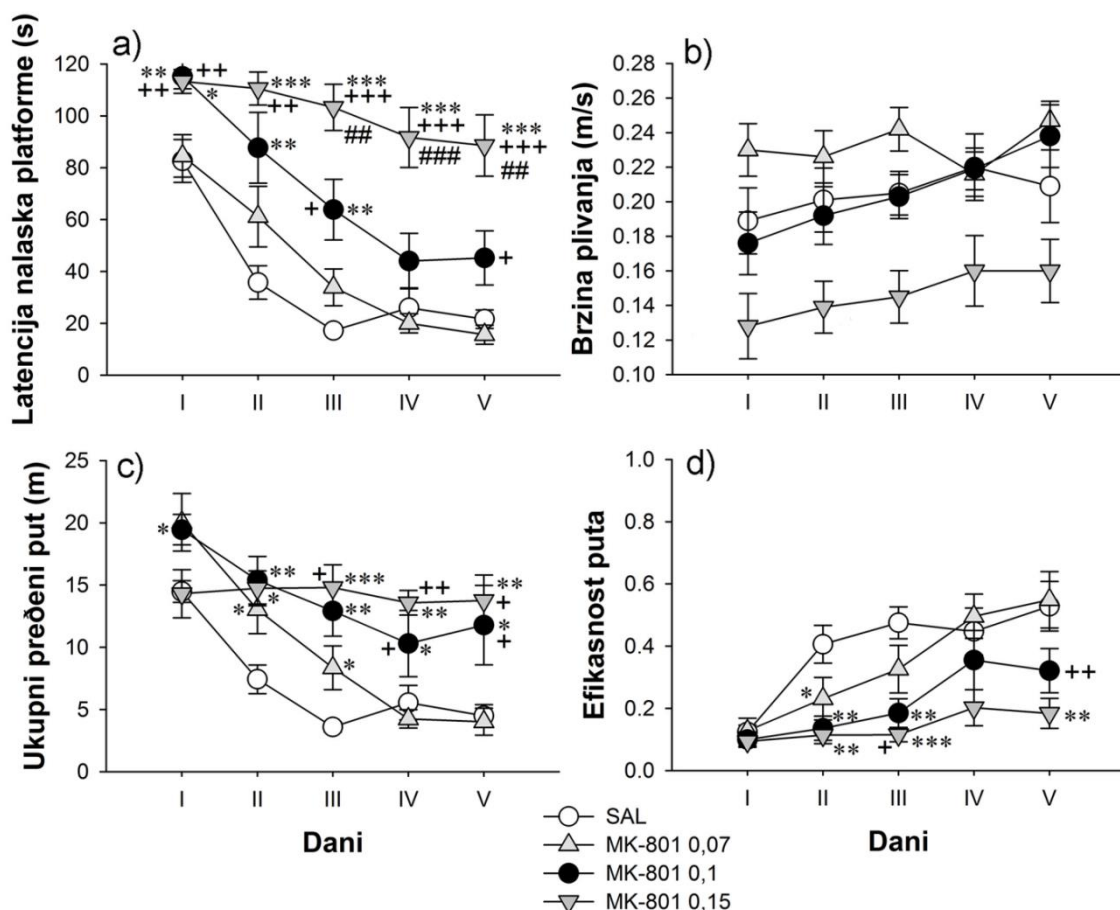
Slika 57. Uticaj 2 mg/kg PWZ-029 i SH-I-75 (0,5; 2 i 5 mg/kg) na pređeni (preplivani) put u ciljnom regionu (a), vreme provedeno u ciljnom regionu (b), efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region (c) i latenciju do prvog ulaska u ciljni region (d) tokom probnog testa. +p<0,05 u odnosu na 5 mg/kg SH-I-75. Broj životinja u grupama: 7, 8, 8, 8, 7.

4.4.2 Eksperiment 2

U eksperimentu sa MK-801 svi praćeni parametri su bili značajni za faktor tretman (Tabela 39). Parametar brzina plivanja je ukazao na postojanje neselektivnih promena u ponašanju (pored kognitivnih) u vodenom lavirintu; *post hoc* SNK analiza je otkrila statističku razliku između kontrolne i grupe koja je primala 0,15 mg/kg MK-801 (Tabela 39). Posmatrajući ostale parametre koji govore o smanjenoj sposobnosti učenja u vodenom lavirintu, primećeno je da se pacovi iz grupe koja je primala 0,07 mg/kg MK-801 ponašaju slično kontrolnim životinjama (Slika 58).

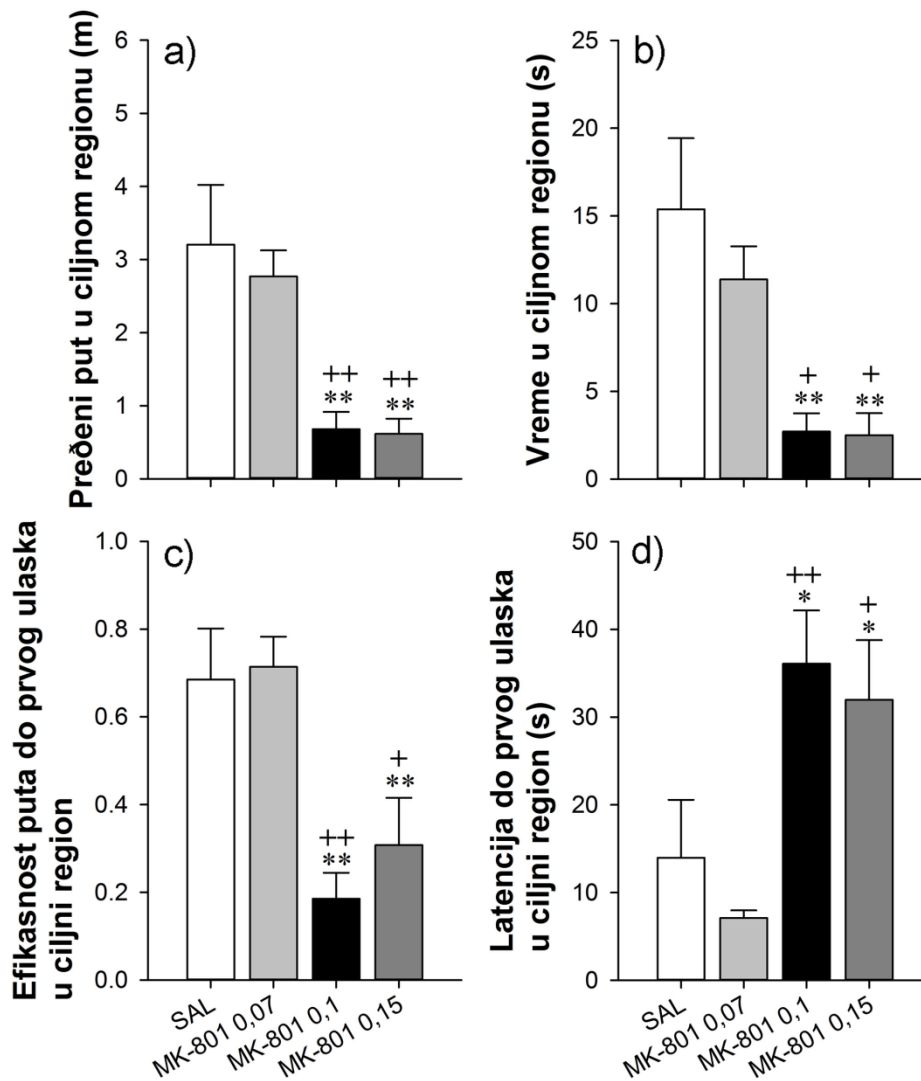
Tabela 39. Rezultat statističke analize efekta 0,07; 0,1 i 0,15 mg/kg MK-801 na ponašanje pacova tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu.

	Latencija (s)	Ukupni pređeni put (m)	Brzina plivanja (m/s)	Efikasnost puta
<i>Faktor</i>	Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem			
Tretman, F(3,28); p	22,28; <0,001	9,66; <0,001	9,81; <0,001	10,43; <0,001
Dani, F(4,112); p	53,30; <0,001	24,02; <0,001	3,80; 0,006	19,73; <0,001
Interakcija, F(12,112); p	3,289; <0,001	3,70; <0,001	0,80; 0,646	2,10; 0,022
<i>Tretman</i>	SNK <i>post hoc</i>			
MK 0,1 vs. SAL	0,002	<0,001	nz	0,005
MK 0,15 vs. SAL	<0,001	<0,001	0,001	<0,001
MK 0,1 vs. MK 0,07	0,004	0,015	nz	0,019
MK 0,15 vs. MK 0,07	<0,001	0,027	<0,001	0,001
MK 0,15 vs. MK 0,1	0,002	nz	0,003	nz
<i>Dani</i>	Jednofaktorska ANOVA po danima (F(3,28); p)			
I	7,01; 0,001	3,40; 0,031	–	0,40; 0,755
II	10,39; <0,001	4,88; 0,007	–	6,67; 0,002
III	21,24; <0,001	9,36; <0,001	–	9,20; <0,001
IV	13,10; <0,001	7,08; 0,001	–	2,87; 0,054
V	15,94; <0,001	6,07; 0,003	–	5,56; 0,004
MK 0,07=0,07 mg/kg MK–801; MK 0,1=0,1 mg/kg MK–801; MK 0,15=0,15 mg/kg MK–801; nz=nije statistički značajno				



Slika 58. Uticaj MK-801 (0,07; 0,1 i 0,15 mg/kg) na latenciju nalaska platforme (a), brzinu plivanja (b), pređeni put (c) i efikasnost puta (d) tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ i *** $p<0,001$ u odnosu na kontrolu (SAL) grupu; + $p<0,05$; ++ $p<0,01$ i +++ $p<0,001$ u odnosu na 0,07 mg/kg MK-801 (MK-801 0,07) grupu; ## $p<0,01$ i ### $p<0,001$ u odnosu na 0,1 mg/kg MK-801 (MK-801 0,1) grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.

Analiza testa pozivanja otkrila je statistički značajan uticaj tretmana: pređeni (preplivani) put u ciljnom regionu ($F(3,28)=8,31$; $p<0,001$; Slika 59a), vreme provedeno u ciljnom regionu ($F(3,28)=7,29$; $p=0,001$; Slika 59b), efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region ($F(3,28)=8,52$; $p<0,001$; Slika 59c) i latenciju do prvog ulaska u ciljni region ($F(3,28)=6,10$; $p=0,003$; Slika 59d). *Post hoc* poređenja su otkrila statistički značajne razlike među višim dozama MK-801 (0,1 i 0,15 mg/kg) s jedne, i 0,07 mg/kg MK-801 i kontrolne grupe s druge strane (Slika 59).



Slika 59. Uticaj MK-801 (0,07; 0,1 i 0,15 mg/kg) na pređeni (preplivani) put u ciljnom regionu (a), vreme provedeno u ciljnom regionu (b), efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region (c) i latenciju do prvog ulaska u ciljni region (d) tokom testa pozivanja. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (SAL) grupu; + $p < 0,05$ i ++ $p < 0,01$ u odnosu na 0,07 mg/kg MK-801. Broj životinja u svakoj grupi bio je 8.

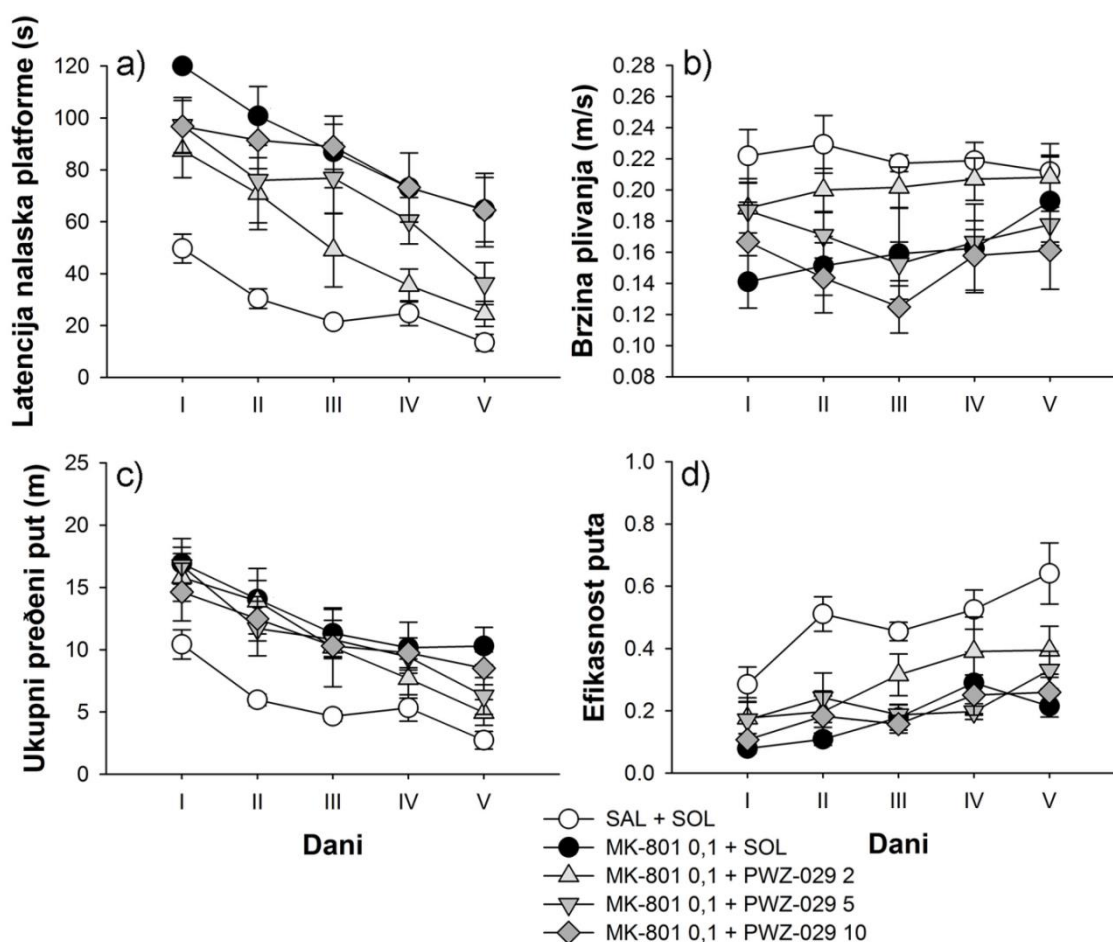
4.4.3 Eksperiment 3

Rezultati ispitivanja uticaja različitih doza PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na umanjeње kognitivnih sposobnosti u vodenom lavirintu izazvano primenom 0,1 mg/kg MK-801 prikazani su dvofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanjem za izabrane parametre u Tabeli

40. Otkriven je značajan uticaj tretmana za prikazane parametre, dok faktor dani nije bio značajan samo za brzinu plivanja. Interakcija dva faktora nije dostigla statističku značajnost ni za jedan od parametara. Vrednosti posmatranih parametara su predstavljene grafički na Slici 60; *post hoc* SNK poređenja za faktor tretman data su u Tabeli 40. Po parametru latencija jasno se uočava parcijalna reverzija promena izazvanih MK-801 pri uporednoj primeni doze od 2 mg/kg PWZ-029. Dodatno, životinje iz grupe tretirane kombinacijom 10 mg/kg PWZ-029 i MK-801 bile su najsporije, što govori o senzorno-motornim promenama u vodenom lavirintu koja se ne registruju kod samostalne primene 0,1 mg/kg MK-801.

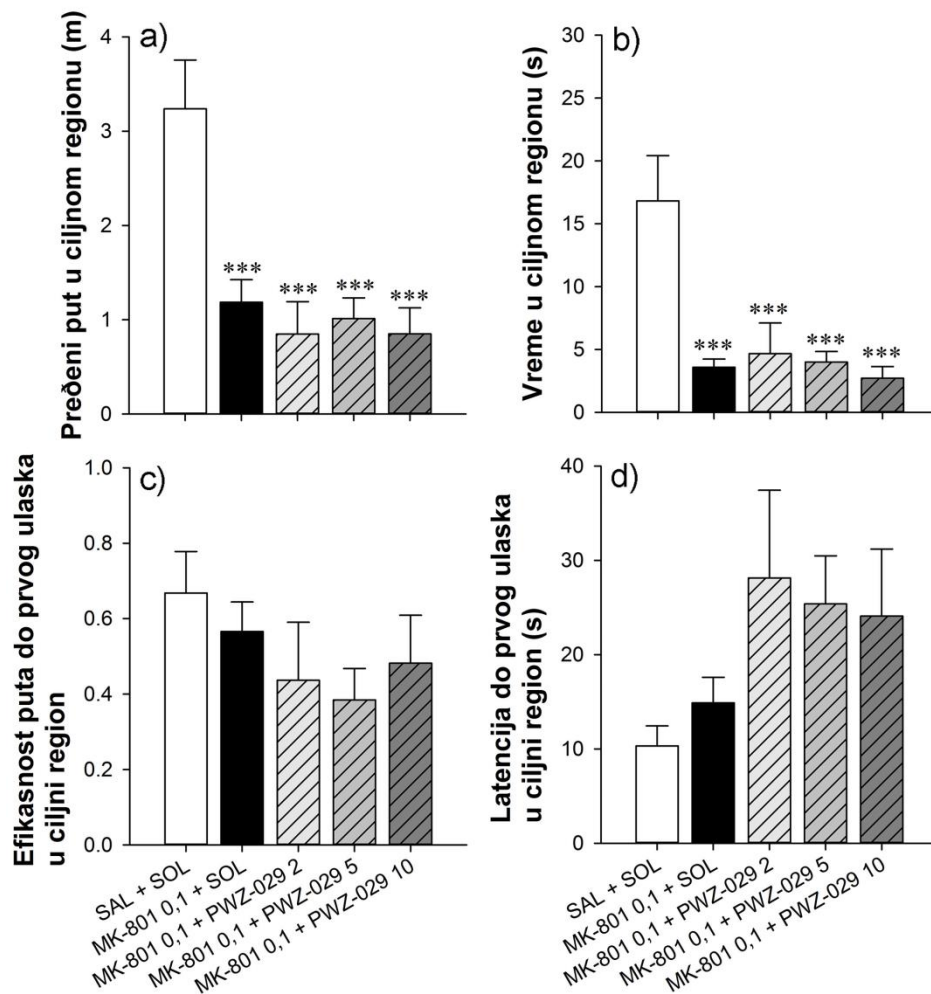
Tabela 40. Rezultat statističke analize efekta PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,1 mg/kg MK-801 na ponašanje pacova tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu.

<i>Faktor</i>	Latencija (s)	Ukupni pređeni put (m)	Brzina plivanja (m/s)	Efikasnost puta
Dvo-faktorska ANOVA sa ponavljanjem				
Tretman, F(4,34); p	9,50; <0,001	5,85; 0,001	3,34; 0,021	10,43; <0,001
Dani, F(4,136); p	33,25; <0,001	26,23; <0,001	1,59; 0,180	19,73; <0,001
Interakcija, F(12,136); p	1,41; 0,410	0,66; 0,826	1,16; 0,311	2,10; 0,481
SNK <i>post hoc</i>				
<i>Tretman</i>				
MK+SOL vs. SAL+SOL	<0,001	<0,001	nz	<0,001
MK+PWZ 2 vs. SAL+SOL	0,035	0,005	nz	0,002
MK+PWZ 5 vs. SAL+SOL	0,002	0,004	nz	<0,001
MK+PWZ 10 vs. SAL+SOL	<0,001	0,006	0,028	<0,001
MK+PWZ 2 vs. MK+SOL	0,022	nz	nz	nz
MK+PWZ 2 vs. MK+PWZ 10	0,042	nz	nz	nz
MK=0,1 mg/kg MK-801; PWZ 2=2 mg/kg PWZ-029; PWZ 5=5 mg/kg PWZ-029; PWZ 10=10 mg/kg PWZ-029; nz=nije statistički značajno				



Slika 60. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,1 mg/kg MK-801 na latenciju nalaska platforme (a), brzinu plivanja (b), pređeni put (c) i efikasnost puta (d) tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu. Broj životinja u grupama: 8, 8, 7, 8, 8.

Jednofaktorska ANOVA za parametre u testu pozivanja otkrila je uticaj tretmana na pređeni (preplivani) put u ciljnom regionu ($F(4,34)=9,34$; $p<0,001$; Slika 61a) i vreme provedeno u ciljnom regionu ($F(3,28)=8,67$; $p<0,001$; Slika 61b). Vrednosti *post hoc* SNK analize date su na Slici 61. Test pozivanja je pokazao da ni jedna doza PWZ-029 nije bila u stanju da izvrši reverziju poremećaja pozivanja, iako su u toku faze učenja primećeni izvesni povoljni efekti uporedne primene PWZ-029 i MK-801.



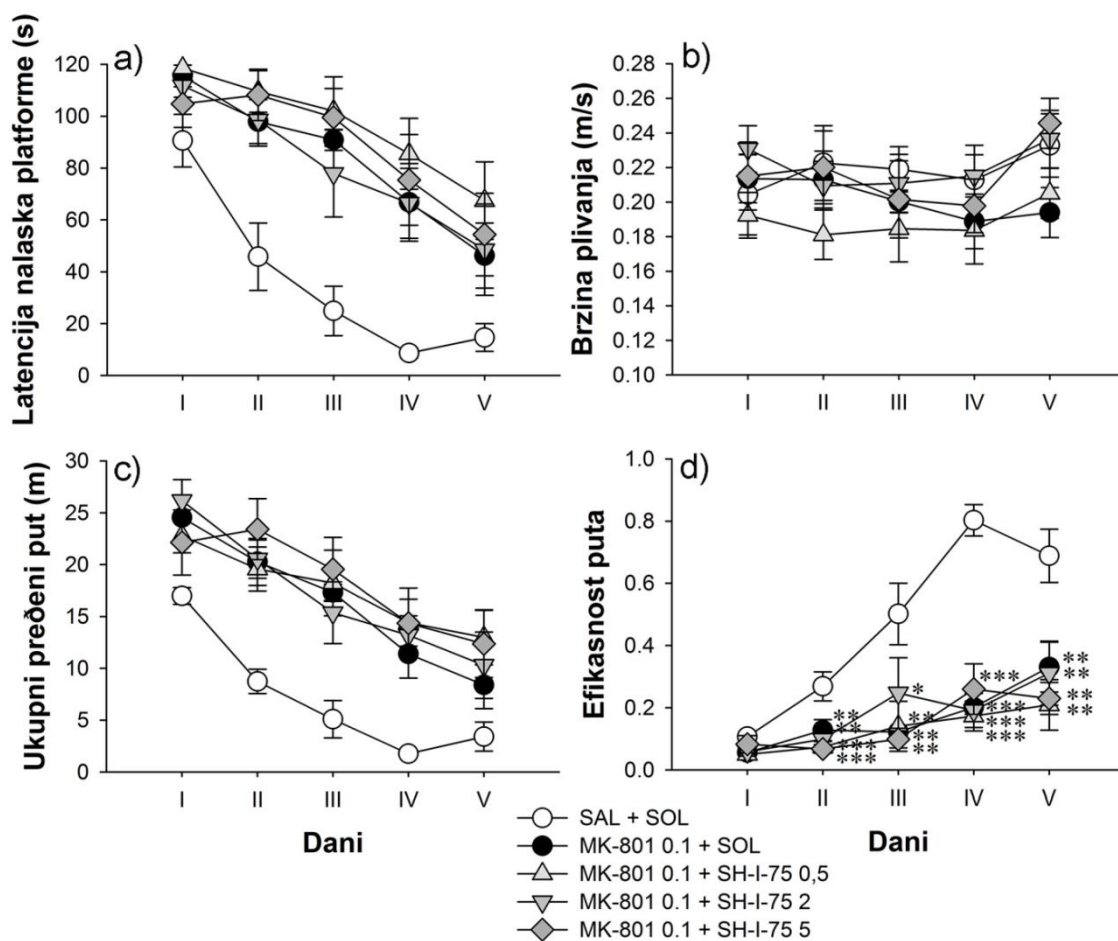
Slika 61. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,1 mg/kg MK-801 na pređeni (preplivani) put u ciljnom regionu (a), vreme provedeno u ciljnom regionu (b), efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region (c) i latenciju do prvog ulaska u ciljni region (d) tokom testa pozivanja. *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolu (SAL+SOL) grupu. Broj životinja u grupama: 8, 8, 7, 8, 8.

4.4.4 Eksperiment 4

Rezultati dvofaktorske analize uticaja SH-I-75 (0,5; 2 i 5 mg/kg) na umanjenje sposobnosti učenja u vodenom lavirintu izazvano primenom 0,1 mg/kg MK-801 prikazani su u Tabeli 37. Uticaj faktora tretman nije bio značajan jedino za brzinu plivanja. *Post hoc* SNK poređenja su otkrila različito ponašanje svih tretmana u odnosu na kontrolnu grupu, i potvrdila da pacovi koji su primali 0,1 mg/kg MK-801, sâm ili u kombinaciji sa SH-I-75, sporije uče (Tabela 41; Slika 62).

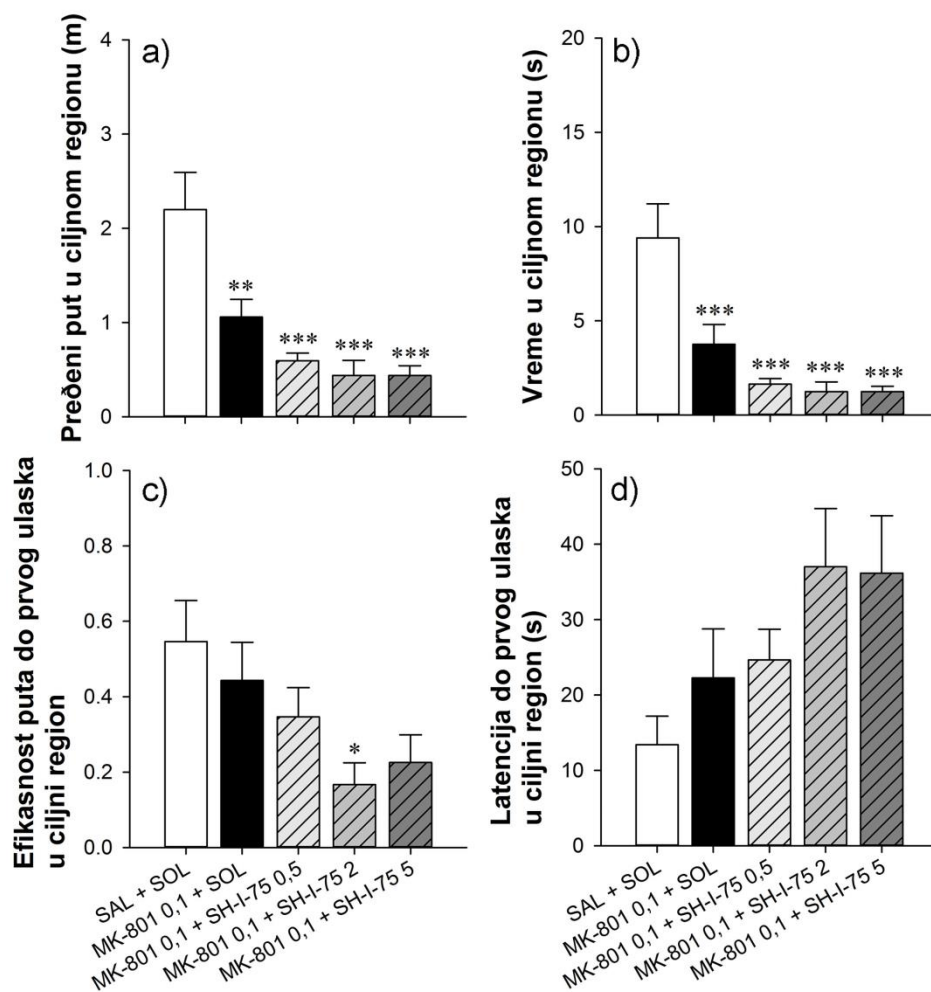
Tabela 41. Rezultati statističke analize efekta SH-I-75 (0,5; 2 i 5 mg/kg) i 0,1 mg/kg MK-801 na ponašanje pacova tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu.

	Latencija (s)	Ukupni pređeni put (m)	Brzina plivanja (m/s)	Efikasnost puta
<i>Faktor</i>	Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem			
Tretman F(4,33); p	6,35; <0,001	6,14; <0,001	0,83; 0,514	13,32; <0,001
Dani F(4,132); p	42,93; <0,001	42,75; <0,001	3,86; 0,005	30,34; <0,001
Interakcija F(16,132); p	1,32; 0,192	1,11; 0,355	1,11; 0,353	4,09; <0,001
<i>Tretman</i>	SNK post hoc			
MK + SH 0,5 vs. SAL + SOL	<0,001	0,002	–	<0,001
MK + SH 5 vs. SAL + SOL	0,002	0,001	–	<0,001
MK + SH 2 vs. SAL + SOL	0,003	0,002	–	<0,001
MK + SOL vs. SAL + SOL	0,003	0,001	–	<0,001
<i>Dani</i>	Jednofaktorska ANOVA po danima (F(4,33); p)			
I	–	–	–	2,00; 0,117
II	–	–	–	7,37; <0,001
III	–	–	–	4,73; 0,004
IV	–	–	–	17,59; <0,001
V	–	–	–	5,49; 0,002
MK=0,1 mg/kg MK-801; SH 0,5=0,5 mg/kg SH-I-75; SH 2=2 mg/kg SH-I-75; SH 5=5 mg/kg SH-I-75				



Slika 62. Uticaj SH-I-75 (0,5; 2 i 5 mg/kg) i 0,1 mg/kg MK-801 na latenciju nalaska platforme (a), brzinu plivanja (b), pređeni put (c) i efikasnost puta (d) tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu (SAL+SOL) grupu. Broj životinja u grupama: 7, 8, 8, 7, 8.

Analiza testa pozivanja otkrila je statistički značajan uticaj tretmana za sledeće parametre: pređeni (preplivani) put u ciljnom regionu ($F(4,33)=12,48$; $p < 0,001$; Slika 63a), vreme provedeno u ciljnom regionu ($F(4,33)=13,05$; $p = 0,001$; Slika 63b) i efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region ($F(4,33)=3,11$; $p = 0,028$; Slika 63c). Jednofaktorska ANOVA nije bila značajna za latenciju do prvog ulaska u ciljni region ($F(4,33)=2,46$; $p = 0,064$; Slika 63d). *Post hoc* poređenja su prikazana na Slici 63. Dodatno, zapaža se trend razlike u pređenom putu u ciljnom regionu između kombinacije 2 mg/kg SH-I-75 i MK-801 i samog MK-801 ($p = 0,099$) pri čemu kombinacija prelazi manji put, kao i za efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region između kombinacije 5 mg/kg SH-I-75 i MK-801 i kontrolne grupe ($p = 0,058$).



Slika 63. Uticaj SH-I-75 (0,5; 2 i 5 mg/kg) i 0,1 mg/kg MK-801 na pređeni (preplivani) put u ciljnom regionu (a), vreme provedeno u ciljnom regionu (b), efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region (c) i latenciju do prvog ulaska u ciljni region (d) tokom testa pozivanja. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ i * $p < 0,001$ u odnosu na kontrolu (SAL+SOL) grupu. Broj životinja u grupama: 7, 8, 8, 7, 8.**

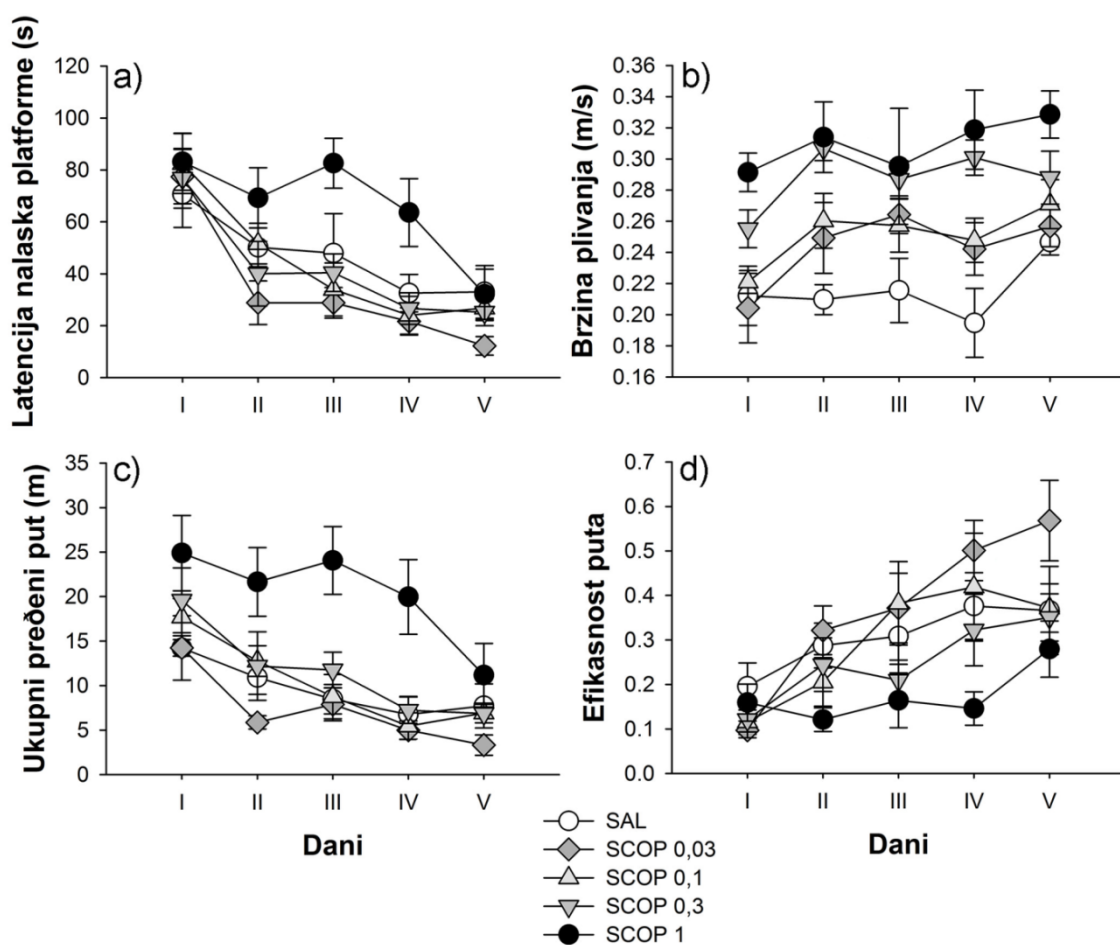
Na osnovu rezultata testa pozivanja, moglo bi se zaključiti da dodatak pozitivnog modulatora α_5 GABA_A receptora ima tendenciju da produbi kognitivne promene nastale primenom 0,1 mg/kg MK-801 u vodenom lavirintu.

4.4.5 Eksperiment 5

Uticaj skopolamina na učenje pacova u vodenom lavirintu procenjen je primenom dvofaktorske ANOVA-e, a rezultati su dati u Tabeli 42. Po svim parametrima se primećuje statistički značajan efekat tretmana i dana, dok interakcija nije bila značajna. Dodatna analiza je nedvosmisleno pokazala da jedino doza od 1 mg/kg skopolamina izaziva smanjenje sposobnosti učenja u odnosu na kontrolu (rezultati *post hoc* SNK testa za latenciju i pređeni put dati u Tabeli 42), dok je, slično ponašanju MK-801, grupa koja je primala najnižu dozu (0,03 mg/kg) imala vrednosti parametara na nivou kontrole. Primetan je i neselektivni uticaj na ponašanje skopolamina primenjenog u dozama od 0,3 i 1 mg/kg (povećana brzina plivanja Slika 64, *post hoc* prikazan u Tabeli 42).

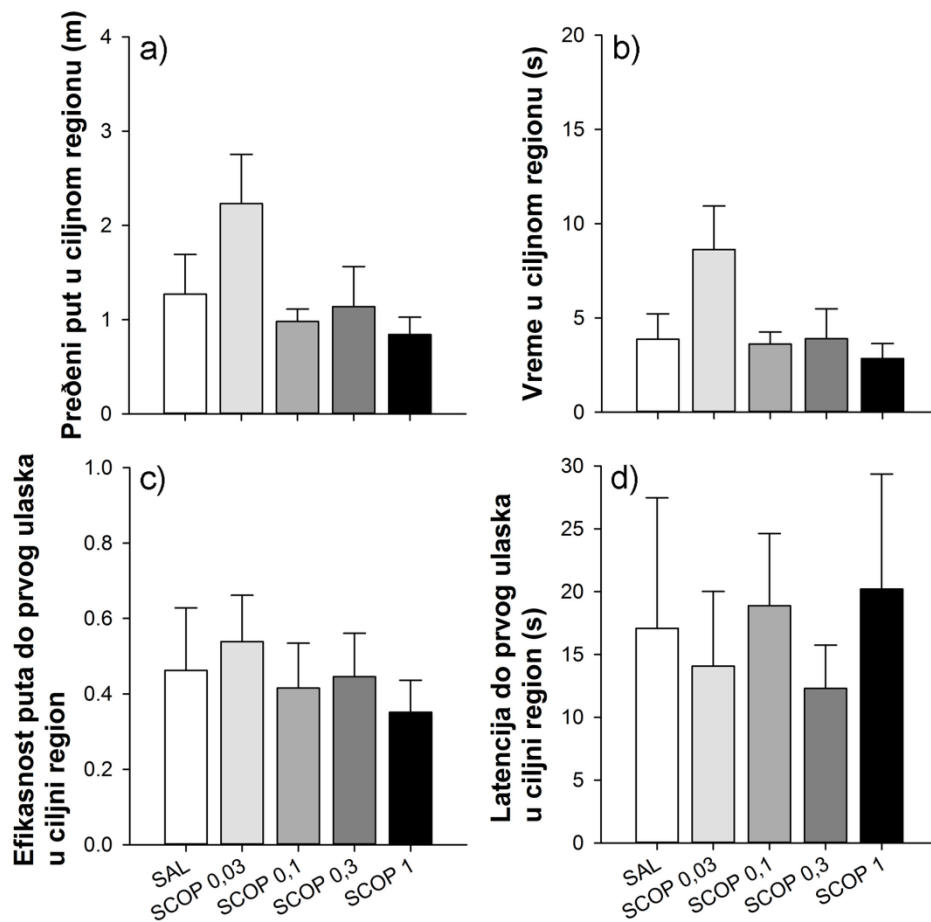
Tabela 42. Rezultati statističke analize efekta skopolamina (0,03; 0,1; 0,3 i 1 mg/kg) na ponašanje pacova tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu.

<i>Faktor</i>	Latencija (s)	Ukupni pređeni put (m)	Brzina plivanja (m/s)	Efikasnost puta
Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem				
Tretman F(4,25); p	3,52; 0,021	6,25; 0,001	9,10; <0,001	3,82; 0,015
Dani F(4,100); p	32,43; <0,001	26,72; <0,001	5,76; <0,001	14,07; <0,001
Interakcija F(16,100); p	1,42; 0,147	1,49; 0,120	0,91; 0,557	1,38; 0,165
<i>Tretman</i>	SNK <i>post hoc</i>			
SCOP 0,3 vs. SAL	nz	nz	0,002	nz
SCOP 0,3 vs. SCOP 0,03	nz	nz	0,045	nz
SCOP 0,3 vs. SCOP 0,1	nz	nz	0,049	nz
SCOP 1 vs. SAL	0,043	0,005	<0,001	nz
SCOP 1 vs. SCOP 0,03	0,012	0,001	0,004	0,008
SCOP 1 vs. SCOP 0,1	nz	0,005	0,007	nz
SCOP 1 vs. SCOP 0,3	nz	0,005	nz	nz
SCOP 0,03=0,03 mg/kg skopolamina; SCOP 0,1=0,1 mg/kg skopolamina; SCOP 0,3=0,3 mg/kg skopolamina; SCOP 1=1 mg/kg skopolamina; nz=nije statistički značajno				



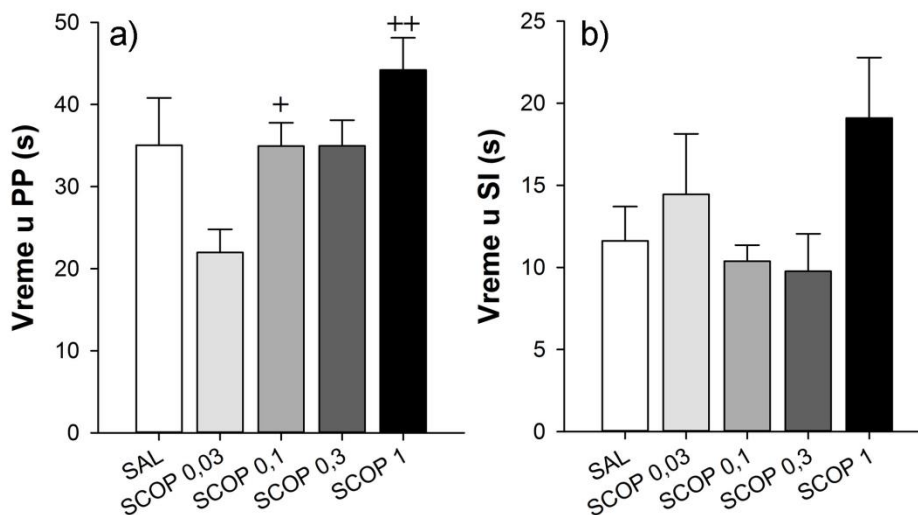
Slika 64. Uticaj skopolamina (0,03; 0,1; 0,3 i 1 mg/kg) na latenciju nalaska platforme (a), brzinu plivanja (b), pređeni put (c) i efikasnost puta (d) tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 6.

Iako se može primetiti razlika u efektima različitih doza skopolamina u testu pozivanja (Slika 65), jednofaktorska ANOVA nije bila statistički značajna ni za jedan od praćenih parametara.



Slika 65. Uticaj skopolamina (0,03; 0,1; 0,3 i 1 mg/kg) na pređeni (preplivani) put u ciljnom regionu (a), vreme provedeno u ciljnom regionu (b), efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region (c) i latenciju do prvog ulaska u ciljni region (d) tokom testa pozivanja. Broj životinja u svakoj grupi bio je 6.

Zbog izostanka efekata na parametre povezane sa pamćenjem, dodatno su obrađeni i parametri vreme u perifernom prstenu i vreme u SI kvadrantu u toku testa pozivanja. Jednofaktorska ANOVA je bila značajna za parametar vreme u periferiji ($F(4,25)=4,19$; $p=0,010$), a *post hoc* SNK analiza je data na Slici 66a.



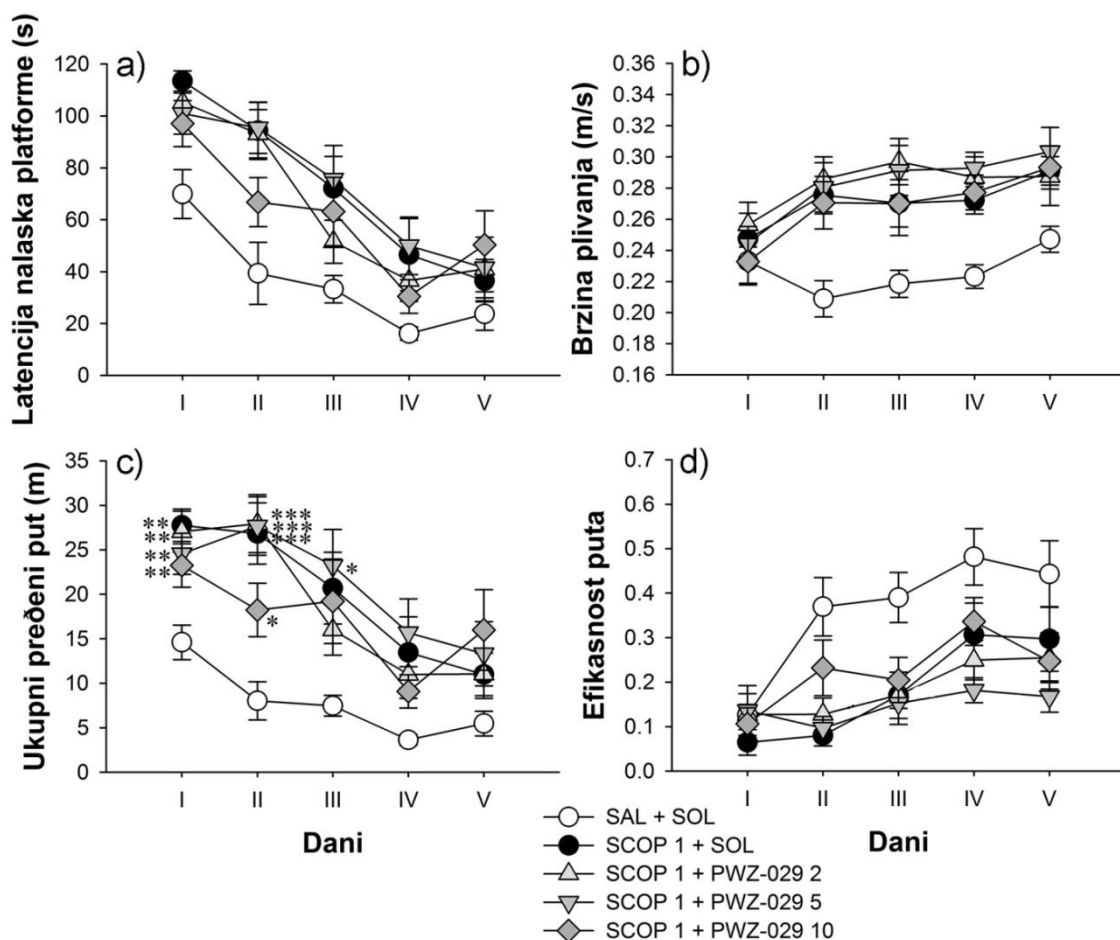
Slika 66. Uticaj skopolamina (0,03; 0,1; 0,3 i 1 mg/kg) na vreme u perifernom prstenu (PP) (a) i vreme provedeno u SI kvadrantu (b). + $p < 0,05$ i ++ $p < 0,01$ u odnosu na 0,03 mg/kg skopolamina (SCOP 0,03). Broj životinja u svakoj grupi bio je 6.

4.4.6 Eksperiment 6

Ispitivanje uticaja različitih doza PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na umanjenje kognitivnih sposobnosti u vodenom lavirintu izazvano primenom 1 mg/kg skopolamina prikazano je dvofaktorskom ANOVA-om sa ponavljanjem za izabrane parametre u Tabeli 43. Otkriven je značajan uticaj tretmana za prikazane parametre, dok faktor dani nije bio značajan samo za brzinu plivanja. Interakcija dva faktora bila je značajna samo za parametar pređeni put. Vrednosti posmatranih parametara su predstavljene grafički na Slici 67, a *post hoc* SNK poređenja za faktor tretman data su u Tabeli 43. Ni jedna od primenjenih doza PWZ-029 nije uspela da prevenira razvoj kognitivnih niti senzorno-motornih promena izazvanih skopolaminom.

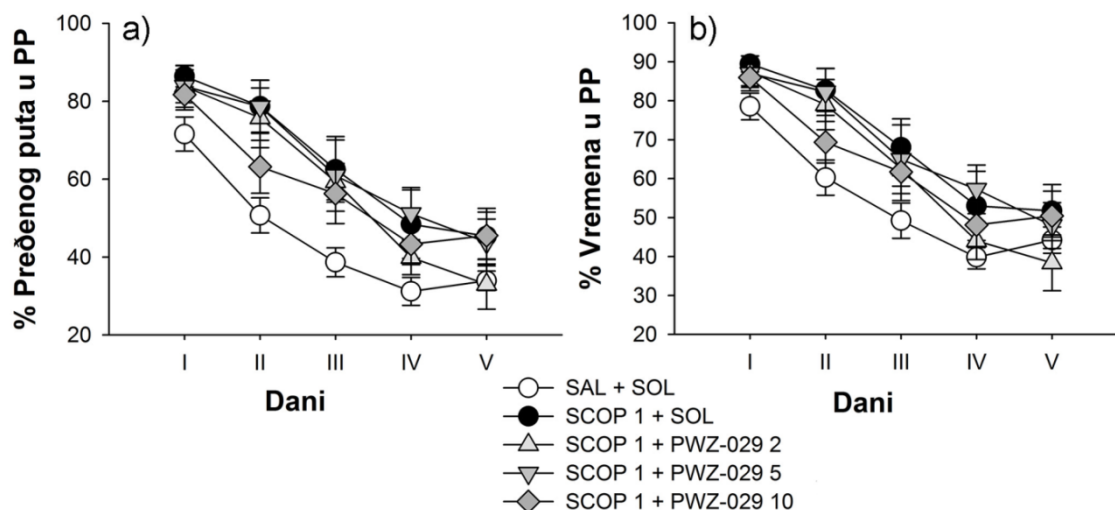
Tabela 43. Rezultati statističke analize efekta PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 1 mg/kg skopolamina na ponašanje pacova tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu.

<i>Faktor</i>	Latencija (s)	Ukupni pređeni put (m)	Brzina plivanja (m/s)	Efikasnost puta
Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem				
Tretman F(4,35); p	4,32; 0,006	5,26; 0,002	4,62; 0,004	8,35; <0,001
Dani F(4,140); p	62,95; <0,001	36,10; <0,001	12,86; <0,001	14,63; <0,001
Interakcija F(16,140); p	1,55; 0,090	2,02; 0,016	1,59; 0,080	1,49; 0,111
<i>Tretman</i>	SNK post hoc			
SCOP 1+SOL vs. SAL+SOL	0,006	0,004	0,016	<0,001
SCOP 1+PWZ 2 vs. SAL+SOL	0,019	0,006	0,007	<0,001
SCOP 1+PWZ 5 vs. SAL+SOL	0,009	0,003	0,004	<0,001
SCOP 1+PWZ 10 vs. SAL+SOL	0,019	0,007	0,009	0,002
<i>Dani</i>	Jednofaktorska ANOVA po danima (F(4,35); p)			
I	–	5,84; 0,001	–	–
II	–	7,97; <0,001	–	–
III	–	2,85; 0,038	–	–
IV	–	2,55; 0,057	–	–
V	–	1,55; 0,210	–	–
SCOP 1=1 mg/kg skopolamina; PWZ-029 2=2 mg/kg PWZ-029; PWZ-029 5=5 mg/kg PWZ-029; PWZ-029 10=10 mg/kg PWZ-029				



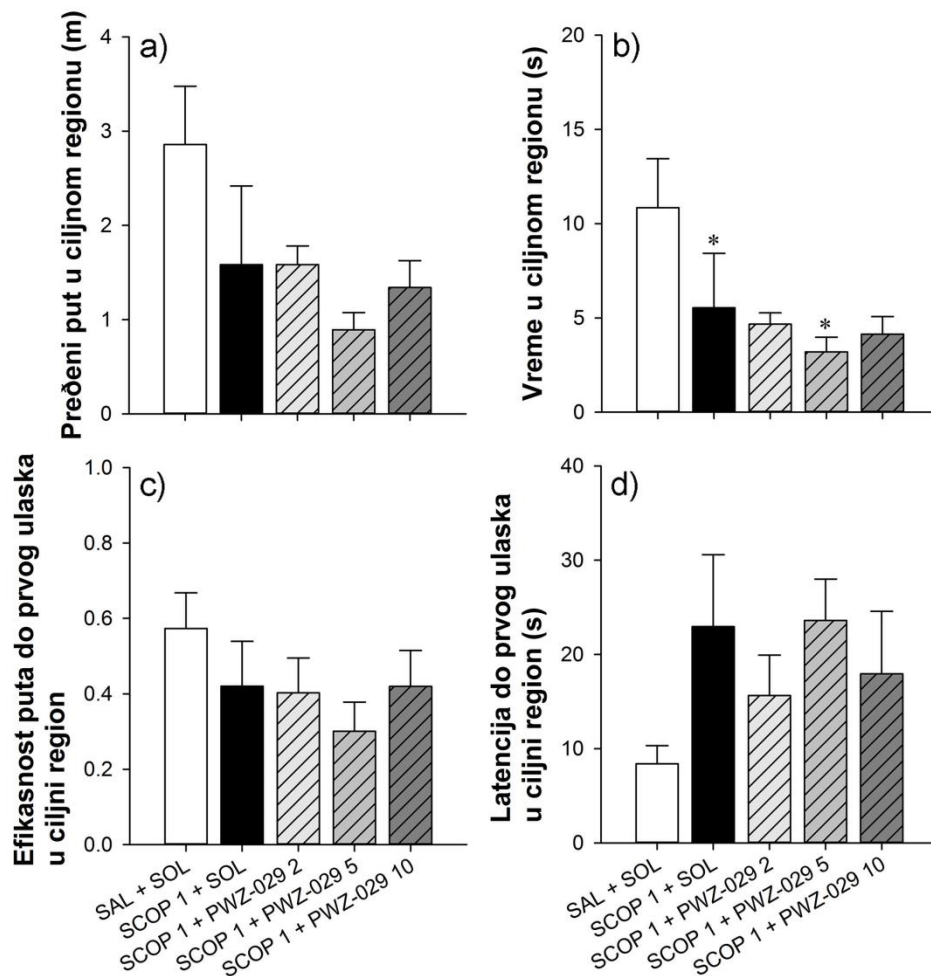
Slika 67. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 1 mg/kg skopolamina na latenciju nalaska platforme (a), brzinu plivanja (b), pređeni put (c) i efikasnost puta (d) tokom pet dana učenja u vodenom lavirintu. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolu (SAL+SOL) grupu. Broj životinja u svim grupama bio je 8.

Dodatno, obrađen je i parametar procenta pređenog puta i procenta vremena u perifernom prstenu. Dvofaktorska ANOVA nije pokazala statističku značajnost uticaja tretmana na vreme provedeno u perifernom prstenu, ali je zato postojao uticaj tretmana na procenat pređenog puta na periferiji ($F(4,35)=2,90$; $p=0,036$, Slika 68a). Faktor dani je bio značajan po oba posmatrana parametra (za vreme: $F(4,140)=83,12$; $p < 0,001$; za pređeni put: $F(4,140)=76,91$; $p < 0,001$), dok je interakcija faktora bila bez statističke značajnosti. Analiza SNK testom otkrila je razliku u procentu pređenog puta u perifernoj zoni između grupe koja je primila skopolamin ili kombinaciju 5 mg/kg PWZ-029 i skopolamina i kontrole (p vrednosti 0,038, odnosno 0,031).



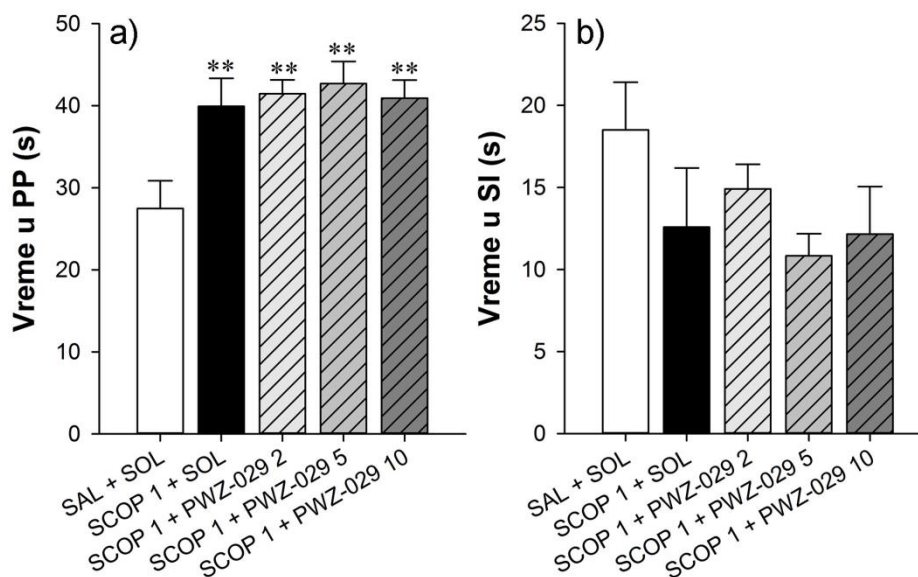
Slika 68. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 1 mg/kg skopolamina na % pređenog puta (a) i % vremena (b) u perifernom prstenu (PP). Broj životinja u svim grupama bio je 8.

Za parametar vreme provedeno u ciljnom regionu jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj tretmana ($F(4,35)=2,68$; $p=0,047$). *Post hoc* SNK analiza je pokazala da životinje koje su primale kombinaciju 5 mg/kg PWZ-029 i skopolamin, kao i sâm skopolamin, provodile manje vremena u ciljnom regionu u odnosu na kontrolne životinje (Slika 69). Dodatno je SNK poređenjem pokazan i statistički trend između grupa koje su sa skopolaminom primale 2 ili 10 mg/kg PWZ-029 i kontrolne grupe (p vrednosti 0,059, odnosno 0,065).



Slika 69. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 1 mg/kg skopolamina na pređeni (preplivani) put u ciljnom regionu (a), vreme provedeno u ciljnom regionu (b), efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region (c) i latenciju do prvog ulaska u ciljni region (d) tokom testa pozivanja. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (SAL+SOL) grupu. Broj životinja u svim grupama bio je 8.

Jednofaktorska ANOVA je otkrila značajan uticaj tretmana i na parametar vreme provedeno na periferiji ($F(4,35)=5,14$; $p=0,002$), a SNK *post hoc* poređenja su prikazana na Slici 70a. Parametar vreme u SI kvadrantu nije bio značajan po faktoru tretman (Slika 70b).

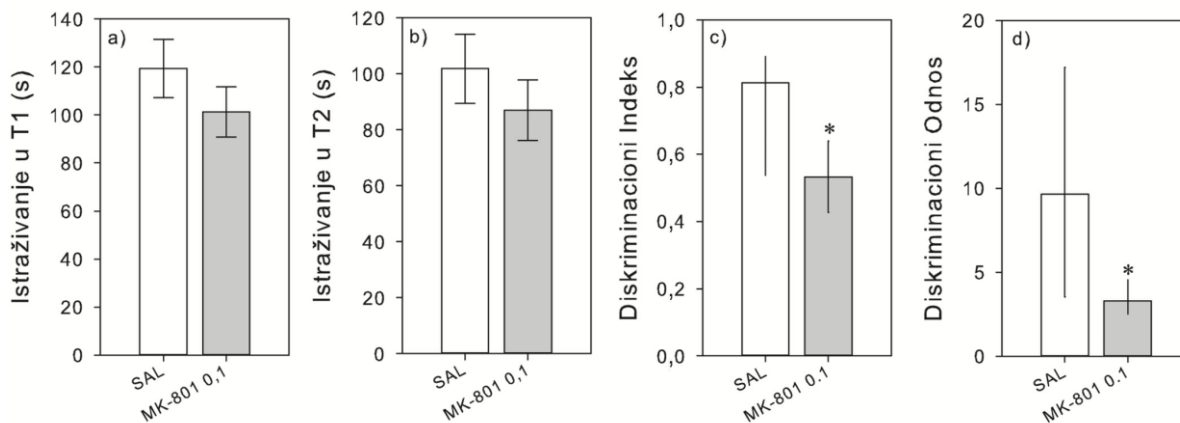


Slika 70. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 1 mg/kg skopolamina na vreme u perifernom prstenu (PP) (a) i vreme provedeno u SI kvadrantu (b). ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolu (SAL+SOL) grupu. Broj životinja u svim grupama bio je 8.

4.5 Procedura socijalnog prepoznavanja

4.5.1 Eksperiment 1

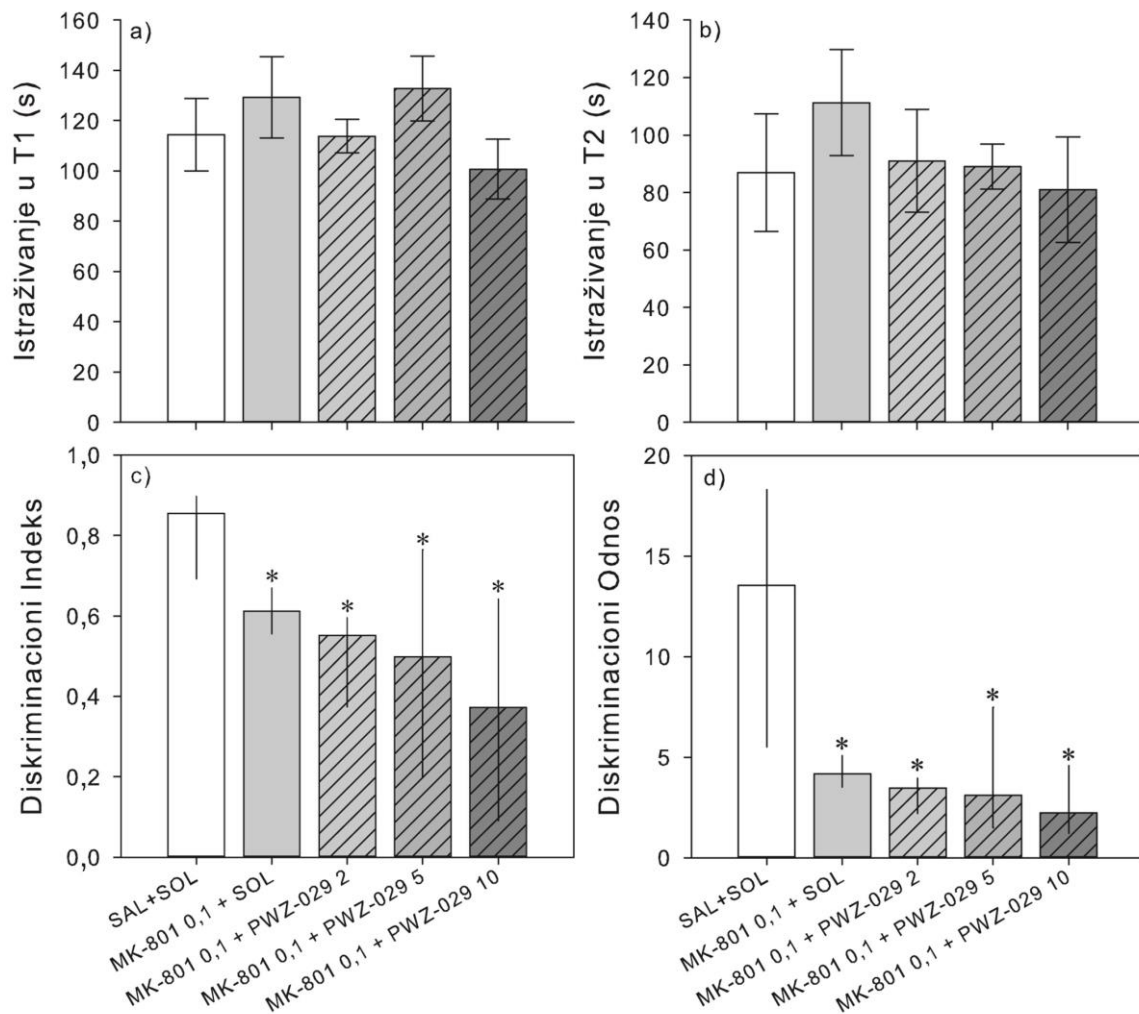
Ukupna vremena istraživanja u T1 i T2 nisu se razlikovala između životinja koje su pripadale MK-801 (0,1 mg/kg) i kontrolnoj grupi (Slika 71a i 71b). Parametri poput diskriminacionog indeksa i diskriminacionog odnosa imali su relativno drugačije vrednosti, ali neparametarska analiza je pokazala da oba parametra imaju iste statističke vrednosti ($H(1)=5,51$; $p=0,019$; Slika 71c i 71d).



Slika 71. Uticaj 0,1 mg/kg MK-801 na vreme istraživanja u T1 (a), vreme istraživanja u T2 (b), diskriminacioni indeks (c) i diskriminacioni odnos (d). * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (SAL) grupu. Broj životinja u grupama bio je: 11, 13.

4.5.2 Eksperiment 2

Ispitivanje uticaja PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na promene ponašanja izazvane primenom 0,1 mg/kg MK-801 u proceduri socijalne diskriminacije otkrilo je značajnost tretmana po parametrima diskriminacioni indeks i diskriminacioni odnos ($H(4)=12,38$; $p=0,015$). *Post hoc* SNK analiza je prikazana na Slici 72c i 72d. Ukupna vremena istraživanja u T1 i T2 nisu se razlikovala među životinjama koje su primale različite tretmane (Slika 72a i 72b), što ukazuje na specifičan efekat tretmana na kognitivne sposobnosti životinje u ovom testu.



Slika 72. Uticaj PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) i 0,1 mg/kg MK-801 na vreme istraživanja u T1 (a), vreme istraživanja u T2 (b), diskriminacioni indeks (c) i diskriminacioni odnos (d). * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (SAL) grupu. Broj životinja u svakoj grupi bio je 6.

5 DISKUSIJA

Dosadašnji rezultati u oblasti istraživanja povezanosti GABA-ergičkog neurotransmiterskog sistema i deficita viđenih u psihijatrijskim bolestima upućuju na mogućnost otkrivanja novih terapijskih pristupa koji bi se zasnivali na modulaciji određenih GABA_A receptora:

- GABA_A receptor je heteropentamer u čiji sastav može da uđe 19 proteinskih jedinica razvrstanih u više familija (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ i ρ 1-3; Sieghart, 2006).
- Ligandi koji deluju preko BDZ mesta vezivanja GABA_A receptora mogu biti pozitivni (agonisti), neutralni (antagonisti) ili negativni (inverzni agonisti) modulatori GABA-ergičke transmisije; pojedini ne mogu da dovedu do maksimalnog odgovora, pa se stoga nazivaju parcijalnim agonistima ili parcijalnim inverznim agonistima (Rudolph i Knoflach, 2011).
- Od velikog broja podtipova GABA_A receptora, samo oni koji sadrže α ₁, α ₂, α ₃, ili α ₅ podjedinicu u kombinaciji sa β i γ ₂ podjedinicom jesu osetljivi na BDZ (Olsen i Sieghart, 2008).
- Smatra se da se α ₁, α ₂ i α ₃ podjedinice nalaze pretežno u okviru sinapsi koje različiti tipovi interneurona formiraju sa piramidalnim ćelijama, a da su α ₅ GABA_A receptori lokalizovani pre svega ekstrasinaptički na dendritima; novija istraživanja dokazuju i prisustvo konstantnog nivoa α ₅ GABA_A receptora u sinapsi (Nyiri i sar., 2001; Brunig i sar., 2002; Brady i Jacob, 2015).
- Receptori sastavljeni od α ₅ β ₃ γ ₂ subjedinica (do 5% svih GABA_A receptora) posebno su zastupljeni u hipokampusu, a manje u dubljim kortikalnim slojevima, amigdaloidnom kompleksu, olfaktornom bulbusu i hipotalamusu (Rudolph i Möhler, 2014).
- Istraživanja modulacije α ₅ GABA_A receptora (inverzni agonisti i agonisti) potvrđuju važnu ulogu koju ovi receptori imaju u kognitivnim procesima, dok novija istraživanja pokazuju potencijalnu ulogu modulacije ovih receptora u oštećenjima povezanim sa shizofrenijom (Gill i sar., 2011; Redrobe i sar., 2012), Daunovim sindromom (Martínez-Cué i sar., 2014) i depresijom (Fischell i sar., 2015).

- Animalni modeli zasnovani na farmakološkim manipulacijama (primena amfetamina, dizocilpina i skopolamina) za izazivanje ili egzacerbaciju simptoma viđenih kod ljudi pokazuju jaku konstrukcijsku validnost (Weiner i Arad, 2009).
- U okviru MATRICS inicijative detaljno je opisana grupa bihevioralnih testova sa zadovoljavajućom validnošću, od kojih poseban značaj imaju testovi vizuelnog učenja i pamćenja (test prepoznavanja novog objekta, Morrisov vodeni lavirint), socijalne kognicije (procedura socijalnog prepoznavanja), kao i test lokomotorne aktivnosti (Young i sar., 2009).
- Izazivanja kognitivnog oštećenja upotrebom dizocilpina validirano je kod glodara kao pouzdani model za selektivno oštećenje memorije; pri većim dozama dolazi do hiperaktivnosti životinja i stereotipnog ponašanja, kao i ataksije (van der Staay i sar., 2011).
- Oštećenje ponašanja ogledne životinje indukovano amfetaminom dobro je okarakterisano kao model shizofrenije (Featherstone i sar., 2007; 2008).
- Primenom skopolamina kao zlatnog standarda za izazivanje kognitivnog oštećenja i hiperlokomocije kod glodara izaziva se i niz perifernih i centralnih efekata (Klinkenberg i Blokland, 2010).
- Promene viđene u GABA-ergičkom sistemu u shizofreniji uključuju smanjenje koncentracije GABA-e u korteksu, kao i smanjenu ekspresiju glutamat dekarboksilaze (GAD₆₇), parvalbumina i α_5 podjedinice GABA_A receptora u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu (Perry i sar., 1979; Lewis i sar., 2005; Duncan i sar., 2010).

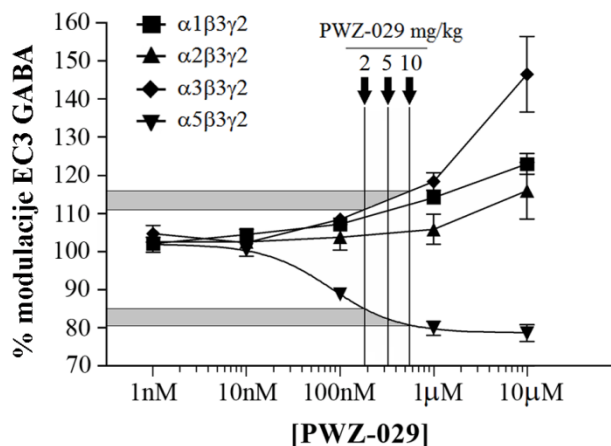
Na osnovu iznetih činjenica jasno je da su dalja ispitivanja uloge koju α_5 GABA_A receptori imaju u deficitima povezanim sa neuropsihijatrijskim bolestima, uz korišćenje selektivnih supstanci, dobro validiranih bihevioralnih modela i testova relevantnih za date bolesti, neophodna u cilju otkrivanja potencijalnog novog terapijskog pristupa.

5.1 Profili selektivnosti modulatora α_5 GABA_A receptora

Ispitivanja *in vitro* profila supstanci korišćenih za bihejvioralno testiranje ukazuju da sve supstance prolaze krvno moždanu barijeru i da se u velikoj meri može očekivati selektivnost za α_5 GABA_A receptore u određenim dozama. Iako na prvi pogled manje relevantan podatak za bihejvioralne efekte, koncentracije supstanci u plazmi koreliraju sa koncentracijama u mozgu, što upućuje na iste farmakokinetičke mehanizme. Primećeno je da se svi pozitivni modulatori „nakupljaju“ u moždanom tkivu, za razliku od PWZ-029, jedinog korišćenog predstavnika inverznih agonista selektivnih za BDZ mesto vezivanja α_5 GABA_A receptora. Određivanjem slobodnih frakcija brzom ekvilibrijumskom dijalizom omogućeno je procenjivanje slobodnih koncentracija. Dobijeni rezultati ukazuju da slobodne frakcije u mnogome zavise od hemijske strukture supstanci; predstavnici metil estara (MP-III-004 i SH-I-75) imaju dva puta veće slobodne frakcije u mozgu nego predstavnici etil estara (SH-053-2'F-R-CH3 i SH-I-047). Slično je primećeno posmatranjem slobodnih frakcija u plazmi, ali u obrnutom odnosu nego u moždanom tkivu. Relativno velike vrednosti slobodnih frakcija etil estara (68,6% za SH-053-2'F-R-CH3 i 65,9% za SH-I-047) praćene su velikom nestabilnošću u plazmi, što upućuje na izražen metabolizam i razgradnju ovih modulatora. Takva metabolička nestabilnost dovodi i do smanjenih ukupnih koncentracija ovih supstanci u plazmi određenih nakon 20 minuta u odnosu na ukupnu koncentraciju predstavnika metil estara, koji se odlikuju daleko većom stabilnošću. Nakon primene najveće doze liganada (10 mg/kg), gde ukupna srednja koncentracija u plazmi iznosi 337,6 nM za SH-053-2'F-R-CH3 i 54,8 nM za SH-I-047, a 1182,5 nM za MP-III-004 i 1434,8 nM za SH-I-75, razlika je najizraženija. Isti trend se može primetiti i za ukupne koncentracije izmerene u moždanom tkivu. Zbog navedenih razlika očekivano je da su potrebne nešto veće doze za izazivanje bihejvioralnih efekata primenom predstavnika etil estara. S druge strane, MP-III-022, amid po hemijskoj strukturi, karakteriše velika metabolička stabilnost u plazmi (nakon 4 h inkubacije preostala frakcija iznosi 96,7%), kao i dobra korelacija koncentracija u plazmi i mozgu nakon primene različitih doza.

Farmakokinetički podaci za ligande PWZ-029 i MP-III-022 pokazuju jasnu razliku u vremenu potrebnom da se dostigne maksimalna koncentracija u plazmi i moždanom tkivu. Vreme neophodno za postizanje maksimalne koncentracije (T_{max}) nakon *i.p.* primene tretmana je za PWZ-029 oko 10 minuta, a oko 1h za MP-III-022, što upućuje na razlike u

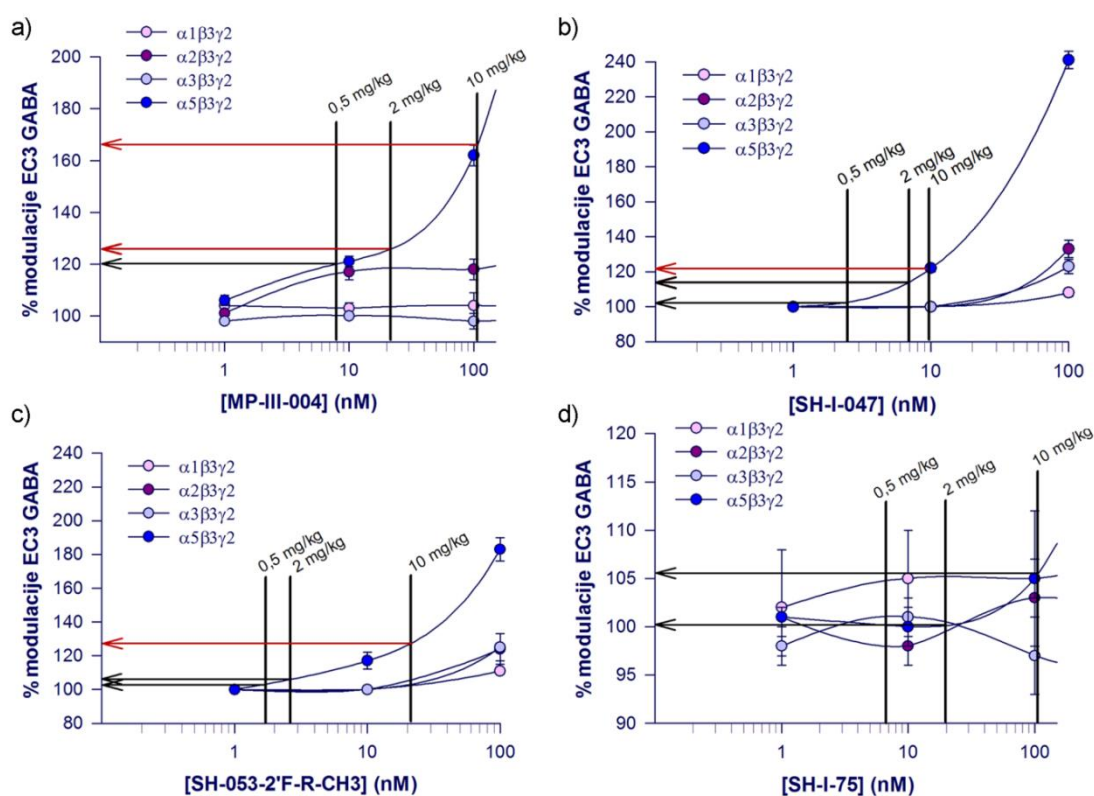
farmakokinetičkom ponašanju datih modulatora. Izračunati farmakokinetički parametri za PWZ-029 ukazuju na visoke koncentracije koje se mogu postići u plazmi i moždanom tkivu, sa relativno brzom eliminacijom.



Slika 1. Aproximativni elektrofiziološki odgovori procenjenih slobodnih koncentracija PWZ-029 u mozgu prikazani na krivama % modulacije EC3 GABA dobijenim na rekombinantnim GABA_A receptorima koji sadrže α₁-, α₂-, α₃- i α₅- podjedinicu. Rezultati elektrofiziološkog ispitivanja preuzeti iz: Savić i sar., 2008a.

Povezivanjem podataka procenjenih slobodnih koncentracija u mozgu nakon različitih doza PWZ-029 sa elektrofiziološkom efikasnošću PWZ-029 pri koncentraciji GABA-e koja postiže 3% maksimalnog efekta (% modulacije EC3 GABA, Slika 1) uviđa se selektivnost delovanja preko različitih populacija GABA_A receptora. Pri doznom opsegu od 2 do 10 mg/kg PWZ-029 ne očekuje se izražen agonistički efekat preko α₃β₃γ₂ receptora, iako je % modulacije uvećan za 11, odnosno 17%. S druge strane, % modulacije α₅β₃γ₂ receptora je umanjnjen za 15% do 19%, što odgovara efektu parcijalnog inverznog agoniste. Procenjeni elektrofiziološki odgovori slobodnih koncentracija PWZ-029 u mozgu upućuju da pri koncentraciji od 1 μM PWZ-029, što je koncentracija skoro dvostruko veća od one koja se postiže nakon doze od 10 mg/kg, mogu da se ostvare efekti potencijacije od 20% i 15% preko α₃β₃γ₂, odnosno α₁β₃γ₂ receptora. Kao poređenje, standardni neselektivni neutralni modulator flumazenil pri koncentraciji od 1 μM ostvaruje 56% i 30% pozitivne modulacije preko α₃β₃γ₂ odnosno α₂β₃γ₂ receptora, bez efekta na α₁β₃γ₂ receptore (Ramerstorfer i sar., 2010). Imajući u vidu da se u elektrofiziološkom *in vitro* eksperimentu primenom koncentracije od 1 μM PWZ-029 dobija modulacija od, preračunato, 3% i 7% maksimalne potencijacije GABA-ergičke transmisije postignute diazepamom na α₃β₃γ₂ odnosno α₁β₃γ₂ receptorima (komunikacija sa W. Sieghartom), nije izvesno da PWZ-029 može da ostvari

značajniji bihevioralni efekat delovanjem preko ovih receptora. U isto vreme, pri koncentraciji PWZ-029 od 1 μM postiže se modulacija $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ receptora koja iznosi približno 40% modulacije postignute neselektivnim negativnim modulatorom DMCM, i više od 100% modulacije koja se postiže parcijalnim neselektivnim negativnim modulatorom FG7142 (komunikacija sa W. Sieghartom). Na osnovu iznetih činjenica može se zaključiti da su $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ receptori najodgovorniji za bihevioralne efekte PWZ-029 (Savić i sar., 2008).



Slika 2. Aproximativni elektrofiziološki odgovori procenjenih slobodnih koncentracija liganada u mozgu prikazani na krivama % modulacije EC3 GABA dobijenim na rekombinantnim GABA_A receptorima koji sadrže α_1 -, α_2 -, α_3 - i α_5 - podjedinicu, za MP-III-004 (a), SH-I-047 (b), SH-053-2'F-R-CH3 (c) i SH-I-75 (d). Crvenom prikazana potencijacija modulacije $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ receptora preko 20%.

Kada procenjene slobodne koncentracije u mozgu nakon različitih doza (0,5; 2 i 10 mg/kg) stavimo u funkciju efikasnosti (% modulacije EC3 GABA) pri različitim koncentracijama liganda MP-III-004, vidimo da se pri dozi od 10 mg/kg postiže selektivnost na $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ receptor (Slika 2a). Pri dozama od 0,5 i 2 mg/kg MP-III-004 dostiže se oko 20% i 28% potencijacije na $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ receptoru, odnosno oko 15% i 18% na $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ receptoru. Opseg %

modulacije EC3 GABA pri različitim dozama SH-I-75 je između 100% i 106%, bez selektivnosti za pojedini tip receptora (Slika 2d). Kod predstavnika etil estara, selektivnost se može očekivati pri 10 mg/kg za SH-053-2'F-R-CH3 (oko 29% pozitivne modulacije EC3 GABA, Slika 2c), a za SH-I-047 pri 2 i 10 mg/kg, gde je % potencijacije EC3 GABA izraženiji pri većoj dozi (oko 22%) (Slika 2b).

Selektivnosti supstanci doprinosi i njihov afinitet za određene GABA_A receptore, što se dodatno mora uzeti u obzir pri povezivanju bihevioralnih efekata sa pojedinim podtipovima receptora. Dosadašnji rezultati dobijeni sa negativnim modulatorima α_5 GABA_A receptora pokazali su da se potencijalno terapijski prokognitivni efekat kod životinja ali i ljudi može dobiti pri okupiranosti α_5 GABA_A receptora između 25 i 75% (Atack, 2010). Iako nije utvrđeno koja od selektivnosti, po afinitetu ili efikasnosti, ima veću ulogu u tumačenju bihevioralnih efekata, teži se sintezi liganda koji će po *in vitro* profilu imati obe selektivnosti (Buettelmann i sar., 2009).

5.2 Test lokomotorne aktivnosti

Ispitivanje spontanog ponašanja životinje, procenom lokomotorne aktivnosti, neizostavni je deo bihevioralne karakterizacije novosintetisanih liganada. Pored uticaja na spontanu lokomotornu aktivnost, ovaj test nam omogućava i određivanje efekata supstanci na indukovano hiperlokomotorno ponašanje. Psihostimulansi poput amfetamina i kokaina povećavaju aktivnost životinje, praćeno parametrima pređenog puta i vremena provedenog u mobilnosti u ovom testu. Poznato je da amfetamin ispoljava svoje efekte povećavanjem ekstracelularnog dopamina i produžavanjem efekata koji se ostvaruju preko dopaminskih receptora u strijatumu (Fleckenstein i sar., 2007; Calipari i Ferris, 2013). Zbog toga je amfetaminom-indukovana promena ponašanja kod životinja često korišćen model u proceni antipsihotičnog dejstva supstanci (Featherstone i sar., 2007; 2008). Pokazano je da se hiperaktivnost izazvana primenom amfetamina može suzbiti antipsihoticima (haloperidolom i klozapinom), pri dozama za koje se navodi da same ne izazivaju promene u spontanoj lokomotornoj aktivnosti (O'Neill i Shaw, 1999).

U našem eksperimentu amfetamin dat u dozi od 0,5 mg/kg jasno je povećao vreme provedeno u aktivnosti, kao i ukupni pređeni put tokom 60 minuta praćenja. Izražena promena u ponašanju, u vidu hiperaktivnosti, potvrđena je i analizom petominutnih intervala. Kako bi u našim laboratorijskim uslovima potvrdili predikcionu validnost farmakološki indukovano oštećenja, ispitali smo efekte haloperidola na amfetaminom izazvanu hiperlokomociju. Očekivano prema literaturnim podacima na glodarima (Stanhope i sar., 2001), postignut je značajan efekat preveniranja hiperlokomotorne aktivnosti pri većoj ispitivanoj dozi (0,25 mg/kg), dok je manja doza (0,125 mg/kg) haloperidola bila nedovoljna za reverziju povećane aktivnosti. Dodatno, analizom spontane aktivnosti pod dejstvom haloperidola u toku 20 minuta pre davanja amfetamina, uočen je sedativni efekat haloperidola u obe primenjene doze. Dakle, manja doza haloperidola dovela je do smanjenja pređenog puta i vremena provedenog u mobilnosti, ali nije bila dovoljna da prevenira povećanje ovih parametara nakon primene amfetamina. Kako je sedacija dobro poznato neželjeno dejstvo haloperidola kao antipsihotika (Leucht i sar., 2013), razvoj efikasnih antipsihotika koji ne menjaju bazalni nivo motorne aktivnosti predstavlja izazov za predklinička istraživanja.

Poslednjih godina u supstance sa potencijalnim antipsihotičnim efektom ubrajaju se i one selektivne za α_5 podjedinicu GABA_A receptora. Ispitivan je uticaj negativnog (RO4938581) i pozitivnog modulatora α_5 GABA_A receptora (QH-II-066) na amfetaminom-izmenjeno ponašanje u testu lokomotorne aktivnosti (Redrobe i sar., 2012). Interesantno je da su oba vida modulacije α_5 GABA_A receptora smanjila hiperaktivnost, bez uticaja na bazalni nivo lokomocije. Rezultati ove studije dobijeni sa pozitivnim modulatorom (QH-II-066) u skladu su sa efektima pozitivne modulacije α_5 GABA_A receptora (SH-053-2'F-R-CH3) u preveniranju amfetaminom indukovane hiperaktivnosti u MAM neurorazvojnom modelu shizofrenije kod pacova (Gill i sar., 2011). Iako krajnje iznenađujuće, ovim istraživanjima je pokazano da oba vida modulacije α_5 GABA_A receptora, pozitivne i negativne, mogu imati povoljan efekat, u smislu suzbijanja pozitivnih simptoma shizofrenije. Mehanizmi ovih efekata, koji nisu dovoljno proučeni, upućuju na bidirekcionu ulogu α_5 GABA_A receptora u hiperdopaminergičkom stanju izazvanom amfetaminom. Shodno ovim rezultatima, u našim eksperimentima smo ispitali efekte jednog negativnog modulatora (PWZ-029) i nekoliko selektivnih pozitivnih modulatora (MP-III-022, MP-III-004, SH-I-047, SH-053-2'F-R-CH3 i SH-I-75) na hiperaktivnost izazvanu amfetaminom. Rezultati dobijeni sa PWZ-029, u ispitivanom rasponu doza, nisu otkrili potencijalan povoljan uticaj negativne modulacije.

Doze PWZ-029 korišćene u ovom eksperimentu odabrane su na osnovu *in vitro* ispitivanja, kako bi ispoljile selektivni efekat na α_5 GABA_A receptore. Nemogućnost PWZ-029 da prevenira hiperlokomociju izazvanu amfetaminom, posmatrajući oba parametra (pređeni put i vreme provedeno u mobilnosti), nije u skladu sa rezultatima dobijenim sa RO4938581 (Redrobe i sar., 2012). U periodu habituacije, pre primene amfetamina, u našem eksperimentu mogao se zapaziti potencijal hipolokomotornog uticaja više doze PWZ-029 (10 mg/kg), bez dostizanja statističke značajnosti, dok je sa 10 mg/kg RO4938581 hipolokomocija bila značajna (Redrobe i sar., 2012). Dodatno, pri karakterizaciji samog liganda, u nešto drugačijem protokolu testa lokomotorne aktivnosti, PWZ-029 u dozi od 10 mg/kg je ispoljio sedativni potencijal (Savić i sar., 2008a). Imajući na umu sedativni potencijal haloperidola, kao i hipoaktivnost koju mogu da izazovu više doze negativnih modulatora α_5 GABA_A receptora, može se zaključiti da je inherentni potencijal tipičnih antipsihotika da preveniraju efekte amfetamina superioran u poređenju sa negativnim modulatorima α_5 GABA_A receptora (Sun i sar., 2009).

Rezultati dobijeni sa pozitivnim modulatorima takođe upućuju na nemogućnost reverzije hiperaktivnosti izazvane amfetaminom. Za razliku od hipolokomotornog efekta samih negativnih modulatora pri praćenju bazalne aktivnosti, u ovom testu nije primećen sedativni efekat pri ispitivanim dozama pozitivnih modulatora α_5 GABA_A receptora. Dodatno, izostao je pozitivan efekat na amfetaminom-indukovanu promenu ponašanja, zapažen u studiji sa QH-II-066 (Redrobe i sar., 2012). Potencijalno pozitivan efekat na hiperaktivnost indukovanu amfetaminom, dobijen sa SH-053-2'F-R-CH3 u neurorazvojnog modelu (Gill i sar., 2011), nije reprodukovan kod zdravih životinja. U našem eksperimentu, SH-053-2'F-R-CH3 u istoj dozi od 10 mg/kg nije uspeo da smanji pređeni put niti vreme provedeno u aktivnosti nakon aplikacije amfetamina. Suprotno očekivanom, hiperlokomotorni efekat amfetamina bio je izraženiji kod životinja tretiranih SH-053-2'F-R-CH3. Ovo produblјivanje efekta se može pripisati izmenjenom nivou aktivacije dopaminskog sistema kod MAM neurorazvojnog modela, gde jasno postoji osetljivost na amfetamin u odnosu na zdrave životinje (Lodge i Grace, 2007; 2008). Iako ovo može biti objašnjenje za različit uticaj istog liganda (SH-053-2'F-R-CH3) na efekte amfetamina, činjenica je da ni sa jednim pozitivnim modulatorom α_5 GABA_A receptora nismo dobili efekat sličan onom sa QH-II-066 (Redrobe i sar., 2012), što upućuje na nereproducibilnost akutnog izazivanja psihotičnog stanja kod životinja kao animalnog modela. Protokol i doza od 0,5 mg/kg amfetamina izabrani su na osnovu literaturnih podataka i zbog mogućnosti poređenja

rezultata. Ipak, ne može se odbaciti pretpostavka da je u našim uslovima ova doza amfetamina izazivala efekte koje ligandi bez izraženog sedativnog dejstva nisu bili u stanju da preveniraju.

U testu lokomotorne aktivnosti MK-801 izaziva poremećaje lokomotornog ponašanja slične amfetaminu. Pri praćenju uticaja MK-801 (0,1; 0,2 i 0,5 mg/kg) na ponašanje pacova u testu lokomotorne aktivnosti u toku 30 minuta nedvosmisleno je primećena hiperaktivnost pri dozi od 0,2 mg/kg. Efekat manje testirane doze (0,1 mg/kg) nije dostigao statističku značajnost, dok se pri većoj dozi MK-801 (0,5 mg/kg), koja je prema pređenom putu bila na nivou kontrole, zapravo ispoljilo ataksično dejstvo. Ovome u prilog govori i podatak da su sve tretirane grupe provodile više vremena u aktivnosti. Naši rezultati su konzistentni sa nalazima drugih istraživačkih grupa, koji pokazuju da kod mužjaka glodara doze niže od 0,2 mg/kg uglavnom ne izazivaju hiperaktivnost, stereotipno ponašanje i ataksiju, dok su znatno veće doze MK-801 (0,5 mg/kg) potrebne za izazivanje ataksije (Andiné i sar., 1999; van der Staay i sar., 2011). Zbog relativno reproducibilnih efekata MK-801 na lokomotornu aktivnost, relevantnih za pozitivnu simptomatologiju shizofrenije, temeljno je proučavan efekat antipsihotika na hiperaktivnost indukovanu sa MK-801 (Gattaz i sar., 1994; Andiné i sar., 1999; Leite i sar., 2008; Kołaczkowski i sar., 2014). Slično amfetaminu, primećeno je da povoljan efekat ispoljavaju oni antipsihotici koji u dozama efikasnim u smanjenju MK-801-indukovane hiperlokomocije izazivaju značajnu sedaciju (Kołaczkowski i sar., 2014). Rezultati istraživanja uticaja diazepama na hiperaktivnost izazvanu sa MK-801 nisu istosmerni. Dok jedni autori govore o aditivnom delovanju MK-801 i diazepama na stereotipno ponašanje kod pacova (Behrens i Gattaz, 1992), drugi pokazuju smanjenje aktivnosti kod miševa (Bradford i sar., 2010). Pozitivan uticaj diazepama je viđen i kod ženki pacova, koje ispoljavaju veću osetljivost na efekte MK-801, ali je doza diazepama koja je uspela da izvrši reverziju stereotipnog ponašanja i hiperlokomocije bila toliko velika (5 mg/kg) da je uticala na refleks uspravljanja (Andiné i sar., 1999), što pokazuje neselektivnost uticaja na ponašanje. U našim eksperimentima diazepam je samo u najvećoj testiranoj dozi (5 mg/kg) delimično prevenirao hiperlokomociju izazvanu sa MK-801 (0,2 mg/kg). Međutim, pri dozi od 5 mg/kg diazepam je značajno smanjio vreme u kome su životinje tretirane sa MK-801 bile aktivne, što direktno koreliše sa izraženim sedativnim potencijalom ovako visoke doze benzodiazepina. Očekivano, niska doza diazepama (1 mg/kg) nije imala efekte na povećanu aktivnost, dok je doza od 2 mg/kg diazepam parcijalno smanjila pređeni put. Za veme provedeno u aktivnosti ANOVA nije dostigla

statističku značajnost usled velike varijacije u grupi koja je primala 0,2 mg/kg MK-801 i 2 mg/kg diazepam, tako da se o potencijalnom pozitivnom efektu na ukupnu aktivnost ne može govoriti.

Pozitivni i negativni modulatori α_5 GABA_A receptora nisu do sada ispitivani u modelima MK-801-indukovane hiperaktivnosti. Naši rezultati su jednoznačno pokazali da se pri većim ispitivanim dozama negativnog modulatora ispoljava parcijalno smanjenje hiperlokomocije (za doze od 5 i 10 mg/kg PWZ-029 nakon 30 minuta, i za 10 mg/kg i nakon 60 minuta trajanja testa), bez efekta na vreme provedeno u aktivnosti. Slično dozi od 2 mg/kg diazepam, ovi rezultati su u korelaciji sa sedaciji-bliskim potencijalom PWZ-029, budući da je pokazano da u višim dozama PWZ-029 (10 i 20 mg/kg) izaziva značajno smanjenje lokomocije (Savić i sar., 2008a). Eksperimenti sa pozitivnim modulatorom α_5 GABA_A receptora – SH-I-75 ukazali su na nemogućnost preveniranja promena u ponašanju izazvanih primenom 0,2 mg/kg MK-801 u dozama (0,5 i 5 mg/kg) koje same nemaju efekta na praćene parametre lokomotorne aktivnosti u toku 30 minuta. Isto je dobijeno i praćenjem efekata 0,2 mg/kg SH-I-75 na hiperaktivnost tokom 60 minuta praćenja.

Slično nalazima sa MK-801, eksperiment sa skopolaminom-indukovanom hiperaktivnošću ukazao je, praćenjem pređenog puta, na parcijalno pozitivan efekat PWZ-029 (2 mg/kg), ali ne i SH-I-75 (0,2 mg/kg). Ipak, ni pozitivna ni negativna modulacija α_5 GABA_A receptora nisu bile u stanju da smanje vreme provedeno u aktivnosti nakon primene skopolamina. Iako se primenom MK-801 i skopolamina deluje na različite neurotransmiterske sisteme, uključene u izazivanje hiperaktivnosti, zaključak je da se negativnom modulacijom α_5 GABA_A receptora mogu ostvariti određeni povoljni efekti.

5.3 Test prepoznavanja novog objekta

U NORT-u smo ispitivali uticaj neselektivnog negativnog modulatora GABA_A receptora (0,25 mg/kg DMCM), skopolamina (0,3 mg/kg) i tri doze negativnog modulatora selektivnog za α_5 GABA_A receptore (2; 5 i 10 mg/kg PWZ-029) nakon retencionog intervala od 24 h. U ovakvom testu prepoznavanja novog objekta protokolarno je smanjena sposobnost diskriminacije novog objekta u grupi kontrolnih životinja, što omogućava otkrivanje potencijalnog prokognitivnog dejstva ispitivane supstance (Ennaceur i Meliani, 1991). Smatra se da peririnalni korteks, koji ima ulogu u prepoznavanju objekata, nije u mogućnosti da sačuva informacije o objektu pri dužim retencionim vremenima kod kontrolnih životinja (Murray i Richmond, 2001; Reger i sar., 2009). Negativni modulatori α_5 GABA_A receptora su dobro okarakterisani kao potencijalno prokognitivne supstance u nizu bihevioralnih testova (Atack i sar., 2006; Collinson i sar., 2006; Dawson i sar., 2006; Savić i sar., 2008a; Ballard i sar., 2009; Atack, 2010; 2011b; Soto i sar., 2013), a PWZ-029 je sada po prvi put ispitan u NORT-u kao testu deklarativne memorije. Naši rezultati pokazuju sposobnost PWZ-029 da prepozna novi objekat i nakon dužeg retencionog vremena u svim ispitivanim dozama, dok su skopolamin i DMCM bili na nivou kontrolnih životinja. Praćenjem parametara prepoznavanja novog objekta (vremena provedena u istraživanju poznatog i novog objekta i diskriminacionog indeksa), jasno je uočen prokognitivni potencijal PWZ-029. Dobijeni rezultat je komplementaran nalazima da pri sistemske i centralnoj (peririnalni korteks) primeni, BDZ ostvaruju oštećujući efekat u NORT-u, potvrđujući ulogu GABA-ergičkog sistema u regulaciji ovakvog vida učenja (Longone i sar., 1996; Wan i sar., 2004; Bertaina-Anglade i sar., 2006). Pošto su u pomenutim studijama korišćeni neselektivni agonisti BDZ mesta vezivanja, ostaje nepoznato da li je oštećujući efekat ostvarivan delovanjem preko najrasprostranjenijih GABA_A receptora, koji sadrže α_1 subjedinicu, ili aktivacijom α_5 GABA_A receptora, čije je prisustvo limitirano pre svega na hipokampus i određene kortikalne strukture (Pirker i sar., 2000; Rudolph i Möhler, 2014). Naš rezultat po prvi put pokazuje da se pozitivan efekat može ostvariti sistemskom primenom inverznog agoniste BDZ mesta vezivanja selektivnog za α_5 GABA_A receptore kod zdravih pacova, upućujući na bitnu ulogu koju ova populacija GABA_A receptora ima u ovakvom tipu memorijskih procesa. Dodatno, pri dozi od 5 mg/kg PWZ-029 došlo je do smanjenja brzine kretanja u odnosu na grupu koja je primala

skopolamin, i to čak 24 sata nakon primanja tretmana. Takav kognitivno nespecifičan efekat na ponašanje životinja može se pripisati hiperlokomotornom dejstvu skopolamina s jedne strane, i smanjenju motivacije kod negativne modulacije α_5 GABA_A receptore s druge strane (Hauser i sar., 2005; Klinkenberg i Blokland, 2010).

Translaciona validnost kognitivnih testova, pa i testa prepoznavanja novog objekta, veća je ukoliko se povoljan efekat supstance pokaže i na farmakološki indukovanim promenama kognitivnih funkcija (Decker, 2006; Keeler i Robbins, 2011). Zato smo pored protokolarnog oštećenja koristili i smanjenje diskriminacije novog objekta primenom skopolamina i MK-801. U odvojenim eksperimentima smo procenili efekte različitih doza MK-801 i skopolamina na učenje u NORT-u i na osnovu njih izabrali doze za eksperimente sa PWZ-029. MK-801 je već okarakterisan kao dobar model za oštećenje učenja i veliki broj supstanci ispitivan je na mogućnost da izazovu reverziju MK-801-izazvanog deficita (van der Staay i sar., 2011). Naši rezultati su bili u skladu sa rezultatima drugih studija (de Lima i sar., 2005; van der Staay i sar., 2011), gde je izabrana doza od 0,1 mg/kg MK-801, kao pouzdana za umanjenje kognitivnih sposobnosti životinja. Pri većoj dozi (0,2 mg/kg) diskriminacioni indeks je bio negativan, a uz to je pri ovoj dozi bila jako izražena hiperaktivnost životinja u testu familijarizacije u odnosu na sve ostale tretmane (praćeno preko pređenog puta i brzine kretanja životinja). Ova izražena hiperaktivnost se zadržala i nakon 1 h, za vreme testiranja, ali zbog velikih devijacija ANOVA nije dostigla značajnost.

Uticaj PWZ-029 na MK-801 (0,1 mg/kg) – izazvano smanjenje diskriminacije novog objekta ispitivan je praćenjem parametara učenja. Kontrolna grupa i životinje koje su primale kombinaciju MK-801 i 5 mg/kg PWZ-029 pokazale su statistički značajnu diskriminaciju (prepoznavanje) novog objekta. U ovom testu viđen je odnos doze i efekta u obliku inverznog slova U, što je svakako karakteristično za efekte prokognitivnih lekova (Decker, 2006). Nedostatak pozitivnog efekta manje i veće doze PWZ-029 upućuje na neophodnost postizanja odgovarajućeg stepena modulacije α_5 GABA_A receptora. Dodatno je primećen i negativan uticaj kombinacije 2 mg/kg PWZ-029 i MK-801 na diskriminacioni indeks, koji je u ovoj grupi dostigao negativnu vrednost. Produbljenje oštećenja dodatkom male doze PWZ-029 dizocilpinu potvrđuje nalaze da mali stepen modulacije α_5 GABA_A receptora doprinosi hipofunkciji NMDA receptora. S druge strane, praćenjem parametara opšte aktivnosti (pređeni put i brzina), primećen je hiperlokomotorni uticaj u toku familijarizacije kod svih grupa koje su primale MK-801, s time da je statistička značajnost

postignuta jedino u grupi životinja koja je primala samo MK-801. U fazi testiranja se zadržala povećana aktivnost životinja koje su primale MK-801, ali je statistička razlika sada postojala samo u grupama koje su primale kombinacije tretmana (2; 5 i 10 mg/kg PWZ-029 i 0,1 mg/kg MK-801). Ove kognitivno nespecifične razlike u ponašanju su mogle da se primete i posmatranjem ukupnog vremena provedenog u istraživanju objekata za vreme familijarizacije, gde su sve životinje koje su primale MK-801, sâm ili u kombinaciji, imale smanjeno vreme istraživanja. Van der Staay i sar. (2011) su pokazali da 0,1 mg/kg MK-801 može značajno da smanji ukupno vreme istraživanja objekata u toku faze familijarizacije. Isto zapažanje u našem eksperimentu potvrđuje da doza od 0,1 mg/kg MK-801 ne pogada selektivno kognitivne aspekte, i upućuje na neophodnost razmatranja potencijalnih motivacionih i senzornomotornih promena ponašanja. Imajući u vidu činjenicu da i nedostatak α_5 GABA_A receptora može da dovede do senzornomotornih oštećenja (Hauser i sar., 2005), ne čudi efekat smanjenja vremena istraživanja u kombinaciji tretmana (MK-801 i PWZ-029). Pokazano je da antipsihotici druge generacije (klozapin, olanzapin) mogu da preveniraju senzornomotorne deficite izazvane primenom MK-801 (Bubeníková i sar., 2005), te se pored povoljnog efekta PWZ-029 na kogniciju, u obzir moraju uzeti nespecifične promene ponašanja kada se govori o PWZ-029, ili nekom drugom negativnom modulatoru α_5 GABA_A receptora, kao potencijalnoj terapijskoj opciji. S druge strane, pokazano je da nespecifične promene videne u NORT-u, vezane za vreme istraživanja objekata u toku familijarizacije, ne utiču na stepen diskriminacije u fazi testiranja (Gaskin i sar., 2010). Dakle, iako ih treba razmatrati, takve promene ne utiču bitno na zaključke vezane za kognitivne uticaje ispitivanih liganada. Dok negativni modulatori α_5 GABA_A receptora nisu ispitivani u modelu kognitivnog deficita izazvanog primenom MK-801, RO4938581 je ispitivan u modelu fenciklidinom izazvanog kognitivnog deficita u NORT-u (Redrobe i sar., 2012). Rezultati dobijeni u fenciklidinom indukovanom modelu hipofunkcije NMDA receptora konzistentni su sa našima; subhronična primena fenciklidina je smanjivala sposobnost diskriminacije, dok je negativna modulacija α_5 GABA_A receptora postignuta primenom RO4938581 dozno-zavisno prevenirala promene u kognitivnim procesima (Redrobe i sar., 2012). Dodatno, iako RO493858 nije uticao na ukupno vreme istraživanja objekata, u kognitivno aktivnoj dozi je u kombinaciji sa fenciklidinom značajno smanjivao pređeni put, što je i u ovoj studiji upućivalo na nekognitivne elemente uticaja na ponašanje.

U skladu sa definisanom ulogom koju acetilholin ima u testu prepoznavanja novog objekta (Sambeth i sar., 2007), skopolaminom izazvano smanjenje učenja u NORT-u korišćeno je u brojnim istraživanjima (Dodart i sar., 1997; Woolley i sar., 2003; de Bruin i sar., 2011). U eksperimentu sa skopolaminom, ispitali smo i efekat diazepama (2 mg/kg) nakon retencionog vremena od 1 h. Doza skopolamina koja je pouzdano uticala na smanjenje učenja bila je 0,3 mg/kg i izabrana je za eksperiment sa PWZ-029. Ranije studije na miševima upućivale su na oštećujući efekat BDZ (male doze alprazolama i diazepama) u NORT-u nakon retencionog vremena od 10 minuta i 1 h (Bertaina-Anglade i sar., 2006), tako da su naši rezultati sa 2 mg/kg diazepama bili očekivani. Pored negativnog uticaja diazepama na kognitivne sposobnosti, u testu je primećena i hipolokomocija, smanjenje brzine kretanja i pređenog puta u odnosu na kontrolu, ali i razlika u fazi familijarizacije između diazepama i grupa tretiranih skopolaminom. U fazi testiranja, grupa diazepama se razlikovala samo od 0,1 i 1 mg/kg skopolamina. Ove razlike u ponašanju, hipoaktivnost izazvana diazepamom i hiperaktivnost izazvana skopolaminom, u skladu su i sa efektima ovih supstanci viđenim u drugim testovima (Savić i sar., 2009; Klinkenberg i Blokland, 2010). U eksperimentu praćenja uticaja PWZ-029 na promene ponašanja izazvane skopolaminom (0,3 mg/kg) otkriven je pozitivan efekat doze od 2 mg/kg PWZ-029. Iako je ova grupa životinja pokazala dobar nivo diskriminacije, ukupno vreme istraživanja u familijarizaciji bilo je smanjeno pri dozama od 2 i 5 mg/kg PWZ-029 u kombinaciji sa skopolaminom. U testiranju se grupa koja je primila skopolamin i PWZ-029 u dozi od 5 mg/kg razlikovala od kontrolne i grupe koja je bila samo pod uticajem skopolamina. Ovaj nalaz je potvrdio rezultate dobijene sa MK-801, gde se pri interpretaciji rezultata pored reverzije kognitivnog deficita mora uzeti u obzir i senzornomotorno oštećenje izazvano primenom negativnih modulatora α_5 GABA_A receptora. Hipoteza da negativna modulacija GABA_A receptora može da olakša holinergičku transmisiju i tako poboljša kognitivne funkcije bazira se na činjenici da holinergički putevi primaju jake inhibitorne GABA-ergičke uticaje u regijama mozga uključenim u procese učenja (Sarter i Schneider, 1988; Imperato i sar., 1994). Rezultati sa PWZ-029 dalje potvrđuju ovu hipotezu, iako je pozitivni efekat viđen samo sa najmanjom testiranom dozom. Izostanak povoljnog efekta posle primene viših doza PWZ-029 mogao bi da se protumači kao nespecifičan bihejvoralni uticaj kombinovanog tretmana. Ipak, pokazano je da smanjenje ukupnog vremena istraživanja, kakvo je viđeno pri kombinovanom tretmanu sa 5 mg/kg PWZ-029 i skopolaminom, ne utiče na diskriminacione sposobnosti životinja (Gaskin i sar., 2010). Dodatno, pošto je

pokazana *in vitro* selektivnost svih testiranih doza PWZ-029 za α_5 GABA_A receptore malo je verovatno da se pri većim dozama ostvaruju efekti posredovani $\alpha_{1/2/3}$ GABA_A receptorima.

Uticaj pozitivne modulacije α_5 GABA_A receptora na efekte u NORT-u nismo ispitivali, jer je u studiji sa QH-II-066, umereno selektivnim agonistom BDZ mesta vezivanja na α_5 GABA_A receptorima, nađeno značajno smanjenje sposobnosti diskriminacije objekata u odnosu na kontrolne životinje (Redrobe i sar., 2012).

5.4 Morisov vodeni lavirint

U odnosu na NORT koji prati kognitivne sposobnosti životinja, Morisov vodeni lavirint je model kojim se procenjuje efikasnost pri učenju, na primer testira da li životinje koje primaju određeni tretman efikasnije nalaze sakrivenu platformu u odnosu na kontrolne životinje (Lynch i sar., 2011). U verziji radne memorije Morisovog vodenog lavirinta, platforma menja položaj svakog dana, te se efikasnost procenjuje na osnovu naučenog u toku prvog i drugog pokušaja u svakom danu. Pokazano je da miševi sa uklonjenim α_5 GABA_A receptorima (*knock-out*), kao i pacovi koji primaju inverznog agonistu BDZ mesta vezivanja selektivnog za α_5 GABA_A receptore, efikasnije nalaze platformu od kontrolnih životinja (Collinson i sar., 2002; 2006). U protokolu koji testira referentnu prostornu memoriju (platforma ostaje na istom mestu), zaključak o povoljnom efektu tretmana izvodi se posmatranjem niza parametara: latencija, pređeni put, efikasnost puta do pronalaska platforme u fazi učenja. U takvom protokolu Morisovog vodenog lavirinta ispitali smo efekte pozitivne i negativne modulacije α_5 GABA_A receptora na prostorno učenje. Ranije smo već pokazali da je efikasnost liganda PWZ-029 u ovom testu na kontrolnom nivou, a njegova nemogućnost da ispolji prokognitivni efekat razmatrana je u svetlu uloge koju ima modulacija GABA_A receptora sa kako α_5 , tako i α_1 podjedinicom (Savić i sar., 2009; Milić i sar., 2013). Dodatno, iako oba protokola Morisovog vodenog lavirinta (radne i referentne memorije), testiraju prostornu memoriju, njima se ispituju kognitivni procesi koji uključuju drugačije neurobiološke mehanizme, te su verovatno u različitom stepenu osetljivi na modulaciju α_5 GABA_A receptora (Lindner i sar., 1992; Frick i sar., 1995). Izabran je pristup smanjenja kognitivnih sposobnosti kontrolnih životinja kako bi se omogućila procena

prokognitivnog efekta PWZ-029 (Milić i sar., 2013). U toku akvizicije životinje su imale dva plivanja dnevno umesto četiri kao u standardnom protokolu Morisovog vodenog lavirinta. U takvom protokolu ispitivan je još jedan negativni modulator α_5 GABA_A receptora, RY-023 (3; 7,5 i 15 mg/kg), čiji uticaj na učenje i pamćenje ne samo da nije bio pozitivan, već je praćenjem parametra efikasnosti puta petog dana akvizicije u svim testiranim dozama pokazano smanjenje kognitivnih sposobnosti (rezultati eksperimenta nisu prikazani). Pošto podataka za efekte pozitivne modulacije u vodenom lavirintu nije bilo, u standardnom protokolu ispitali smo uticaj različitih doza (0,5; 2 i 5 mg/kg) pozitivnog modulatora α_5 GABA_A receptora, SH-I-75, zajedno sa 2 mg/kg PWZ-029. Očekivano, nije otkrivena razlika u sposobnosti učenja među grupama. Ipak, posmatranjem testa pozivanja memorije, otkrivena je razlika između grupa koje su primale 0,5 mg/kg i 5 mg/kg SH-I-75, pri čemu je najbolja efikasnost do prvog ulaska u ciljni region zabeležena kod grupe koja je primala najveću dozu SH-I-75 (5 mg/kg). Iako po tom parametru ANOVA nije dostigla statističku značajnost, jasno se uočavalo da životinje koje su svih pet dana učenja primale 5 mg/kg SH-I-75 imaju odličnu efikasnost, veću od 0,8, što je bolje od kontrolnih životinja. Ovaj efekat, sličan hormezi (Calabrese i Baldwin, 2002; Mattson, 2008), gde sa malim stepenom pozitivne modulacije (0,5 mg/kg) smanjujemo, a sa većim stepenom modulacije (5 mg/kg) uvećavamo sposobnost pokazivanja naučenog, upućuje na postojanje bifaznog odnosa doze i efekta pri modulaciji α_5 GABA_A receptora. Nedostatak prokognitivnog efekta negativne modulacije (PWZ-029 i RY-023), i neočekivan pozitivan efekat na pokazivanje naučenog pri pozitivnoj modulaciji (SH-I-75), moraju se posmatrati i u svetlu nesavršenosti animalnog modela. Naime, dok pri primenjenom parametarskom oštećenju imamo smanjenje kognitivnih sposobnosti zdravih životinja koje ne liči na kognitivnu disfunkciju viđenu u stanju bolesti, potencijalno pozitivan rezultat može biti lažan, i obrnuto. Slično, pri uslovima gde zdravim životinjama nisu smanjene sposobnosti učenja, potencijalno pozitivan rezultat tretmana ne znači nužno da bi takav efekat bio ostvaren i kod postojanja patološkog procesa (Decker, 2006).

U Morisovom vodenom lavirintu, kao i u prethodnim testovima, koristili smo farmakološko indukovanje smanjenja učenja skopolominom i MK-801 i posmatrali uticaj pozitivne i negativne modulacije α_5 GABA_A receptora na date promene u kognitivnim sposobnostima. U eksperimentu sa MK-801 ispitivana je dozna zavisnost efekta, u cilju pronalaženja doze koja bi selektivno delovala na kognitivne aspekte. Rezultati su pokazali da životinje tretirane sa 0,1 i 0,15 mg/kg MK-801 imaju manju latenciju nalaska platforme od kontrole u

toku faze akvizicije. Pri najvišoj dozi MK-801 (0,15 mg/kg) ispoljene su neselektivne promene u ponašanju (smanjenje brzine plivanja tokom učenja), pa je doza od 0,1 mg/kg izabrana za eksperimente sa PWZ-029 i SH-I-75. U testu pozivanja naučenog, po svim praćenim parametrima kognicije, životinje tretirane dozama od 0,1 i 0,15 mg/kg MK-801 razlikovale su se od grupa koje su primile 0,07 mg/kg MK-801 ili fiziološki rastvor. Ispitivanje efekta negativne modulacije α_5 GABA_A receptora na smanjenje sposobnosti učenja izazvano delovanjem 0,1 mg/kg MK-801 pokazalo je parcijalnu reverziju oštećenja sa najmanjom dozom PWZ-029 (2 mg/kg). Grupa koja je primala kombinaciju 2 mg/kg PWZ-029 i 0,1 mg/kg MK-801 razlikovala se po latenciji nalaska platforme od MK-801 i kontrolne grupe, ali i od kombinacije 10 mg/kg PWZ-029 i 0,1 mg/kg MK-801. Dodavanjem 10 mg/kg PWZ-029 dozi od 0,1 mg/kg MK-801 došlo je do značajnog smanjenja brzine plivanja i produbljenja promena ponašanja izazvanih primenom MK-801. U testu pozivanja, primena PWZ-029 pokazala je nemogućnost reverzije smanjene sposobnosti pokazivanja naučenog, procenjeno praćenjem pređenog puta i vremena provedenog u ciljnom regionu. Iako statistička analiza za latenciju do prvog ulaska u ciljni region nije dostigla značajnost, kontrolne životinje su imale vrednosti latencije za 50% manje od ostalih grupa. U eksperimentu sa SH-I-75, pozitivnim modulatorom na α_5 GABA_A receptorima, nije došlo do reverzije oštećenja akvizicije nastale primenom MK-801. U ovom eksperimentu nisu postojale razlike u brzini plivanja među životinjama, što potvrđuje izostanak ne-kognitivnih promena u ponašanju. U testu pozivanja, sve grupe koje su primale MK-801 razlikovale su se od kontrole, čime je pokazano da je SH-I-75 bio bez efekta na izazvani kognitivni deficit. Dodatno, praćenjem parametra efikasnost puta do prvog ulaska u ciljni region primećena je razlika između grupe koja je primala kombinaciju 2 mg/kg SH-I-75 i 0,1 mg/kg MK-801 u odnosu na kontrolu, čime je još jednom potvrđen izraženiji oštećujući efekat ove kombinacije u odnosu na sâm MK-801. Iako nema studija koje procenjuju efekte modulacije α_5 GABA_A receptora na nedostatke u prostornoj memoriji izazvane primenom antagoniste NMDA receptora (kojim se oponaša hipofunkcija NMDA receptora viđena u shizofreniji), naši rezultati su konzistentni sa hipotezom da negativna modulacija α_5 GABA_A receptora može imati potencijal terapijske primene kod kognitivnih deficita povezanih sa shizofrenijom (Redrobe i sar., 2012). S druge strane, kao potencijalna terapijska opcija kod kognitivnih deficita povezanih sa shizofrenijom predložena je i pozitivna modulacija α_5 GABA_A receptora (Gill i Grace, 2014), ali naši rezultati u Morisovom vodenom lavirintu ne upućuju na takvu mogućnost.

Kao drugi farmakološki agens za izazivanje deficita pri učenju u vodenom lavirintu korišćen je skopolamin. U eksperimentu koji je ispitivao odnos doze i efekta, jasno se izdvojila doza od 1 mg/kg skopolamina pri kojoj je latencija do nalaska platforme duža nego kod kontrolnih životinja, ali i onih koje su primile 0,3 mg/kg skopolamina. Pored efekta na latenciju nalaska platforme, pri dozi skopolamina od 1 mg/kg povećan je pređeni put u odnosu na sve ostale tretmane. Grupa pacova koja je bila pod uticajem najveće doze skopolamina (1 mg/kg) imala je i manju efikasnost puta od grupe koja je primala 0,03 mg/kg skopolamina, dok je brzina plivanja bila veća od kontrolne grupe i svih ostalih tretmana. Iako pri dozi od 1 mg/kg nisu mogle da se odvoje kognitivne promene u ponašanju od senzornomotornih, niža doza skopolamina (0,3 mg/kg) nije bila pouzdana za izazivanje kognitivnih deficita, i nije izabrana za dalje eksperimente. Naime, dok pri dozi od 0,3 mg/kg nije bilo jasnih kognitivnih oštećenja, brzina plivanja je bila različita od grupa koje su primale manje doze skopolamina (0,03 i 0,1 mg/kg). U analizi testa pozivanja, ANOVA nije dostigla značajnost za parametre procene naučenog, ali je najveći pređeni put i vreme provedeno u ciljnom regionu imala grupa koja je primala 0,03 mg/kg skopolamina. Posmatrajući vreme provedeno u perifernom prstenu, kao meru tigmotaksičnog ponašanja, najmanja vremena su imala životinje koje su bile pod uticajem 0,03 mg/kg skopolamina, a najviša one tretirane sa 0,1 mg/kg i 1 mg/kg skopolamina. Skopolamin je korišćen za procenu efekata negativne modulacije α_5 GABA_A receptora na kognitivne funkcije imajući u vidu nesavršenosti ovog farmakološkog agensa u izazivanju smanjenja kognitivnih funkcija, koje se ogledaju u neselektivnosti uticaja na pojedine aspekte ponašanja (Klinkenberg i Blokland, 2010).

Uloga negativne modulacije α_5 GABA_A receptora ispitivana je praćenjem uticaja PWZ-029 (2; 5 i 10 mg/kg) na smanjenje sposobnosti učenja izazvano skopolaminom (1 mg/kg). Svi parametri analizirani za fazu akvizicije nedvosmisleno pokazuju negativne efekte inverznog agoniste BDZ mesta vezivanja α_5 GABA_A receptora na skopolaminom indukovano oštećenje. Po parametru procenta pređenog puta u perifernoj zoni životinje tretirane skopolaminom i kombinacijom skopolamina i 5 mg/kg PWZ-029 razlikovale su se od kontrolnih, dok su ostali tretmani bili na nivou kontrole. Ovim se može zaključiti da je pri određenim dozama PWZ-029 uspeo da smanji tigmotaksiju pri učenju, ali ne i da prevenira kognitivno umanje nastalo delovanjem skopolamina. Vreme koje životinje provode u ciljnom regionu u toku testa pozivanja naučenog otkriva razliku grupa tretiranih skopolaminom i kombinacijom skopolamina i 5 mg/kg PWZ-029 u odnosu na kontrolne

životinje. Statistička analiza za ostale parametre nije dostigla značajnost, ali je upućivala da kontrolne životinje imaju najbolje vrednosti parametara. Postoje mnogi primeri koji pokazuju da iako potencijalno prokognitivni ligand ne ispoljava pozitivan efekat kod zdravih životinja, može da poboljša kognitivne sposobnosti u eksperimentalno farmakološki indukovanom deficitu (Floresco i Jentsch, 2011). Naši rezultati sa skopolaminom to ne pokazuju, te se može postaviti pitanje uloge modulacije α_5 GABA_A receptora u protokolu oštećenja referentne memorije u vodenom lavirintu izazvanog skopolaminom. U protokolu sličnom našem pokazano je da inverzni agonist i antagonist BDZ mesta vezivanja GABA_A receptora, S8510 i CGS8216, preveniraju skopolaminom indukovano smanjenje kognicije u Morisovom vodenom lavirintu (Kawasaki i sar., 1996), ali i da predstavnik neselektivnih inverznih agonista BDZ mesta vezivanja GABA_A receptora, FG7142, koji je pokazivao prokognitivni potencijal kod zdravih životinja (Cole i Hillmann, 1994), nije uspeo da umanji kognitivni deficit izazvan skopolaminom u vodenom lavirintu (Kawasaki i sar., 1996). Ovi nalazi upućuju na kompleksnost izazivanja deficita u Morisovom vodenom lavirintu primenom skopolamina, i tešku predvidljivost uticaja različitih liganada koji modulišu GABA-ergičku transmisiju.

5.5 Procedura socijalnog prepoznavanja

Praćenjem parametara diskriminacije (indeksa i odnosa), u proceduri koja ispituje socijalnu kogniciju dobili smo smanjenje prepoznavanja kod životinja tretiranih sa 0,1 mg/kg MK-801. Već je pokazano da antagonisti NMDA receptora utiču na smanjenje kognitivnih aspekata vezanih za socijalno prepoznavanje (Zou i sar., 2008; Brigman i sar., 2009; Moy i sar., 2013). Pored jasnog deficita socijalnog prepoznavanja, nisu primećena neselektivna oštećenja ponašanja pri izvođenju testa, tako da je u sledećem eksperimentu ispitivan uticaj negativne modulacije α_5 GABA_A receptora, upotrebom PWZ-029. Inverzni agonista BDZ mesta vezivanja α_5 GABA_A receptora nije uspeo da prevenira deficit u socijalnoj kogniciji ni u jednoj od testiranih doza. Nisu zapaženi efekti na ukupna vremena istraživanja, čime se potvrdio relativno specifičan uticaj tretmana na kognitivne aspekte. U odnosu na testove gde je negativna modulacija α_5 GABA_A receptora uspevala da prevenira promene u kognitivnim sposobnostima, nedostatak efekta PWZ-029 na socijalno prepoznavanje bilo je

očekivano, uzevši u obzir da sâm test podrazumeva uključenost različitih moždanih struktura (Watson i sar., 2012). Iako je ovde procenjen uticaj na farmakološki indukovano smanjenje pamćenja, postoje radovi koji ispituju potencijalno prokognitivne lekove u protokolu parametarskog deficita, kada se na zdravim životinjama ispituje efekat liganda (Terranova i sar., 2005). Uticaj modulacije GABA-ergičkog sistema na aspekte socijalnosti i socijalnog prepoznavanja nije mnogo istraživano, ali je pokazano da diazepam kod miševa može povećati vreme u interakciji sa drugom životinjom, bez posledičnog uticaja na socijalno prepoznavanje (Riedel i sar., 2009). Uz činjenicu da inverzni agonisti na BDZ mesto vezivanja GABA_A receptora mogu dovesti do nedostatka motivacije i anksioznog ponašanja životinja (Duka i sar., 1996; Kawasaki i sar., 1996), negativan nalaz sa PWZ-029 u ovom testu nije neočekivan. Pozitivna modulacija α_5 GABA_A receptora, sa kojom se može očekivati pozitivan efekat, za sada nije ispitivana.

Pri razmatranju bihevioralnih efekata supstanci selektivnih za pojedine podtipove receptora bitno je utvrđivanje stepena u kome se ligandi vezuju za različite populacije receptora (Atack i sar., 1999), kako bi se u datom doznom režimu potvrdila *in vitro* dobijena selektivnost. U tu svrhu smo određivali slobodne frakcije testiranih liganada i stavili ih u funkciju procene slobodne koncentracije u moždanom tkivu, čime smo dobili bolji uvid u populaciju receptora preko koje se postiže najveći nivo modulacije GABA-ergičkog sistema. Povoljni bihevioralni efekti, dobijeni pre svega u pojedinim kognitivnim testovima sa negativnim modulatorom α_5 GABA_A receptora, bili su usaglašeni sa koncentracijama koje su se u moždanom tkivu postizale, a pri kojima je postojala selektivnost za α_5 populaciju GABA_A receptora.

Promene utvrđene *post mortem* na mozgovima pacijenata sa shizofrenijom upućivale su na deficite u GABA-ergičkom sistemu, ne samo u nivou GAD₆₇ i parvalbumin pozitivnih neurona, već i u nivou α_5 subjedinice GABA_A receptora (Lewis i sar., 2005; Duncan i sar., 2010). S obzirom na već poznatu ulogu koju α_5 GABA_A receptori imaju u kognitivnim procesima, kao potencijalno nova terapijska opcija u lečenju kognitivnih deficita viđenih u shizofreniji predložena je modulacija α_5 GABA_A receptora (Redrobe i sar., 2012; Gill i Grace, 2014). Ispitivani su selektivni negativni modulatori, RO4938581 u fenciklidinom izazvanom deficitu u NORT-u (Redrobe i sar., 2012), i L-655,708 u MK-801 indukovanom

oštećenju u testu inkrementalno repetitivnog učenja (eng. *incremental repeated acquisition task*) (Povroznik i sar., 2014). U našem istraživanju, negativna modulacija α_5 GABA_A receptora prevenirala je neke aspekte kognitivnog oštećenja izazvanog primenom MK-801 i skopolamina. Primećen je pozitivan efekat u testovima zavisnim od funkcije hipokampusa u modelu hipofunkcije NMDA receptora – parcijalan u testu prostorne memorije (Morisov vodeni lavirint), i potpun u testu prepoznavanja novog objekta, koji pre svega meri vizuelnu memoriju kao vid deklarativne memorije (Young i sar., 2009). U modelu hipofunkcije NMDA receptora nije primećen efekat PWZ-029 na smanjenje socijalnog prepoznavanja kao imitacije negativne simptomatologije u shizofreniji (Neill i sar., 2010; 2014), kao ni potencijalan antipsihotički efekat u smislu smanjenja hiperaktivnosti izazvane MK-801, koja oslikava pozitivne simptome viđene u shizofreniji (Andine i sar., 1999). Translacijski poželjni efekti reverzije MK-801-indukovanog deficita, pre svega u pojedinim aspektima kognicije, primećeni sa inverznim agonistom BDZ mesta vezivanja α_5 GABA_A receptora, u skladu su sa lokacijom ovih receptora. Znatno broj ovih receptora u hipokampusu, olfaktornom bulbusu i dubljim slojevima neokorteksa (Pirker i sar., 2000; Sieghart i Sperk, 2002), kao i njihova lokacija na bazi dendritskih spina („trnića“) piramidarnih ćelija u CA₁ i CA₂ regionu hipokampusa (Brickley i Mody, 2012), upućuju na ulogu α_5 GABA_A receptora u modulaciji ekscitatorne glutamatergičke transmisije koja svoje efekte ostvaruje preko NMDA receptora. Promene viđene u modelu hipofunkcije NMDA receptora, postignute upotrebom MK-801, mogu biti suzbijene upravo modulacijom α_5 GABA_A receptora.

Dezinhibicija glutamatergičkog sistema, koja kod primene MK-801 paradoksalno postoji zbog pretežnog delovanja na NMDA receptore na interneuronima (Homayoun i Moghaddam, 2007), ukazuje na mogućnost povoljnih efekata agonista BDZ mesta vezivanja GABA_A receptora kao liganada koji bi osnažili oslabljenu GABA-ergičku transmisiju. Zato je predloženo da jedna od potencijalnih terapijskih mogućnosti u shizofreniji bude pozitivna modulacija α_2 GABA_A receptora, koji su pozicionirani na aksonskom brežuljku piramidarnog neurona (Lewis i sar., 2005). Međutim, rezultati sa pozitivnom modulacijom $\alpha_{2/3}$ GABA_A receptora primenom liganda TPA023 (MK-0777) nisu pokazali pozitivne rezultate na kognitivne deficite prisutne u shizofreniji (Rudolph i Möhler, 2014). Naši rezultati sa MK-801 potvrdili su postojanje pozitivnog kognitivnog efekta negativne, ali ne i pozitivne modulacije α_5 GABA_A receptora u modelima hipofunkcije NMDA receptora.

Efekat viđen sa PWZ-029 potvrdio je i postojanje razlike u bihevioralnom efektu testiranih doza PWZ-029, iako je pokazano da nema značajnije razlike u selektivnosti pri datom doznom režimu (2–10 mg/kg PWZ-029). Takav rezultat je pokazao da malom promenom u modulaciji α_5 populacije GABA_A receptora, u prisustvu hipofunkcije NMDA receptora, može da se dobije kompleksan bihevioralni efekat. Kod pacova je pokazano da *i.p.* primena MK-801 (0,1-0,2 mg/kg) povećava nivo okidanja neurona i remeti gama oscilacije, što dovodi do smanjenja sinhronizacije neurona u medijalnom prefrontalnom korteksu, moždanoj regiji usko povezanoj sa promenama viđenim u shizofreniji (Molina i sar., 2014). Dodatno, u okruženju u kome posle primene 0,1 mg/kg MK-801 postoji dezinhibicija glutamatergičkog sistema (Homayoun i Moghaddam, 2007), može se očekivati da PWZ-029 indukovana negativna modulacija α_5 GABA_A receptora, koja smanjuje amplitudu IPSP-a (Ali i Thomson, 2008), dovodi do dalje desinhronizacije neurona i pogoršanja simptoma kognitivne disfunkcije kod pacova. Uprkos tome, u pojedinim bihevioralnim testovima (Morisov vodeni lavirint i NORT), PWZ-029 je ispoljio pozitivan uticaj na kognitivnu disfunkciju. Iako je odavno poznata prisutnost α_5 GABA_A receptora u regijama bitnim za učenje, za ovu populaciju receptora se do skora verovalo da su dominantno ekstrasinaptički, dok je poslednjih godina dokazana njihova sinaptička lokalizacija (Serwanski i sar., 2006). Danas postoje dokazi o dinamičkom procesu koji reguliše lokalizaciju α_5 GABA_A receptora, pri čemu se u određenim okolnostima moduliše pomeranje ovih receptora od ekstrasinaptičke ka sinaptičkoj lokalizaciji (Hausrat i sar., 2015). Uzimajući u obzir populaciju α_5 GABA_A receptora u sinapsi na distalnim delovima dendrita piramidalnog neurona (Ali i Thomson, 2008), i na inhibitornim interneuronima u hipokampusu pacova (Salesse i sar., 2011), može se objasniti kompleksnost bihevioralnog efekta viđenog sa PWZ-029. Negativni modulator α_5 GABA_A receptora, L655,708 ligand, neočekivano je povećao stepen pražnjenja neurona u korteksu u toku faze neuronske aktivnosti, slično efektu diazepama (Drexler i sar., 2013). Ovim je pokazano da modulacija α_5 GABA_A receptora, prisutnih na piramidalnim ćelijama i na interneuronima, dovodi do bihevioralnih i elektrofizioloških promena koje se ne mogu interpretirati kao zbirni efekat postignut delovanjem na pojedinačne populacije GABA_A receptora (Zarnowska i sar., 2009). Moguće je da je jedna subpopulacija α_5 GABA_A receptora privilegovano postavljena tako da kontroliše aktivnost inhibitornih interneurona koji se projektuju do piramidalnih, što može da objasni ukupni inhibicioni efekat negativne modulacije α_5 GABA_A receptora, postignut različitim stepenom modulacije interneurona i piramidalnih neurona.

Pozitivni efekti negativne modulacije α_5 GABA_A receptora, zapaženi u kognitivnim testovima u uslovima hipofunkcije NMDA receptora, nisu viđeni u testovima lokomotorne aktivnosti. Iako postoji blago smanjenje hiperlokomotornog efekta koji izaziva MK-801, primenom PWZ-029 nije mogla da se postigne reverzija izrazitog povećanja vremena provedenog u aktivnosti. Sličan rezultat je dobijen i u testu hiperaktivnosti izazvane amfetaminom, drugim agensom kojim se imitiraju pozitivni simptomi viđeni u shizofreniji (Featherstone i sar., 2007; 2008). Naši rezultati nisu konzistentni sa literaturnim navodima o reverziji koju postižu kako negativni, tako i pozitivni modulatori α_5 GABA_A receptora (Gill i sar., 2011; Redrobe i sar., 2012). Objašnjenja za razlike u efektu mogu biti: 1) korišćeni animalni model – Gill i sar. (2011) su koristili MAM model i senzitivizaciju na amfetamin; 2) profil liganda i način interpretacije rezultata – Redrobe i sar. (2012) u svojoj studiji sa pozitivnim i negativnim modulatorom α_5 GABA_A receptora prikazuju rezultate kao u potpunosti afirmativne, ali je zapravo dobijeni efekat bio parcijalan.

Uticaj negativne modulacije α_5 GABA_A receptora na promene izazvane muskarinskim antagonistom, slično efektima dobijenim u modelu hipofunkcije NMDA receptora, ukazuje na mogućnost reverzije pojedinih aspekata kognitivne disfunkcije. Pozitivni efekti viđeni su u testu deklarativne memorije, dok su u testu prostorne memorije izostali. Bihejvioralne promene izazvane skopolaminom uključuju hiperaktivnost i smanjenje učenja i pamćenja (Klinkenberg i Blokland, 2010). Poznato je da u testovima vodenog lavirinta koji ispituju uticaj na prostorno pamćenje efekat skopolamina može zavistiti od starosti životinja, ali i od osvetljenosti prostora u kome se vrši testiranje, što upućuje na procese koji nisu vezani samo za sticanje prostorne memorije, već na širi spektar oštećenja (Klinkenberg i Blokland, 2010). Time se može objasniti relativni nedostatak reverzije skopolaminom indukovano deficit u Morisovom vodenom lavirintu primenom inverznog agoniste BDZ mesta vezivanja α_5 GABA_A receptora. U modelu hipofunkcije NMDA receptora i u skopolaminom indukovano poremećaju viđene su promene u sinhronizaciji neurona, sa dominantnim efektom na gama oscilacije (Rodriguez i sar., 2004; Terry, 2006). Gama oscilacije oslikavaju pre svega sinhrono okidanje grupa piramidalnih ćelija i redukovane su u shizofreniji, a stepen smanjenja u gama oscilacijama povezuje se sa ozbiljnošću pojave negativnih simptoma (Lee i sar., 2003; Uhlhaas i Singer, 2010). Negativnom modulacijom α_5 GABA_A receptora primenom PWZ-029 moglo bi se očekivati povećanje gama oscilacija, pošto je pokazano da genetička redukcija α_5 GABA_A receptora dovodi do povećanja u

pojavljivanju spontanah gama oscilacija u CA₃ piramidalnom sloju kod miševa (Glykys i sar., 2008). Dodatno, hiperlokomocija indukovana poremećajima u holinergičkoj transmisiji bila je osetljivija, iako umereno, na negativnu modulaciju α_5 GABA_A receptora.

Iako je, pored MK-801, skopolamin okarakterisan kao validan model za indukciju bihevioralnih promena (Klinkenberg i Blokland, 2010; van der Staay i sar., 2011), translacijska validnost studija sa farmakološki indukovanim oštećenjem se može dovesti u pitanje. Inicijative koje danas imaju za cilj da pronađu odgovarajući tretman za kognitivne deficite, posebno povezane sa shizofrenijom, naglašavaju translacijska ograničenja postojećih animalnih modela, uključujući i one koji su korišćeni u našim studijama, i upućuju na neophodnost analize dobijenih rezultata u širem kontekstu funkcionisanja različitih moždanih regija (Young i sar., 2009; Keeler i Robbins, 2011). Iako se naši rezultati dobijeni u pojedinim testovima (hiperaktivnost, pojedini aspekti kognitivnih deficita i socijalnog prepoznavanja), mogu tumačiti i kao negativni, oni su u skladu sa zaključcima koje su Young i sar. (2012) izneli, da animalni model kognitivnog poremećaja relevantnog za shizofreniju u kome se pokazuje slab do umeren efekat farmakološkog tretmana predstavlja scenario iz realnog života. U tom smislu, dalja farmakološka ispitivanja sa ligandima koji selektivno pogađaju GABA-ergičku transmisiju, a ne izazivaju efekte kod zdravih životinja, paralelno sa standardnim antipsihoticima, mogu da daju značajan doprinos translacijskoj vrednosti prekliničkih modela koji ispituju pre svega kognitivne aspekte.

Naši rezultati pokazuju da modulacija α_5 GABA_A receptora poseduje varijabilnu sposobnost preveniranja deficita izazvanih primenom MK-801, skopolamina i amfetamina. Pozitivni rezultati viđeni su sa inverznim agonistom BDZ mesta vezivanja α_5 GABA_A receptora samo u pojedinim aspektima memorije; deklarativna komponenta bila je osetljivija od prostorne memorije, dok je negativna modulacija α_5 GABA_A receptora bila bez efekta na promene u socijalnom prepoznavanju. Pored toga viđena je jasna razlika u dozama, i pratećem stepenu modulacije, koje su imale efekte u farmakološki indukovanom deficitu; uglavnom je viđen odnos doze i efekta u obliku obrnutog slova J ili U. Izostanak uticaja pozitivne i negativne modulacije α_5 GABA_A receptora na hiperaktivnost izazvanu MK-801, amfetaminom i skopolaminom upućuje da su pozitivni simptomi viđeni u shizofreniji generalno neosetljivi na efekte koji se mogu postići preko ove populacije GABA_A receptora. Dalja istraživanja potencijalne kliničke korisnosti negativne i pozitivne modulacije α_5 GABA_A receptora u

shizofreniji i drugim poremećajima u kojima, pored ostalog, postoji i komponenta kognitivnog deficita, treba da se fokusiraju na korišćenje ovih modulatora kao moguće dodatne terapije u suzbijanju kognitivnog propadanja viđenog kod znatnog broja pacijenata rezistentnih na trenutno dostupne terapijske opcije (Citrome, 2014).

6 ZAKLJUČCI

Na osnovu ispitivanja efekata pozitivne i negativne modulacije GABA_A receptora, postignutih primenom inverznog agoniste PWZ-029 i pet agonista (MP-III-022, MP-III-004, SH-053-2'F-R-CH3, SH-I-75 i SH-I-047) BDZ mesta vezivanja, na promene ponašanja pacova izazvane dizocilpinom, amfetaminom i skopolaminom u testovima relevantnim za kognitivne deficite, pozitivnu i negativnu simptomatologiju shizofrenije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Svi ispitivani ligandi prolaze krvno-moždanu barijeru nakon *i.p.* primene i izmerene ukupne, kao i procenjene slobodne koncentracije u moždanom tkivu potvrđuju mogućnost ostvarivanja njihovog dejstva tokom praćenja ponašanja oglednih životinja.
2. Izračunati farmakokinetički parametri za negativnog modulatora GABA_A receptora PWZ-029 ukazuju na visoke koncentracije koje se mogu postići u moždanom tkivu i posebno plazmi, sa relativno brzom eliminacijom. Farmakokinetičko ponašanje pozitivnog modulatora GABA_A receptora MP-III-022 karakterišu više koncentracije u moždanom tkivu nego u plazmi i sporija eliminacija u poređenju sa PWZ-029.
3. Povezivanjem procenjenih slobodnih koncentracija u moždanom tkivu i elektrofiziološkog ponašanja *in vitro*, utvrđeno je da PWZ-029, u doznom opsegu korišćenom u bihevioralnim testovima, ispoljava selektivni efekat negativne modulacije na α_5 GABA_A receptore. Svi agonisti BDZ mesta vezivanja u testiranim opsezima doza ispoljili su selektivni efekat pozitivne modulacije α_5 GABA_A receptora, s time da je najmanji intenzitet modulacija postignut sa SH-I-75.
4. Hiperaktivnost izazvana primenom amfetamina u testu lokomotorne aktivnosti može se suzbiti antipsihotikom haloperidolom, ali pri dozi koja izaziva sedaciju; ispitivani pozitivni (MP-III-022, MP-III-004, SH-I-047, SH-053-2'F-R-CH3 i SH-I-75) i negativni (PWZ-029) modulatori α_5 GABA_A receptora nisu bili u stanju da preveniraju ovu hiperaktivnost.

5. Hiperaktivnost indukovana primenom MK-801, koja oslikava pozitivne simptome videne u shizofreniji, delimično je prevenirana višim dozama diazepama i negativnog modulatora α_5 GABA_A receptora, pri kojima se ispoljava njihov sedativni, odnosno sedaciji sličan potencijal. Pri ispitivanju hiperlokomotornog dejstva skopolamina parcijalna prevencija ispoljavanja ovog efekta postignuta je sa dozom PWZ-029 koja nema uticaja na spontanu lokomotornu aktivnost životinja.
6. Negativna modulacija α_5 GABA_A receptora prevenirala je pojedine aspekte kognitivnog oštećenja izazvanog primenom MK-801 u modelu hipofunkcije NMDA receptora. Efekat je primećen u testovima zavisnim od funkcije hipokampusa – parcijalan u testu prostorne memorije (Morisov vodeni lavirint), i potpun u testu deklarativne memorije (test prepoznavanja novog objekta).
7. Uticaj negativne modulacije α_5 GABA_A receptora na promene izazvane muskarinskim antagonistom, slično efektima dobijenim u modelu hipofunkcije NMDA receptora, ukazuje na mogućnost reverzije pojedinih aspekata kognitivne disfunkcije. Ovi efekti viđeni su u testu deklarativne memorije, dok su u testu prostorne memorije izostali.
8. U animalnom modelu hipofunkcije NMDA receptora nije primećen efekat inverznog agoniste BDZ mesta vezivanja α_5 GABA_A receptora na smanjenje socijalnog prepoznavanja, koje se povezuje sa negativnom simptomatologijom u shizofreniji.
9. Agonisti BDZ mesta vezivanja α_5 GABA_A receptora nisu ispoljili preventivne efekte na hiperaktivnost izazvanu MK-801 i skopolaminom, niti na oštećenje prostornog učenja pod dejstvom MK-801, što ukazuje da su ove promene ponašanja neosetljive na efekte koji se mogu postići pozitivnom modulacijom α_5 GABA_A receptora.
10. Za dejstvo negativnog modulatora α_5 GABA_A receptora u kognitivnim testovima sa farmakološki indukovanim promenama ponašanja utvrđen je odnos doze i efekta u obliku obrnutog slova „J“ ili „U“.

ZNAČAJ REZULTATA

Dobijeni preventivni efekti negativne modulacije α_5 GABA_A receptora potkrepljuju opravdanost aktuelnih ispitivanja inverznih agonista BDZ mesta vezivanja selektivnih za α_5 GABA_A receptore u shizofreniji i drugim poremećajima u kojima, pored ostalog, postoji i komponenta kognitivnog deficita.

7 Literatura

Achermann G, Ballard TM, Blasco F, Broutin PE, Büttelmann B, Fischer H, Graf M, Hernandez MC, Hilty P, Knoflach F, Koblet A, Knust H, Kurt A, Martin JR, Masciadri R, Porter RH, Stadler H, Thomas AW, Trube G, Wichmann J. Discovery of the imidazo[1,5-a][1,2,4]-triazolo[1,5-d][1,4]benzodiazepine scaffold as a novel, potent and selective GABA(A) α 5 inverse agonist series. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 5746–52.

Adell A, Jiménez-Sánchez L, López-Gil X, Romón T. Is the acute NMDA receptor hypofunction a valid model of schizophrenia? *Schizophr Bull* 2012; 38: 9–14.

Ahlander M, Misane I, Schött PA, Ogren SO. A behavioral analysis of the spatial learning deficit induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in the rat. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21: 414–26.

Ali AB, Thomson AM. Synaptic α 5 subunit-containing GABAA receptors mediate IPSPs elicited by dendrite-preferring cells in rat neocortex. *Cereb Cortex* 2008; 18: 1260–71.

Andiné P, Widermark N, Axelsson R, Nyberg G, Olofsson U, Mårtensson E, Sandberg M. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290: 1393–408.

Atack JR, Bayley PJ, Seabrook GR, Wafford KA, McKernan RM, Dawson GR. L-655,708 enhances cognition in rats but is not proconvulsant at a dose selective for α 5-containing GABAA receptors. *Neuropharmacology* 2006; 51:1023–9.

Atack JR, Maubach KA, Wafford KA, O'Connor D, Rodrigues AD, Evans DC, Tattersall FD, Chambers MS, MacLeod AM, Eng WS, Ryan C, Hostetler E, Sanabria SM, Gibson RE, Krause S, Burns HD, Hargreaves RJ, Agrawal NG, McKernan RM, Murphy MG, Gingrich K, Dawson GR, Musson DG, Petty KJ. In vitro and in vivo properties of 3-tert-butyl-7-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-ylmethoxy)-pyrazolo[1,5-d][1,2,4]triazine (MRK-016), a GABAA receptor α 5 subtype-selective inverse agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 331: 470–84.

Atack JR, Smith AJ, Emms F, McKernan RM. Regional differences in the inhibition of mouse in vivo [3H]Ro 15-1788 binding reflect selectivity for α 1 versus α 2 and α 3 subunit-containing GABAA receptors. *Neuropsychopharmacology* 1999; 20: 255–62.

Atack JR. GABA(A) receptor subtype-selective efficacy: TPA023, an α 2/ α 3 selective non-sedating anxiolytic and α 5IA, an α 5 selective cognition enhancer. *CNS Neurosci Ther* 2008; 14: 25–35.

Atack JR. GABAA receptor subtype-selective modulators. I. α 2/ α 3-selective agonists as non-sedating anxiolytics. *Curr Top Med Chem* 2011a; 11: 1176–202.

Atack JR. GABAA receptor subtype-selective modulators. II. $\alpha 5$ -selective inverse agonists for cognition enhancement. *Curr Top Med Chem* 2011b; 11: 1203-14.

Atack JR. Preclinical and clinical pharmacology of the GABAA receptor $\alpha 5$ subtype-selective inverse agonist $\alpha 5$ IA. *Pharmacol Ther* 2010; 125: 11–26.

Ballard TM, Knoflach F, Prinssen E, Borroni E, Vivian JA, Basile J, Gasser R, Moreau JL, Wettstein JG, Buettelmann B, Knust H, Thomas AW, Trube G, Hernandez MC. RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABAA $\alpha 5$ subunit-containing receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 2009; 202: 207–23.

Barak S i Weiner I. The M_1/M_4 preferring agonist xanomeline reverses amphetamine-, MK801- and scopolamine-induced abnormalities of latent inhibition: putative efficacy against positive, negative and cognitive symptoms in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011; 14: 1233–46.

Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982; 217: 408–14.

Behrens S, Gattaz WF. MK-801 induced stereotypies in rats are decreased by haloperidol and increased by diazepam. *J Neural Transm Gen Sect* 1992; 90: 219–24.

Belcher AM, O'Dell SJ, Marshall JF. Impaired object recognition memory following methamphetamine, but not p-chloroamphetamine- or d-amphetamine-induced neurotoxicity. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 2026–34.

Beneyto M, Abbott A, Hashimoto T, Lewis DA. Lamina-specific alterations in cortical GABA(A) receptor subunit expression in schizophrenia. *Cereb Cortex* 2011; 21: 999–1011.

Bentley P, Driver J, Dolan RJ. Cholinergic modulation of cognition: insights from human pharmacological functional neuroimaging. *Prog Neurobiol* 2011; 94: 360–88.

Beraki S, Kuzmin A, Tai F, Ögren SO. Repeated low dose of phencyclidine administration impairs spatial learning in mice: Blockade by clozapine but not by haloperidol. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008; 18: 486–97.

Berlyne DE. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *Br J Psychol* 1950; 41: 68–80.

Bertaina-Anglade V, Enjuanes E, Morillon D, Drieu la Rochelle C. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006; 54: 99–105.

Blokland A, Rutten K, Prickaerts J. Analysis of spatial orientation strategies of male and female Wistar rats in a Morris water escape task. *Behav Brain Res* 2006; 171: 216–24.

Bradford AM, Savage KM, Jones DN, Kalinichev M. Validation and pharmacological characterisation of MK-801-induced locomotor hyperactivity in BALB/C mice as an

assay for detection of novel antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)* 2010; 212: 155–70.

Bradley SR, Lamah J, Ohrmund L, Son T, Bajpai A, Nguyen D, Friberg M, Burstein ES, Spalding TA, Ott TR, Schiffer HH, Tabatabaei A, McFarland K, Davis RE, Bonhaus DW. AC-260584, an orally bioavailable M(1) muscarinic receptor allosteric agonist, improves cognitive performance in an animal model. *Neuropharmacology* 2010; 58: 365–73.

Brady AE, Jones CK, Bridges TM, Kennedy JP, Thompson AD, Heiman JU, Breininger ML, Gentry PR, Yin H, Jadhav SB, Shirey JK, Conn PJ, Lindsley CW. Centrally active allosteric potentiators of the M4 muscarinic acetylcholine receptor reverse amphetamine-induced hyperlocomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327: 941–53.

Brady ML, Jacob TC. Synaptic localization of $\alpha 5$ GABA (A) receptors via gephyrin interaction regulates dendritic outgrowth and spine maturation. *Dev Neurobiol* 2015; doi: 10.1002/dneu.22280. [Epub ahead of print]

Braudeau J, Dauphinot L, Duchon A, Loistron A, Dodd RH, Héroult Y, Delatour B, Potier MC. Chronic Treatment with a Promnesiant GABA-A $\alpha 5$ -Selective Inverse Agonist Increases Immediate Early Genes Expression during Memory Processing in Mice and Rectifies Their Expression Levels in a Down Syndrome Mouse Model. *Adv Pharmacol Sci* 2011a; 2011: 153218

Braudeau J, Delatour B, Duchon A, Pereira PL, Dauphinot L, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Dodd RH, Héroult Y, Potier MC. Specific targeting of the GABA-A receptor $\alpha 5$ subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *J Psychopharmacol* 2011b; 25: 1030–42.

Braun I, Genius J, Grunze H, Bender A, Möller HJ, Rujescu D. Alterations of hippocampal and prefrontal GABAergic interneurons in an animal model of psychosis induced by NMDA receptor antagonism. *Schizophr Res* 2007; 97: 254–63.

Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 2569–74.

Brickley SG, Mody I. Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* 2012; 73: 23–34.

Brigman JL, Ihne J, Saksida LM, Bussey TJ, Holmes A. Effects of Subchronic Phencyclidine (PCP) Treatment on Social Behaviors, and Operant Discrimination and Reversal Learning in C57BL/6J Mice. *Front Behav Neurosci* 2009; 3: 2

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

Bubeníková V, Votava M, Horáček J, Páleníček T, Dockery C. The effect of zotepine, risperidone, clozapine and olanzapine on MK-801-disrupted sensorimotor gating. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 80: 591–6.

Buettelmann B, Ballard TM, Gasser R, Fischer H, Hernandez MC, Knoflach F, Knust H, Stadler H, Thomas AW, Trube G. Imidazo[1,5-a][1,2,4]-triazolo[1,5-d][1,4]benzodiazepines as potent and highly selective GABAA alpha5 inverse agonists with potential for the treatment of cognitive dysfunction. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 5958–61.

Calabrese EJ, Baldwin LA. Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21: 91–7.

Calipari ES, Ferris MJ. Amphetamine mechanisms and actions at the dopamine terminal revisited. *J Neurosci* 2013; 33: 8923–5.

Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA. Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3662–7.

Castner SA, Vosler PS, Goldman-Rakic PS. Amphetamine sensitization impairs cognition and reduces dopamine turnover in primate prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 2005; 57: 743–51.

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) alpha5 receptor inverse agonist which enhances cognition. *J Med Chem* 2003; 46 : 2227–40.

Chambers MS, Atack JR, Carling RW, Collinson N, Cook SM, Dawson GR, Ferris P, Hobbs SC, O'connor D, Marshall G, Rycroft W, Macleod AM. An orally bioavailable, functionally selective inverse agonist at the benzodiazepine site of GABAA alpha5 receptors with cognition enhancing properties. *J Med Chem* 2004; 47: 5829–32.

Cheng VY, Martin LJ, Elliott EM, Kim JH, Mount HT, Taverna FA, Roder JC, Macdonald JF, Bhambri A, Collinson N, Wafford KA, Orser BA. Alpha5GABAA receptors mediate the amnestic but not sedative-hypnotic effects of the general anesthetic etomidate. *J Neurosci* 2006; 26: 3713–20.

Citrome L. Unmet needs in the treatment of schizophrenia: new targets to help different symptom domains. *J Clin Psychiatry* 2014;75 Suppl 1: 21–6.

Clarkson AN, Huang BS, Macisaac SE, Mody I, Carmichael ST. Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature* 2010; 468: 305–9.

Clifton NE, Morisot N, Girardon S, Millan MJ, Loiseau F. Enhancement of social novelty discrimination by positive allosteric modulators at metabotropic glutamate 5 receptors: adolescent administration prevents adult-onset deficits induced by neonatal treatment with phencyclidine. *Psychopharmacology (Berl)* 2013; 225: 579–94.

Cole BJ, Hillmann M. Effects of benzodiazepine receptor ligands on the performance of an operant delayed matching to position task in rats: opposite effects of FG 7142 and lorazepam. *Psychopharmacology (Berl)* 1994; 115: 350–7.

Collinson N, Atack JR, Laughton P, Dawson GR, Stephens DN. An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABAA receptors improves encoding and recall but not consolidation in the Morris water maze. *Psychopharmacology* 2006; 188: 619–28.

Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cothliff R, Sur C, Smith A, Otu FM, Howell O, Atack JR, McKernan RM, Seabrook GR, Dawson GR, Whiting PJ, Rosahl TW. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci* 2002; 22: 5572–80.

Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Blüthmann H, Möhler H, Rudolph U. Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8980–5.

Csernansky JG, Martin M, Shah R, Bertchume A, Colvin J, Dong H. Cholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits induced by MK-801 in mice. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 2135–43.

Daniel DG, Weinberger DR, Jones DW, Zigun JR, Coppola R, Handel S, Bigelow LB, Goldberg TE, Berman KF, Kleinman JE. The effect of amphetamine on regional cerebral blood flow during cognitive activation in schizophrenia. *J Neurosci* 1991; 11: 1907–17.

Dasari S i Gulledg AT. M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2011; 105: 779–92.

Datta D, Arion D, Lewis DA. Developmental Expression Patterns of GABAA Receptor Subunits in Layer 3 and 5 Pyramidal Cells of Monkey Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex* 2014 Mar 7. [Epub ahead of print]

Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 1991;148:1474–86.

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

de Bruin NM, Prickaerts J, van Loevezijn A, Venhorst J, de Groote L, Houba P, Reneerkens O, Akkerman S, Kruse CG. Two novel 5-HT6 receptor antagonists

ameliorate scopolamine-induced memory deficits in the object recognition and object location tasks in Wistar rats. *Neurobiol Learn Mem* 2011; 96: 392–402.

de Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schröder N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res* 2005; 156: 139–43.

Decker MW. Cognition Models and Drug Discovery. In: Levin ED, Buccafusco JJ, editors. *Animal Models of Cognitive Impairment*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2006. Chapter 16

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.

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.

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.

Dickerson BC, Eichenbaum H. The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35:86–104.

Didriksen M, Skarsfeldt T, Arnt J. Reversal of PCP-induced learning and memory deficits in the Morris' water maze by sertindole and other antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)* 2007; 193: 225–33.

Dodart JC, Mathis C, Ungerer A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport* 1997; 8: 1173–8.

Drexler B, Zinser S, Huang S, Poe MM, Rudolph U, Cook JM, Antkowiak B. Enhancing the function of alpha5-subunit-containing GABAA receptors promotes action potential firing of neocortical neurons during up-states. *Eur J Pharmacol* 2013; 703: 18–24.

Duka T, Ott H, Rohloff A, Voet B. The effects of a benzodiazepine receptor antagonist beta-carboline ZK-93426 on scopolamine-induced impairment on attention, memory and psychomotor skills. *Psychopharmacology (Berl)* 1996; 123: 361–73.

Duncan CE, Webster MJ, Rothmond DA, Bahn S, Elashoff M, Shannon Weickert C. Prefrontal GABA(A) receptor alpha-subunit expression in normal postnatal human development and schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2010; 44: 673–81.

Ellison G. The N-methyl-d-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizolcipine as both behavioral and anatomical models of dementia. *Brain Res Rev* 1995; 20: 140–267.

Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R. Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav* 1995; 58: 315–21.

Ennaceur A i Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988; 31: 47–59.

Ennaceur A, Meliani K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav Brain Res* 1992; 51: 83–92.

Fajnerová I, Rodriguez M, Levčik D, Konrádová L, Mikoláš P, Brom C, Stuchlík A, Vlček K, Horáček J. A virtual reality task based on animal research - spatial learning and memory in patients after the first episode of schizophrenia. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: 157

Featherstone RE, Kapur S, Fletcher PJ. The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31: 1556–71.

Featherstone RE, Rizos Z, Kapur S, Fletcher PJ. A sensitizing regimen of amphetamine that disrupts attentional set-shifting does not disrupt working or long-term memory. *Behav Brain Res* 2008; 189: 170–9.

Ferguson JN, Young LJ, Insel TR. The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrinol* 2002; 23: 200–24.

Fischell J, Van Dyke AM, Kvarita MD, LeGates TA, Thompson SM. Rapid Antidepressant Action and Restoration of Excitatory Synaptic Strength After Chronic Stress by Negative Modulators of Alpha5-Containing GABA(A) Receptors. *Neuropsychopharmacology* 2015 [Epub ahead of print]

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.

Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47:681–98.

Fletcher PJ, Tenn CC, Rizos Z, Lovic V, Kapur S. Sensitization to amphetamine, but not PCP, impairs attentional set shifting: reversal by a D1 receptor agonist injected into the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 183: 190–200.

Fletcher PJ, Tenn CC, Sinyard J, Rizos Z, Kapur S. A sensitizing regimen of amphetamine impairs visual attention in the 5-choice serial reaction time test: reversal

by a D1 receptor agonist injected into the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32: 1122–32.

Floresco SB, Jentsch JD. Pharmacological enhancement of memory and executive functioning in laboratory animals. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 227–50.

Folley BS, Astur R, Jagannathan K, Calhoun VD, Pearlson GD. Anomalous neural circuit function in schizophrenia during a virtual Morris water task. *Neuroimage* 2010; 49: 3373–84.

Frick KM, Baxter MG, Markowska AL, Olton DS, Price DL. Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 149–60.

Fritschy JM, Johnson DK, Mohler H, Rudolph U: Independent assembly and subcellular targeting of GABA(A)-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons in vivo. *Neurosci Lett* 1998; 249: 99–102.

Froestl W, Muhs A, Pfeifer A. Cognitive enhancers (Nootropics). Part 1: drugs interacting with receptors. Update 2014. *J Alzheimers Dis* 2014; 41: 961–1019.

Gaskin S, Tardif M, Cole E, Piterkin P, Kayello L, Mumby DG. Object familiarization and novel-object preference in rats. *Behav Processes* 2010; 83: 61–71.

Gattaz WF, Schummer B, Behrens S. Effects of zotepine, haloperidol and clozapine on MK-801-induced stereotypy and locomotion in rats. *J Neural Transm Gen Sect* 1994; 96: 227–32.

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, Grace AA. The role of $\alpha 5$ GABAA receptor agonists in the treatment of cognitive deficits in schizophrenia. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 5069–76.

Gill KM, Lodge DJ, Cook JM, Aras S, Grace AA. A novel $\alpha 5$ GABA(A)R-positive allosteric modulator reverses hyperactivation of the dopamine system in the MAM model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 1903–11.

Glykys J, Mann EO, Mody I. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J Neurosci* 2008; 28: 1421–6.

Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10483–88.

Gruber O, Chadha Santucci A, Aach H. Magnetic resonance imaging in studying schizophrenia, negative symptoms, and the glutamate system. *Front Psychiatry* 2014; 5: 32.

Hagan JJ i Jones DN. Predicting drug efficacy for cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2005; 31: 830–53.

Hanlon FM, Weisend MP, Hamilton DA, Jones AP, Thoma RJ, Huang M, Martin K, Yeo RA, Miller GA, Cañive JM. Impairment on the hippocampal-dependent virtual Morris water task in schizophrenia. *Schizophr Res* 2006; 87: 67–80.

Harich S, Gross G, Bepalov A. Stimulation of the metabotropic glutamate 2/3 receptor attenuates social novelty discrimination deficits induced by neonatal phencyclidine treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 2007; 192: 511–9.

Harris D, Clayton T, Cook J, Sahbaie P, Halliwell FR, Furtmüller R, Huck S, Sieghart W, DeLorey MT. Selective Influence on Contextual Memory: Physiochemical Properties Associated with Selectivity of Benzodiazepine Ligands at GABAA Receptors Containing the $\alpha 5$ Subunit. *J Med Chem* 2008; 51: 3788–803.

Hasselmo ME, McGaughy J. High acetylcholine sets circuit dynamics for attention and encoding: low acetylcholine sets dynamics for consolidation. *Progress in Brain Research* 2004; 145: 207–231.

Hasselmo ME, Sarter M. Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 52–73.

Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16: 710–5.

Hauser J, Rudolph U, Keist R, Mohler H, Feldon J, Yee BK: Hippocampal alpha5 subunit-containing GABAA receptors modulate the expression of prepulse inhibition. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 201–7.

Hausrat TJ, Muhia M, Gerrow K, Thomas P, Hirdes W, Tsukita S, Heisler FF, Herich L, Dubroqua S, Breiden P, Feldon J, Schwarz JR, Yee BK, Smart TG, Triller A, Kneussel M. Radixin regulates synaptic GABAA receptor density and is essential for reversal learning and short-term memory. *Nat Commun* 2015; 6: 6872.

Heinrich JN, Butera JA, Carrick T, Kramer A, Kowal D, Lock T, Marquis KL, Pausch MH, Popiolek M, Sun SC, Tseng E, Uveges AJ, Mayer SC. Pharmacological comparison of muscarinic ligands: historical versus more recent muscarinic M1-preferring receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 2009; 605: 53–6.

Hlinak Z i Krejci I. Effects of excitatory amino acid antagonists on social recognition of male rats. *Behav Pharmacol* 1994; 5: 239–44.

Hofmann M, Kordás KS, Gravius A, Bölskei K, Parsons CG, Dekundy A, Danysz W, Dézsi L, Wittko-Schneider IM, Sághy K, Gyertyán I, Horváth C. Assessment of the effects of NS11394 and L-838417, $\alpha 2/3$ subunit-selective GABAA receptor-positive allosteric modulators, in tests for pain, anxiety, memory and motor function. *Behav Pharmacol* 2012; 23: 790–801.

Hoftman GD, Volk DW, Bazmi HH, Li S, Sampson AR, Lewis DA. Altered cortical expression of GABA-related genes in schizophrenia: illness progression vs developmental disturbance. *Schizophr Bull* 2015; 41: 180–91.

Homayoun H i Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci* 2007; 27: 11496–500.

Howes OD i Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III –the final common pathway. *Schizophr Bull* 2009; 35: 549–62.

Huang Q, He X, Ma C, Liu R, Yu S, Dayer CA, Wenger GR, McKernan R, Cook JM. Pharmacophore/receptor models for GABA(A)/BzR subtypes ($\alpha 1\beta 3\gamma 2$, $\alpha 5\beta 3\gamma 2$, and $\alpha 6\beta 3\gamma 2$) via a comprehensive ligand-mapping approach. *J Med Chem* 2000; 43: 71–95.

Imperato A, Dazzi L, Serra M, Gessa GL, Biggio G. Differential effects of abecarnil on basal release of acetylcholine and dopamine in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 1994; 261: 205–8.

Insel TR i Fernald RD. How the brain processes social information: Searching for the social brain. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 697–722.

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.

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.

Joksimović S, Divljaković J, Van Linn ML, Varagic Z, Brajković G, Milinković MM, Yin W, Timić T, Sieghart W, Cook JM, Savić MM. Benzodiazepine-induced spatial learning deficits in rats are regulated by the degree of modulation of $\alpha 1$ GABA(A) receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* 2013a; 23: 390–9.

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 (Berl)*. 2013b; 230: 113–23.

Jones CA, Watson DJ, Fone KC. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol* 2011; 164: 1162–94.

Jones CK, Byun N, Bubser M. Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37: 16–42.

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.

Karam CS, Ballon JS, Bivens NM, Freyberg Z, Girgis RR, Lizardi-Ortiz JE, Markx S, Lieberman JA, Javitch JA. Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 381–90.

Karasawa J, Hashimoto K, Chaki S. d-Serine and a glycine transporter inhibitor improve MK-801-induced cognitive deficits in a novel object recognition test in rats. *Behav Brain Res* 2008; 186: 78–83.

Kawasaki K, Eigyo M, Ikeda M, Kihara T, Koike K, Matsushita A, Murata S, Shiomi T, Takada S, Yasui M. A novel benzodiazepine inverse agonist, S-8510, as a cognitive enhancer. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1996; 20: 1413–25.

Keeler JF, Robbins TW. Translating cognition from animals to humans. *Biochem Pharmacol* 2011; 81: 1356–66.

Klinkenberg I i Blokland A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev* 2010; 34: 1307–50.

Knust H, Achermann G, Ballard T, Buettelmann B, Gasser R, Fischer H, Hernandez MC, Knoflach F, Koblet A, Stadler H, Thomas AW, Trube G, Waldmeier P. The discovery and unique pharmacological profile of RO4938581 and RO4882224 as potent and selective GABAA α 5 inverse agonists for the treatment of cognitive dysfunction. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 5940–4.

Koh MT, Haberman RP, Foti S, McCown TJ, Gallagher M. Treatment strategies targeting excess hippocampal activity benefit aged rats with cognitive impairment. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 1016–25.

Koh MT, Rosenzweig-Lipson S, Gallagher M. Selective GABAA α 5 positive allosteric modulators improve cognitive function in aged rats with memory impairment. *Neuropharmacology* 2013; 64: 145–52.

Kołaczkowski M, Mierzejewski P, Bienkowski P, Wesołowska A, Newman-Tancredi A. Antipsychotic, antidepressant, and cognitive-impairment properties of antipsychotics: rat profile and implications for behavioral and psychological symptoms of dementia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2014; 387: 545–57.

Kralic JE, Korpi ER, O'Buckley TK, Homanics GE, Morrow AL. Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor α 1 subunit knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 1037–45.

Kurtz MM, Baker E, Pearlson GD, Astur RS. A virtual reality apartment as a measure of medication management skills in patients with schizophrenia: A pilot study. *Schizophr Bull* 2007; 33: 1162–70.

Lamberty Y, Gower AJ. Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water maze. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1991; 309: 5–19.

Laruelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, Innis R. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 56–72.

Leach K, Loiacono RE, Felder CC, McKinzie DL, Mogg A, Shaw DB, Sexton PM, Christopoulos A. Molecular mechanisms of action and in vivo validation of an M4 muscarinic acetylcholine receptor allosteric modulator with potential antipsychotic properties. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 855–69.

Lee KH, Williams LM, Breakspear M, Gordon E. Synchronous gamma activity: a review and contribution to an integrative neuroscience model of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 2003; 41: 57–78.

Leite JV, Guimarães FS, Moreira FA. Aripiprazole, an atypical antipsychotic, prevents the motor hyperactivity induced by psychotomimetics and psychostimulants in mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 578: 222–7.

Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Orey D, Richter F, Samara M, Barbui C, Engel RR, Geddes JR, Kissling W, Stapf MP, Lässig B, Salanti G, Davis JM. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet* 2013; 382: 951–62. Erratum in: *Lancet* 2013; 382: 940

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 312–24.

Lim MM, Bielsky IF, Young LJ. Neuropeptides and the social brain: Potential rodent models of autism. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23: 235–43.

Lindner MD, Balch AH, VanderMaelen CP. Short forms of the "reference-" and "working-memory" Morris water maze for assessing age-related deficits. *Behav Neural Biol* 1992; 58: 94–102.

Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S, Grace AA. Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci* 2008; 31: 234–42.

Lodge DJ, Grace AA. Aberrant hippocampal activity underlies the dopamine dysregulation in an animal model of schizophrenia. *J Neurosci* 2007; 27: 11424–30.

Lodge DJ, Grace AA. Hippocampal dysfunction and disruption of dopamine system regulation in an animal model of schizophrenia. *Neurotox Res* 2008; 14: 97–104.

Longone P, Impagnatiello F, Guidotti A, Costa E. Reversible modification of GABAA receptor subunit mRNA expression during tolerance to diazepam-induced cognition dysfunction. *Neuropharmacology* 1996; 35: 1465–73.

- Lynch G, Palmer LC, Gall CM. The likelihood of cognitive enhancement. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 99: 116–29.
- Makaron L, Moran CA, Namjoshi O, Rallapalli S, Cook JM, Rowlett JK. Cognition-impairing effects of benzodiazepine-type drugs: role of GABAA receptor subtypes in an executive function task in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 2013; 104: 62–8.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5:793–807.
- Martínez-Cué C, Delatour B, Potier MC. Treating enhanced GABAergic inhibition in Down syndrome: use of GABA α 5-selective inverse agonists. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 46: 218–27.
- Mattson MP. Hormesis defined. *Ageing Res Rev* 2008; 7: 1–7.
- Maubach K. GABA(A) receptor subtype selective cognition enhancers. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003; 2: 233–9.
- 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 α 1 subtype. *Nat Neurosci* 2000; 3: 587–92.
- McKinzie DL i Bymaster FP. Muscarinic mechanisms in psychotic disorders. *Handb Exp Pharmacol* 2012; 213: 233–65.
- 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. Diazepam impairs acquisition but not performance in the Morris water maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 38: 651–8.
- Meltzer HY, Rajagopal L, Huang M, Oyamada Y, Kwon S, Horiguchi M. Translating the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist model of schizophrenia to treatments for cognitive impairment in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013; 16: 2181–94.
- Ménard C, Gaudreau P, Quirion R. Signaling pathways relevant to cognition-enhancing drug targets. *Handb Exp Pharmacol* 2015; 228: 59–98.
- Milić M, Timić T, Joksimović S, Biawat P, Rallapalli S, Divljaković J, Radulović T, Cook JM, Savić MM. PWZ-029, an inverse agonist selective for α 5 GABAA receptors, improves object recognition, but not water-maze memory in normal and scopolamine-treated rats. *Behav Brain Res* 2013; 241: 206–13.
- 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 α 5 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.

Mitchell ES, Hoplight BJ, Lear SP, Neumaier JF. BGC20-761, a novel tryptamine analog, enhances memory consolidation and reverses scopolamine-induced memory deficit in social and visuospatial memory tasks through a 5-HT₆ receptor-mediated mechanism. *Neuropharmacology* 2006; 50: 412–20.

Moffat SD, Resnick SM. Effects of age on virtual environment place navigation and allocentric cognitive mapping. *Behav Neurosci* 2002; 116: 851–9.

Möhler H. Cognitive enhancement by pharmacological and behavioral interventions: the murine Down syndrome model. *Biochem Pharmacol* 2012; 84: 994–9.

Möhler H. The legacy of the benzodiazepine receptor: from flumazenil to enhancing cognition in down syndrome and social interaction in autism. *Adv Pharmacol* 2015; 72: 1–36.

Molina LA, Skelin I, Gruber AJ. Acute NMDA receptor antagonism disrupts synchronization of action potential firing in rat prefrontal cortex. *PLoS One* 2014; 9: e85842. Erratum in: *PLoS One* 2014; 9: e104110.

Morris RG. NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology* 2013; 74: 32–40.

Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 1981; 12: 239–60.

Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, Piven J, Crawley JN. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* 2004; 3: 287–302.

Moy SS, Nonneman RJ, Shafer GO, Nikolova VD, Riddick NV, Agster KL, Baker LK, Knapp DJ. Disruption of social approach by MK-801, amphetamine, and fluoxetine in adolescent C57BL/6J mice. *Neurotoxicol Teratol* 2013; 36: 36–46.

Murray EA, Richmond BJ. Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 188–93.

Mutlu O, Ulak G, Celikyurt IK, Akar FY, Erden F. Effects of olanzapine, sertindole and clozapine on learning and memory in the Morris water maze test in naive and MK-801-treated mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 98: 398–404.

Navarro JF, Burón E, Martín-López M. Anxiogenic-like activity of L-655,708, a selective ligand for the benzodiazepine site of GABA(A) receptors which contain the alpha-5 subunit, in the elevated plus-maze test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26: 1389–92.

Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, McLean SL, Snigdha S, Rajagopal L, Harte MK. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of

schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther* 2010; 128: 419–32.

Neill JC, Harte MK, Haddad PM, Lydall ES, Dwyer DM. Acute and chronic effects of NMDA receptor antagonists in rodents, relevance to negative symptoms of schizophrenia: a translational link to humans. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014; 24: 822–35.

Newcomer JW, Farber NB, Olney JW. NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues Clin Neurosci* 2000; 2: 219–32.

Newcomer JW, Krystal JH. NMDA receptor regulation of memory and behavior in humans. *Hippocampus* 2001; 11: 529–42.

Nilsson M, Hansson S, Carlsson A, Carlsson ML. Differential effects of the N-methyl-d-aspartate receptor antagonist MK-801 on different stages of object recognition memory in mice. *Neurosci* 2007; 149: 123–30.

Nuechterlein KH, Barch DM, Gold JM, Goldberg TE, Green MF, Heaton RK. Identification of separable cognitive factors in schizophrenia. *Schizophr Res* 2004; 72: 29–39.

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.

Nyiri G, Freund TF, Somogyi P. Input-dependent synaptic targeting of alpha(2)-subunit-containing GABA(A) receptors in synapses of hippocampal pyramidal cells of the rat. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 428–42.

Obradović ALj, Joksimović S, Poe MM, Ramerstorfer J, Varagic Z, Namjoshi O, Batinić B, Radulović T, Marković B, Roth BL, Sieghart W, Cook JM, Savić MM. Sh-I-048A, an in vitro non-selective super-agonist at the benzodiazepine site of GABAA receptors: the approximated activation of receptor subtypes may explain behavioral effects. *Brain Res* 2014; 1554: 36–48.

Olsen RW i Sieghart W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 2009; 56: 141–8.

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. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 243–60.

O'Neill MF, Shaw G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D1 agonist C-APB in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 145: 237–50.

Paulson PE, Robinson TE. Amphetamine-induced time-dependent sensitization of dopamine neurotransmission in the dorsal and ventral striatum: a microdialysis study in behaving rats. *Synapse* 1995; 19: 56–65.

- Paulson PE, Robinson TE. Regional differences in the effects of amphetamine withdrawal on dopamine dynamics in the striatum. Analysis of circadian patterns using automated on-line microdialysis. *Neuropsychopharmacology* 1996; 14: 325–37.
- Perry TL, Kish SJ, Buchanan J, Hansen S. Gamma-aminobutyric-acid deficiency in brain of schizophrenic patients. *Lancet* 1979; 1: 237–9.
- 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.
- Povroznik JM, Rudy CC, Hunsberger HC, Tosto DE, Reed MN. Effects of an α 5GABAA inverse agonist on MK-801-induced learning deficits in an incremental repeated acquisition task. *Behav Pharmacol* 2014; 25: 331–5.
- Pratt J, Winchester C, Dawson N, Morris B. Advancing schizophrenia drug discovery: optimizing rodent models to bridge the translational gap. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 560–79.
- Prut L, Prenosil G, Willadt S, Vogt K, Fritschy JM, Crestani F. A reduction in hippocampal GABAA receptor alpha5 subunits disrupts the memory for location of objects in mice. *Genes Brain Behav* 2010; 9: 478–88.
- Quirk K, Blurton P, Fletcher S, Leeson P, Tang F, Mellilo D, Ragan CI, McKernan RM. [3H]L-655,708, a novel ligand selective for the benzodiazepine site of GABAA receptors which contain the alpha 5 subunit. *Neuropharmacology* 1996; 35: 1331–5.
- Raedler TJ, Bymaster FP, Tandon R, Copolov D, Dean B. Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 232–46.
- 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.
- Ramos B, Lopez-Tellez JF, Vela J, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J. Expression of alpha 5 GABAA receptor subunit in developing rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 2004; 151: 87–98.
- Redrobe JP, Elster L, Frederiksen K, Bundgaard C, de Jong IE, Smith GP, Bruun AT, Larsen PH, Didriksen M. Negative modulation of GABAA α 5 receptors by RO4938581 attenuates discrete sub-chronic and early postnatal phencyclidine (PCP)-induced cognitive deficits in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2012; 221: 451–68.
- Reger ML, Hovda DA, Giza CC. Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. *Dev Psychobiol* 2009; 51: 672–8.
- Rezvani AH. Involvement of the NMDA System in Learning and Memory. In: Levin ED, Buccafusco JJ, editors. *Animal Models of Cognitive Impairment*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2006. Chapter 4

- Richetto J, Labouesse MA, Poe MM, Cook JM, Grace AA, Riva MA, Meyer U. Behavioral effects of the benzodiazepine-positive allosteric modulator SH-053-2'F-S-CH₃ in an immune-mediated neurodevelopmental disruption model. *Int J Neuropsychopharmacol* 2015; 18(4).
- Riedel G, Kang SH, Choi DY, Platt B. Scopolamine-induced deficits in social memory in mice: reversal by donepezil. *Behav Brain Res* 2009; 204: 217–25.
- Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 2003; 140: 1–47.
- Rissman RA, Mishizen-Eberz AJ, Carter TL, Wolfe BB, De Blas AL, Miralles CP, Ikonovic MD, Armstrong DM. Biochemical analysis of GABA(A) receptor subunits alpha 1, alpha 5, beta 1, beta 2 in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease neuropathology. *Neuroscience* 2003; 120: 695–704.
- Rodriguez R, Kallenbach U, Singer W, Munk MH. Short- and long-term effects of cholinergic modulation on gamma oscillations and response synchronization in the visual cortex. *J Neurosci* 2004; 24: 10369–78.
- Rogóz Z. Effect of combined treatment with mirtazapine and risperidone on the MK-801-induced changes in the object recognition test in mice. *Pharmacol Rep* 2013; 65: 1401–6.
- Romón T, Mengod G, Adell A. Expression of parvalbumin and glutamic acid decarboxylase-67 after acute administration of MK-801. Implications for the NMDA hypofunction model of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 2011; 217: 231–8.
- 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. Erratum in: *Nature* 2000;404: 629
- Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 685–97.
- Rudolph U, Möhler H. GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2014; 54: 483–507.
- Rung JP, Carlsson A, Rydén Markinhuhta K, Carlsson ML. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 827–32.
- Saab BJ, Maclean AJ, Kanisek M, Zurek AA, Martin LJ, Roder JC, Orser BA. Short-term memory impairment after isoflurane in mice is prevented by the $\alpha 5$ γ -aminobutyric acid type A receptor inverse agonist L-655,708. *Anesthesiology* 2010; 113: 1061–71.

Salesse C, Mueller CL, Chamberland S, Topolnik L. Age-dependent remodelling of inhibitory synapses onto hippocampal CA1 oriens-lacunosum moleculare interneurons. *J Physiol* 2011; 589: 4885–901.

Sambeth A, Riedel WJ, Smits LT, Blokland A. Cholinergic drugs affect novel object recognition in rats: relation with hippocampal EEG? *Eur J Pharmacol* 2007; 572: 151–9.

Sarter M, Lustig C, Taylor SF. Cholinergic contributions to the cognitive symptoms of schizophrenia and the viability of cholinergic treatments. *Neuropharmacology* 2012; 62: 1544–53.

Sarter M, Schneider HH. High density of benzodiazepine binding sites in the substantia innominata of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 30: 679–82.

Savić MM, Clayton T, Furtmüller R, Gavrilović I, Samardžić J, Savić S, Huck S, Sieghart W, Cook JM. PWZ-029, a compound with moderate inverse agonist functional selectivity at GABA(A) receptors containing alpha5 subunits, improves passive, but not active, avoidance learning in rats. *Brain Res* 2008a; 1208: 150–9.

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

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.

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, Obradović DI, Ugrešić ND, Cook JM, Yin W, Van Linn M, Bokonjić DR. Benzodiazepine site inverse agonists and locomotor activity in rats: bimodal and biphasic influence. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 84: 35–42.

Scarr E, Gibbons AS, Neo J, Udawela M, Dean B. Cholinergic connectivity: its implications for psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 55.

Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 2011; 221: 555–63.

Schwartz TL, Sachdeva S, Stahl SM. Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia. *Front Pharmacol* 2012; 3:195.

Seeman P. Dopamine D2 receptors as treatment targets in schizophrenia. *Clin Schizophr Relat Psychoses* 2010; 4: 56–73.

Seeman P. Schizophrenia and dopamine receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* 2013; 23: 999–1009.

Sergi MJ, Rassovsky Y, Widmark C, Reist C, Erhart S, Braff DL, Marder SR, Green MF. Social cognition in schizophrenia: relationships with neurocognition and negative symptoms. *Schizophr Res* 2007; 90: 316–24.

Serwanski DR, Miralles CP, Christie SB, Mehta AK, Li X, De Blas AL. Synaptic and nonsynaptic localization of GABAA receptors containing the alpha5 subunit in the rat brain. *J Comp Neurol* 2006; 499: 458–70.

Shekhar A, Potter WZ, Lightfoot J, Lienemann J, Dubé S, Mallinckrodt C, Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC. Selective muscarinic receptor agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2008; 165: 1033–9.

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

Sieghart W. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. *Adv Pharmacol* 2006; 54: 231–63.

Skarsfeldt T. Differential effect of antipsychotics on place navigation of rats in the Morris water maze. A comparative study between novel and reference antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)* 1996; 124: 126–33.

Sneider JT, Hamilton DA, Cohen-Gilbert JE, Crowley DJ, Rosso IM, Silveri MM. Sex differences in spatial navigation and perception in human adolescents and emerging adults. *Behav Processes* 2015; 111: 42–50.

Soto PL, Ator NA, Rallapalli SK, Biawat P, Clayton T, Cook JM, Weed MR. Allosteric modulation of GABA(A) receptor subtypes: effects on visual recognition and visuospatial working memory in rhesus monkeys [corrected]. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38: 2315–25. Erratum in: *Neuropsychopharmacology* 2013; 38: 2553.

Squires AS, Peddle R, Milway SJ, Harley CW. Cytotoxic lesions of the hippocampus do not impair social recognition memory in socially housed rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 2006; 85: 95.

Stanhope KJ, Mirza NR, Bickerdike MJ, Bright JL, Harrington NR, Hesselink MB, Kennett GA, Lightowler S, Sheardown MJ, Syed R, Upton RL, Wadsworth G, Weiss SM, Wyatt A. The muscarinic receptor agonist xanomeline has an antipsychotic-like profile in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 782–92.

Sternfeld F, Carling RW, Jelley RA, Ladduwahetty T, Merchant KJ, Moore KW, Reeve AJ, Street LJ, O'Connor D, Sohal B, Atack JR, Cook S, Seabrook G, Wafford K, Tattersall FD, Collinson N, Dawson GR, Castro JL, MacLeod AM. Selective, orally active gamma-aminobutyric acidA alpha5 receptor inverse agonists as cognition enhancers. *J Med Chem* 2004; 47: 2176–9.

- Sun T, Hu G, Li M. Repeated antipsychotic treatment progressively potentiates inhibition on phencyclidine-induced hyperlocomotion, but attenuates inhibition on amphetamine-induced hyperlocomotion: relevance to animal models of antipsychotic drugs. *Eur J Pharmacol* 2009; 602: 334–42.
- Terranova JP, Chabot C, Barnouin MC, Perrault G, Depoortere R, Griebel G, Scatton B. SSR181507, a dopamine D(2) receptor antagonist and 5-HT(1A) receptor agonist, alleviates disturbances of novelty discrimination in a social context in rats, a putative model of selective attention deficit. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 181: 134–44.
- Terry AV Jr i Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 821–7.
- Terry AV Jr. Muscarinic Receptor Antagonists in Rats. In: Levin ED, Buccafusco JJ, editors. *Animal Models of Cognitive Impairment*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2006. Chapter 2
- 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
- Tooney PA i Chahl LA. Neurons expressing calcium-binding proteins in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 273–8.
- Uhlhaas PJ i Singer W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 100–13.
- van der Staay FJ, Rutten K, Erb C, Blokland A. Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. *Behav Brain Res* 2011; 220: 215–29.
- Vauth R, Rusch N, Wirtz M, Corrigan PW. Does social cognition influence the relation between neurocognitive deficits and vocational functioning in schizophrenia? *Psychiatry Res* 2004; 128: 155
- Ventura R, Pascucci T, Catania MV, Musumeci SA, Puglisi-Allegra S. Object recognition impairment in Fmr1 knockout mice is reversed by amphetamine: Involvement of dopamine in the medial prefrontal cortex. *Behav Pharmacol* 2004; 15: 433–42.
- Vorhees CV i Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J* 2014; 55: 310–32.
- Vorhees CV i Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006; 1: 848–58.
- Wan H, Warburton EC, Zhu XO, Koder TJ, Park Y, Aggleton JP, Cho K, Bashir ZI, Brown MW. Benzodiazepine impairment of perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 2214–24.

Wass C, Archer T, Pålsson E, Fejgin K, Klamer D, Engel JA, Svensson L. Effects of phencyclidine on spatial learning and memory: nitric oxide-dependent mechanisms. *Behav Brain Res* 2006; 171: 147–53.

Watson DJ, Loiseau F, Ingallinesi M, Millan MJ, Marsden CA, Fone KC. Selective blockade of dopamine D3 receptors enhances while D2 receptor antagonism impairs social novelty discrimination and novel object recognition in rats: a key role for the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37: 770–86.

Weiner I i Arad M. Using the pharmacology of latent inhibition to model domains of pathology in schizophrenia and their treatment. *Behav Brain Res* 2009; 204: 369–86.

Weniger G i Irle E. Allocentric memory impaired and egocentric memory intact as assessed by virtual reality in recent-onset schizophrenia. *Schizophr Res* 2008; 101: 201–9.

Wilson IA, Ikonen S, Gallagher M, Eichenbaum H, Tanila H. Age-associated alterations of hippocampal place cells are subregion specific. *J Neurosci* 2005; 25: 6877–86.

Wong EHF, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-d-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7104–8.

Woolley ML, Marsden CA, Sleight AJ, Fone KC. Reversal of a cholinergic-induced deficit in a rodent model of recognition memory by the selective 5-HT6 receptor antagonist, Ro 04-6790. *Psychopharmacology (Berl)* 2003; 170: 358–67.

Yee BK, Hauser J, Dolgov VV, Keist R, Möhler H, Rudolph, U, Feldon J. GABA receptors containing the alpha5 subunit mediate the trace effect in aversive and appetitive conditioning and extinction of conditioned fear. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 1928–36.

Young JW, Powell SB, Geyer MA. Mouse pharmacological models of cognitive disruption relevant to schizophrenia. *Neuropharmacology* 2012; 62: 1381–90.

Young JW, Powell SB, Risbrough V, Marston HM, Geyer MA. Using the MATRICS to guide development of a preclinical cognitive test battery for research in schizophrenia. *Pharmacol Ther* 2009; 122: 150–202.

Yu ZY, Wang W, Fritschy JM, Witte OW, Redecker C. Changes in neocortical and hippocampal GABAA receptor subunit distribution during brain maturation and aging. *Brain Res* 2006; 1099: 73–81.

Zarnowska ED, Keist R, Rudolph U, Pearce RA. GABAA receptor alpha5 subunits contribute to GABAA,slow synaptic inhibition in mouse hippocampus. *J Neurophysiol* 2009; 101: 1179–91.

Zhang W, Yamada M, Gomeza J, Basile AS, Wess J. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice. *J Neurosci* 2002; 22: 6347–52.

Zou H, Zhang C, Xie Q, Zhang M, Shi J, Jin M, Yu L. Low dose MK-801 reduces social investigation in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 753–7.

Zurek AA, Bridgwater EM, Orser BA. Inhibition of $\alpha 5$ γ -Aminobutyric acid type A receptors restores recognition memory after general anesthesia. *Anesth Analg* 2012; 114: 845–55.

BIOGRAFIJA

Tamara Timić (StameniĆ) je rođena 22.05.1983. godine u Jagodini, gde je završila osnovnu školu i prirodno-matematički smer gimnazije „Svetozar Marković“. Studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2002/03. i diplomirala 2009. sa prosečnom ocenom 9,74. Diplomski rad iz Toksikološke hemije sa nazivom „Organizacija monitoringa životne sredine u EU, sa posebnim osvrtom na ekotoksikološke aspekte ekosistema“ položila je sa ocenom 10. Tokom studija, zbog izuzetnih rezultata, bila je dobitnik brojnih stipendija.

Po diplomiranju upisala je doktorske studije školske 2009/10. godine iz Farmakologije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Dobitnica je stipendije Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja 2009. godine i kao stipendista angažovana na projektu Ministarstva broj 145022B (realizovan projekat). Od 1. januara 2011. godine radi kao istraživač-pripravnik na projektu „Bihejvioralni efekti ponavljane primene novosintetisanih supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazpinskog mesta vezivanja GABA A receptora: poređenje sa standardnim psihofarmakološkim lekovima“ iz Osnovnih istraživanja - Medicina (broj projekta 175076, rukovodilac prof. dr Miroslav Savić) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od decembra 2013. izabrana je u istraživača saradnika.

Do sada je objavila 12 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja, 6 u časopisima kategorije M21. Na naučnim skupovima u inostranstvu učestvovala je sa deset saopštenja.

Učestvovala je u realizaciji praktične nastave iz predmeta Farmakologija i Farmakoterapija na Katedri za Farmakologiju i bila mentor studentskih naučno-istraživačkih radova. Dobitnica je nagrade *European College of Neuropsychopharmacology Travel Award* za 2014. godinu, kao i *European College of Neuropsychopharmacology Seminar Award* za 2014. godinu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Тамара Тимић Стаменић

број индекса 2/09

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај модулације ГАБА_A рецептора који садрже α_5 подјединицу на поремећаје понашања пацова изазване применом дизоцилпина, скополамина и амфетамина

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.9.2015.

Тамић Стаменић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тамара Тимић Стаменић

Број индекса 2/09

Студијски програм докторске академске студије из фармакологије

Наслов рада Утицај модулације ГАБА_A рецептора који садрже α_5 подјединицу на поремећаје понашања пацова изазване применом дизоцилина, скополамина и амфетамина

Ментор проф. др Мирослав Савић

Потписани/а Тамара Тимић Стаменић

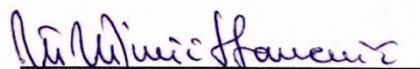
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.9.2015.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај модулације ГАБА_A рецептора који садрже α_5 подјединицу на поремећаје понашања пацова изазване применом дизоцилпина, скополамина и амфетамина

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

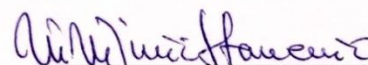
5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.9.2015.



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.