

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jovana M. Kovačević

**RAZVOJ TOLERANCIJE I FIZIČKE  
ZAVISNOSTI TOKOM PONAVLJANE  
PRIMENE DIAZEPAMA KOD PACOVA:  
ULOGA MODULACIJE NA GABA<sub>A</sub>  
RECEPTORIMA KOJI SADRŽE  $\alpha_1$  I  $\alpha_5$   
PODJEDINICU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Jovana M. Kovačević

**DEVELOPMENT OF TOLERANCE AND  
PHYSICAL DEPENDENCE DURING  
PROTRACTED TREATMENT WITH  
DIAZEPAM IN RATS: THE ROLE OF  
MODULATION AT GABA<sub>A</sub> RECEPTORS  
CONTAINING THE  $\alpha_1$ - AND  $\alpha_5$ - SUBUNIT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

**MENTOR  
DOKTORSKE DISERTACIJE:**

Dr Miroslav Savić, vanredni profesor  
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

Dr Miroslav Savić, vanredni profesor  
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

---

Dr Nenad Ugrešić, redovni profesor  
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

---

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

**DATUM ODBRANE:**

## SKRAĆENICE I AKRONIMI

**AD** – akutni diazepam

**ANOVA** – analiza varijanse

**BZ** – benzodiazepin

**CNS** – centralni nervni sistem

**DZP** - diazepam

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

**ER** – endoplazmatski retikulum

**FLU** - flumazenil

**GABA** –  $\gamma$ -amino buterna kiselina

**GAD** – glutamat dekarboksilaza

**iRNK** – informaciona ribonukleinska kiselina

**IUPHAR** – Međunarodni savez bazične i kliničke farmakologije (eng. *The international union of basic and clinical pharmacology*)

**JS** – jačina stiska

**MKB** – Međunarodna klasifikacija bolesti

**OD** – obustava diazepama

**PTZ** - pentilentetrazol

**SLA** – spontana lokomotorna aktivnost

**SNK** – Student Newman Keuls test

**SOL** – rastvarač (eng. *solvent*)

**TM** – transmembranski domen

**UPL** – vzdignuti plus lavirint

**Xli093** - 4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboksilna kiselina, 8-etinil-5,6-dihidro-5-metil-6-okso-,1,3-propanediil estar

**βCCt** - β-karbolin-3-karboksilat-t-butil estar

**5HT** – 5-hidroksitriptamin

## **Razvoj tolerancije i fizičke zavisnosti tokom ponavljane primene diazepama kod pacova: uloga modulacije na GABA<sub>A</sub> receptorima koji sadrže $\alpha_1$ i $\alpha_5$ podjedinicu**

### **Rezime**

Klasični benzodiazepini deluju kao pozitivni alosterni modulatori GABA<sub>A</sub> receptora koji uz  $\gamma_2$  podjedinicu sadrže i jednu od sledećih  $\alpha$  podjedinica:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ili  $\alpha_5$ . Ojačavajući inhibitornu neurotransmisiju u centralnom nervnom sistemu, benzodiazepini dovode do niza akutnih farmakoloških efekata, među kojima su najznačajniji anksiolitičko, antikonvulzivno, sedativno, hipnotičko i miorelaksantno dejstvo. Iako spadaju u najpropisivanije psihotropne lekova u kliničkoj praksi, dugotrajnu primenu benzodiazepina otežava rizik od razvoja farmakoloških efekata tolerancije i fizičke zavisnosti. Negativne posledice ovih fenomena pretpostavljene su još 1961. godine, neposredno po uvođenju prvih benzodiazepina, hlordiazepoksida i diazepama. Tačan mehanizam razvoja tolerancije i fizičke zavisnosti nakon ponavljane primene benzodiazepina još uvek nije poznat.

Razvoj tolerancije, odnosno oslabljenog odgovora na lek, predstavlja adaptivni odgovor organizma na produženo izlaganje leku. Poznato je da se tolerancija na pojedine bihevioralne efekte benzodiazepina razvija različitom brzinom i u različitom obimu. Tolerancija se najpre razvija na sedativno dejstvo, zatim na antikonvulzivni efekat, dok i dalje nije razjašnjeno da li ponavljana primena benzodiazepina dovodi do razvoja tolerancije na anksiolitičko i amnezijско dejstvo. Istraživanja na molekularnom i celularnom nivou upućuju da se u osnovi razvoja tolerancije nalaze neuroadaptivne promene na nivou GABA-ergičkog sistema koje dovode do oslabljenog odgovora GABA<sub>A</sub> receptora nakon primene benzodiazepina.

Fizička zavisnost predstavlja adaptivno stanje organizma koje se uobičajeno ispoljava kroz sindrom obustave nakon naglog prekida dugotrajne primene. Znaci i simptomi sindroma obustave benzodiazepina uključuju anksioznost, nesanicu, disforiju, tremor, bolove u mišićima i povećanu osetljivost na konvulzivne napade. U zavisnosti od doze i farmakokinetičkih karakteristika leka koji se primenjuje, zavisnost na benzodiazepine se

može razviti nakon 7 dana do 4 sedmice primene. Osim neuroadaptivnih promena na nivou GABA<sub>A</sub> receptora, važnu ulogu u razvoju fizičke zavisnosti mogu imati i adaptivne promene na nivou drugih sistema, kao što su glutamatergički ili dopaminergički.

Sa aspekta razvoja ligandna benzodiazepinskog veznog mesta na GABA<sub>A</sub> receptorima sa suženim profilom dejstva veoma je važno utvrditi ulogu aktivacije određenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u nastanku fenomena tolerancije i fizičke zavisnosti. Stoga je cilj disertacije bio da se ispita uticaj režima primene diazepama na razvoj tolerancije i fizičke zavisnosti, praćenih kroz ispoljavanje promena u bihevioralnim efektima diazepama kod pacova Wistar soja. Dodatno, primenom farmakološkog pristupa selektivne blokade podtipova GABA<sub>A</sub> receptora ispitana je uloga GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$ - i  $\alpha_5$ -podjedinicu u nastanku navedenih fenomena.

U istraživanjima je pokazano da ponavljana *i.p.* primena diazepama u dozi 2 mg/kg ili 5 mg/kg dovodi do razvoja tolerancije na sedativno dejstvo nakon ponavljane primene tretmana jednom ili dva puta dnevno u periodu između 3 i 14 dana. S druge strane, ponavljana primena niže doze diazepama (0,5 mg/kg), jednom dnevno, dovodi do izraženijeg sedativnog efekta diazepama primenjenog neposredno pre testiranja u dozi 2 mg/kg. Promene u anksiolitičkom dejstvu diazepama primenjenog *i.p.* u dozi 2 mg/kg nakon 14 dana ponavljane primene zavise od doze diazepama korišćene tokom ponavljano tretmana. Naime, rezultati su pokazali da ponavljana primena iste doze diazepama dovodi do izraženijeg anksiolitičkog efekta u testu uzdignutog plus lavirinta, dok se slabljenje anksiolitičkog dejstva zapaža nakon ponavljane primene diazepama u dozi 10 mg/kg. Tolerancije na miorelaksantno dejstvo diazepama u dozi 2 mg/kg nakon ponavljane primene diazepama razvila se nezavisno od doze primenjivane tokom ponavljano tretmana. Primenom uz diazepam selektivnih neutralnih modulatora GABA<sub>A</sub> receptora za podtipove receptora koji sadrže  $\alpha_1$  ili  $\alpha_5$  podjedinicu,  $\beta$ CCt-a i XLi093, pokazana je značajna uloga aktivacije navedenih podtipova receptora na razvoj tolerancije na sedativno dejstvo nakon 7 dana ponavljane primene tretmana. Zapravo, produžena blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu olakšala je razvoj tolerancije na sedativno dejstvo

diazepama, dok je blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu u određenoj meri ublažila razvoj navedenog fenomena.

Rezultati razvoja fizičke zavisnosti nakon ponavljane primene diazepama ukazuju na značajan uticaj doze, dužine ponavljane primene tretmana i vremenskog perioda nakon obustave na ispoljavanje praćenog znaka ili simptoma fizičke zavisnosti. Tako je ponašanje nalik anksioznosti detektovano u uzdignutom plus lavirintu 24 h po poslednjoj primeni diazepama već nakon 7 dana, režimom *i.p.* primene 2 puta dnevno. Povećan nivo anksioznosti i povećana osetljivost prema konvulzivnim napadima razvijaju se nakon dvadeset jednog dana ponavljane primene iste doze diazepama jednom dnevno. Dodatno, sposobnost neselektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora, flumazenila, kao i  $\alpha_1$ -selektivnog neutralnog modulatora,  $\beta$ CCt-a, da otklone povećan nivo anksioznosti kada se primene neposredno pre testiranja ukazuje da neuroadaptivne promene na nivou GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu mogu imati značajnu ulogu u ispoljavanju fizičke zavisnosti na benzodiazepine, praćene kroz promene u nivou anksioznosti. S druge strane, dugotrajni izostanak aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu tokom ponavljane primene tretmana ne utiče na nivo anksioznosti nakon obustave ponavljano tretmana. Rezultati su pokazali da uloga potencijacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u nastanku povećane osetljivosti prema konvulzivnim napadima zavisi od dužine ponavljane primene. Tako blokada ovog podtipa receptora tokom 21 dana dovodi do izražene osetljivosti prema konvulzivnim napadima izazvanim pentilentetrazolom, dok nakon 28 dana može da prevenira povećanu osetljivost prema konvulzivnim napadima.

Generalno, dobijeni rezultati ukazuju na istovremeno učešće više podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju fenomena tolerancije i fizičke zavisnosti nakon ponavljane primene diazepama. Izostanak potencijacije na nivou GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, kao najzastupljenije populacije receptora, nije dovoljan za konzistentnu prevenciju razvoja tolerancije i fizičke zavisnosti. Ipak, akutna blokada ovog podtipa receptora može sprečiti ispoljavanje povećanog nivoa anksioznosti, kao najčešćeg simptoma fizičke zavisnosti na benzodiazepine.



**Ključne reči:** diazepam, tolerancija, fizička zavisnost, neutralni alosterni modulatori GABA<sub>A</sub> receptora

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmakologija

**UDK broj:**

## **Development of tolerance and physical dependence during protracted treatment with diazepam in rats: the role of modulation at GABA<sub>A</sub> receptors containing the $\alpha_1$ - and $\alpha_5$ - subunit**

### **Abstract**

Classical benzodiazepines act as positive allosteric modulators on GABA<sub>A</sub> receptors containing the  $\gamma_2$  subunit in addition to one of the following  $\alpha$  subunits:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  or  $\alpha_5$ . Benzodiazepines induce acute pharmacological effects by enhancing inhibitory neurotransmission in the CNS, and their most important actions are anxiolytic, anticonvulsive, sedative, hypnotic and muscle relaxant effects. Although benzodiazepines are among the most prescribed psychotropic drugs in the clinical practice, their long-term use is hampered by risk for development of pharmacological effects such as tolerance and physical dependence. Negative consequences of these phenomena were predicted in 1961, immediately after introduction of first benzodiazepines, chlordiazepoxide and diazepam. The exact mechanisms of development of tolerance and physical dependence to benzodiazepines after protracted treatment are still unknown.

Development of tolerance, defined as a reduced responsiveness to a drug, is an adaptive response of the body to the repeated administration of the drug. It is established that tolerance to the specific behavioral effect of benzodiazepines develops at different rates and to different degrees. Tolerance first develops to the sedative effect, then to the anticonvulsant effect, while it is not certain whether protracted administration of benzodiazepines leads to the development of tolerance to the anxiolytic and amnesic effects. The investigations at the molecular and cellular level indicate that the mechanisms underlying development of tolerance involve adaptive neuronal changes at the level of the GABA-ergic system leading to decreased responsiveness of GABA<sub>A</sub> receptors to the effects of benzodiazepines.

Physical dependence is a state of adaptation, usually manifested by withdrawal syndrome upon abrupt termination of protracted benzodiazepine treatment. Signs and symptoms of withdrawal syndrome include anxiety, insomnia, dysphoria, tremor, muscle pain and increased seizures susceptibility. Depending on the administered dose and pharmacokinetic characteristics, dependence on benzodiazepines can develop in the period between 7 days and 4 weeks. It has been assumed that in addition to adaptive changes at the level of GABA<sub>A</sub> receptors, the adaptive changes in other neurotransmitter systems, such as glutamatergic and dopaminergic, could also have important role in development of physical dependence.

From the aspect of development of novel ligands for the benzodiazepine binding site at GABA<sub>A</sub> receptors with the narrower spectrum of action, it is important to establish the contribution of specific subtypes of GABA<sub>A</sub> receptors in the processes underlying development of tolerance and dependence. Therefore, the aim of this dissertation was to investigate the influence of protracted diazepam administration regimen on the development of tolerance and physical dependence, assessed through the changes in the behavioral effects of diazepam in Wistar rats. Additionally, using the pharmacological approach of the protracted selective blockade of specific subtypes of GABA<sub>A</sub> receptors, the role of GABA<sub>A</sub> receptors containing the  $\alpha_1$ - and  $\alpha_5$ - subunit in processes underlying the before-mentioned phenomena was also investigated.

Our investigation showed that tolerance to the sedative effect of diazepam ensued after protracted *i.p.* administration of diazepam at the dose of 2 mg/kg or 5 mg/kg, once- or twice- daily, in the period of protracted administration between 3 and 14 days. On the other hand, protracted administration of the lower dose of diazepam (0.5 mg/kg) once daily resulted in the potentiation of the sedative effect of acute challenge with 2 mg/kg diazepam. Changes in the anxiolytic effect of acute challenge with 2 mg/kg diazepam were dependent on the dose of diazepam used during 14 days of the protracted treatment. Namely, the results indicated an enhanced anxiolytic effect after protracted administration of the same dose of diazepam in the elevated plus maze test, whilst protracted administration of the 10 mg/kg diazepam diminished the anxiolytic response. Tolerance to the muscle relaxant

effect of 2 mg/kg diazepam ensued after protracted treatment with diazepam regardless the dose used. An important role of activation of specific subtypes of GABA<sub>A</sub> receptors in processes underlying tolerance to the sedative effect after 7 days of protracted treatment was investigated by protracted co-administration of the  $\alpha_1$ - and  $\alpha_5$ - selective neutral modulators,  $\beta$ CCt and XLi093, with diazepam. Namely, protracted blockade of the  $\alpha_1$ -containing GABA<sub>A</sub> receptors facilitated the development of tolerance to the sedative effect, whilst the blockade of the  $\alpha_5$ - containing GABA<sub>A</sub> receptors diminished development of tolerance to the sedative effect.

In regard to the results of development of physical dependence after protracted administration of diazepam, the significant influence of the dose, duration of treatment and time period after withdrawal on the observed signs or symptoms of dependence was observed. An anxiety-like behavior was detected in the elevated plus maze 24 h after cessation of protracted *i.p.* treatment with 2 mg/kg diazepam, twice daily, during 7 days. An increased seizure susceptibility and increased anxiety level developed after 21 days of protracted once daily administration of 2 mg/kg diazepam. Additionally, the ability of non-selective neutral allosteric modulator, flumazenil, as well as  $\alpha_1$ - selective neutral modulator,  $\beta$ CCt, to alleviate diazepam withdrawal-induced anxiety suggested that neuroadaptive changes at the level of  $\alpha_1$ -containing GABA<sub>A</sub> receptors could have an important role in the mechanisms underlying manifestation of benzodiazepine physical dependence. On the other hand, long-term lack of potentiation at  $\alpha_1$ -containing GABA<sub>A</sub> receptors during protracted treatment did not affect anxiety level after cessation of treatment. Moreover, the results have suggested differential role of  $\alpha_1$ -containing GABA<sub>A</sub> receptors in the increased seizure susceptibility, depending on the duration of treatment. In particular, the protracted blockade at this subtype of GABA<sub>A</sub> receptors increased seizure susceptibility to pentylentetrazole after 21 days of treatment, whilst it prevented the diazepam withdrawal-elicited increase in seizure susceptibility after 28 days of treatment.

Taken together, the results from this dissertation suggest simultaneous role of several subtypes of GABA<sub>A</sub> receptors in the processes underlying development of tolerance and physical dependence after protracted diazepam treatment. The lack of potentiation at  $\alpha_1$ -

containing GABA<sub>A</sub> receptors is not sufficient for consistent prevention of the development of tolerance and physical dependence. However, the acute blockade of this subtype of GABA<sub>A</sub> receptor can prevent the manifestation of increased anxiety, as the most frequent symptom of benzodiazepine dependence.

**Key words:** diazepam, tolerance, physical dependence, neutral allosteric modulators at GABA<sub>A</sub> receptors

**Academic expertise:** Pharmacy

**Major in:** Pharmacology

**UDC N°:**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 ISTORIJSKI ASPEKTI OTKRIĆA I PRIMENE BENZODIAZEPINA .....	1
1.2 BENZODIAZEPINI: POZITIVNI ALOSTERNI MODULATORI GABA <sub>A</sub> RECEPTORA .....	4
1.2.1 GABA <sub>A</sub> receptori .....	4
1.2.2 Alosterna vezna mesta GABA <sub>A</sub> receptora.....	8
1.2.3 Ligandi benzodiazepinskog mesta vezivanja .....	9
1.3 POVEZIVANJE FARMAKOLOŠKIH EFEKATA BENZODIAZEPINA I AKTIVACIJE ODREĐENIH PODTIPOVA GABA <sub>A</sub> RECEPTORA.....	11
1.4 FENOMENI KOJI SE MOGU RAZVITI NAKON DUGOTRAJNE PRIMENE BENZODIAZEPINA .....	13
1.4.1 TOLERANCIJA .....	13
1.4.1.1 Razvoj tolerancije na bihevioralne efekte benzodiazepina nakon ponavljane primene.....	13
1.4.1.2 Pretpostavljeni neuroadaptivni mehanizmi koji se nalaze u osnovi tolerancije na efekte benzodiazepina .....	15
1.4.1.3 Povezivanje aktivacije određenih podtipova GABA <sub>A</sub> receptora i fenomena tolerancije .....	17
1.4.2 ZAVISNOST .....	18
1.4.2.1 Razvoj fizičke zavisnosti nakon ponavljane primene benzodiazepina .....	18
1.4.2.2 Pretpostavljeni neuroadaptivni mehanizmi koji dovode do razvoja fizičke zavisnosti na benzodiazepine .....	21
1.4.2.3 Povezivanje aktivacije određenih podtipova GABA <sub>A</sub> receptora i fenomena fizičke zavisnosti.....	22
1.4.3 ADIKCIJA .....	23
1.4.3.1 Razvoj adikcije na benzodiazepine .....	23
1.4.3.2 Pretpostavljeni neuroadaptivni mehanizmi koji dovode do razvoja adikcije na benzodiazepine .....	24

1.4.3.3 Povezivanje aktivacije određenih podtipova GABA <sub>A</sub> receptora i fenomena adicije .....	24
1.5 PERSPEKTIVA DALJIH ISTRAŽIVANJA .....	25
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>29</b>
3.1 ŽIVOTINJE .....	29
3.2 SUPSTANCE.....	29
3.3 BIHEJVORALNI TESTOVI.....	30
3.3.1 Test spontane lokomotorne aktivnosti (SLA test).....	30
3.3.2 Uzdignuti plus lavirint (UPL) .....	31
3.3.3 Test jačine stiska (JS).....	32
3.3.4 Intravenski pentilentetrazolski test ( <i>i.v.</i> PTZ) test.....	33
3.4 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA LIGANADA U PLAZMI I MOZGU.....	34
3.5 PRIMENJENI EKSPERIMENTALNI PROTOKOLI .....	35
EKSPERIMENT 1.1 .....	35
EKSPERIMENT 1.2 .....	36
EKSPERIMENT 1.3 .....	37
EKSPERIMENT 1.4 .....	39
EKSPERIMENT 1.5 .....	40
EKSPERIMENT 2.1 .....	42
EKSPERIMENT 2.2 .....	43
EKSPERIMENT 2.3 .....	44
3.6 STATISTIČKA OBRADA REZULTATA .....	45
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>46</b>
EKSPERIMENT 1.1 .....	46
EKSPERIMENT 1.2 .....	53
EKSPERIMENT 1.3 .....	59
EKSPERIMENT 1.4 .....	64
EKSPERIMENT 1.5 .....	68
EKSPERIMENTI 2.1 I 2.2 .....	73

EKSPERIMENT 2.3 .....	78
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>82</b>
5.1 UTICAJ RUKOVANJA I SVAKODNEVNE PRIMENE RASTVARAČA NA EFEKTE DIAZEPAMA NAKON PONAVALJANE PRIMENE .....	84
5.2 UTICAJ DOZE I DUŽINE TRETMANA NA EFEKTE DIAZEPAMA I RAZVOJ TOLERANCIJE NAKON PONAVALJANE PRIMENE.....	85
5.3 ULOGA MODULACIJE NA GABA <sub>A</sub> RECEPTORIMA KOJI SADRŽE $\alpha_1$ I $\alpha_5$ PODJEDINICU I DUŽINE PONAVALJANE PRIMENE TRETMANA U RAZVOJU TOLERANCIJE NA SEDATIVNO DEJSTVO DIAZEPAMA .....	91
5.4 UTICAJ DOZE, DUŽINE TRETMANA I PERIODA NAKON OBUSTAVE PONAVALJANE PRIMENE DIAZEPAMA NA RAZVOJ I ISPOLJAVANJE FIZIČKE ZAVISNOSTI.....	97
5.5 ULOGA GABA <sub>A</sub> RECEPTORA KOJI SADRŽE $\alpha_1$ PODJEDINICU NA ISPOLJAVANJE POVEĆANOG NIVOVA ANKSIOZNOSTI NAKON OBUSTAVE PONAVALJANE PRIMENE DIAZEPAMA .....	101
5.6 ULOGA GABA <sub>A</sub> RECEPTORA KOJI SADRŽE $\alpha_1$ PODJEDINICU U MEHANIZMIMA ODGOVORNIM ZA RAZVOJ FIZIČKE ZAVISNOSTI .....	104
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>108</b>
<b>7. SPISAK LITERATURE .....</b>	<b>111</b>



## 1. UVOD

### 1.1 ISTORIJSKI ASPEKTI OTKRIĆA I PRIMENE BENZODIAZEPINA

Benzodiazepini su otkriveni u drugoj polovini pedesetih godina XX veka od strane dr Leo Sternbacha, zaposlenog u kompaniji Fritz Hoffman-La Roche. Pre uvođenja benzodiazepina, u cilju suzbijanja anksioznosti koristili su se prevashodno barbiturati i meproamat. Iako veoma efikasni u suzbijanju anksioznosti, primena ovih lekova povezivana je sa izraženim neželjenim efektima kao što su sedacija, paradoksalna ekscitacija i konfuzija. Dodatno, primena velikih doza barbiturata ili meproamata mogla je dovesti do predoziranja sa mogućim fatalnim posledicama, a dugotrajna primena nosila je rizik od zloupotrebe i razvoja zavisnosti koji se karakterisao izraženim sindromom obustave. Kao odgovor na potrebu za novim, bezbednijim „trankvilizerima“, odnosno anksioliticima, 1956. godine otkriven je hlordiazepoksid (Librium), koji je registrovan 1960. godine. Samo tri godine kasnije registrovan je diazepam (Valium), koji će postati jedan od najpropisivanijih benzodiazepina. U narednim godinama otkriveni su i registrovani i mnogi drugi benzodiazepini, kao što su flurazepam, flunitrazepam, klonazepam. Zbog poboljšanog profila bezbednosti u odnosu na prethodno primenjivane lekove popularnost benzodiazepina je rasla enormno. Diazepam, odnosno Valium, postao je najpropisivaniji lek u Sjedinjenim Američkim Državama u periodu između 1969. i 1982. godine, pa je tako godine 1978. u Americi izdato 2,3 milijardi doza ovog leka (Lader, 2011; Dell’osso i Lader, 2013).

Iako su primarno razvijeni kao anksiolitici, ubrzo su otkrivena i druga klinički veoma korisna dejstva benzodiazepina kao što su: hipnotičko dejstvo, miorelaksantno dejstvo i antiepileptički efekat. Međutim, primena benzodiazepina neodvojivo je povezana i sa nizom neželjenih efekata, među kojima se izdvajaju sedacija, oštećenje motorne koordinacije (ataksija) i kognitivni efekti (anterogradna amnezija), dok se nakon dugotrajne

primene razvijaju tolerancija na efekte benzodiazepina i zavisnost, koja se manifestuje sindromom obustave nakon naglog prekida primene (Baldwin i sar., 2013).

U vreme kada su prvi benzodiazepini otkriveni i registrovani nije se znalo mnogo o njihovom mehanizmu dejstva. Prvi dokazi o potencijalnom mehanizmu dejstva benzodiazepina publikovani su 1975. godine kada je pokazana sposobnost diazepama da potencira GABA-om posredovanu inhibitornu neurotransmisiju u mozgu (Costa i sar., 1975). Samo dve godine kasnije Möhler i Okada dokazali su prisustvo visoko-afinitetnog i specifičnog veznog mesta za benzodiazepine u mozgu (Möhler i Okada, 1977). Dalja istraživanja su pokazala da se vezno mesto za benzodiazepine nalazi u okviru transmembranskog makromolekularnog kompleksa zajedno sa veznim mestom za neurotransmitter GABA-u i hloridnim kanalom, što je dovelo do upotrebe termina „GABA-benzodiazepinski receptor“ (Barnard i sar., 1998). Vezujući se za benzodiazepinsko vezno mesto, benzodiazepini povećavaju učestalost otvaranja hloridnog kanala, ali za razliku od barbiturata ne utiču na dužinu otvorenosti kanala (Study i Barker, 1981). Razvoj liganada ne-benzodiazepinske strukture koji se različitim afinitetima vezuju za benzodiazepinska mesta vezivanja u cerebelumu i drugim strukturama, doveo je do razvoja ideje o dva tipa „GABA-BZ receptora“, nazvanih BZ<sub>1</sub> i BZ<sub>2</sub> (Barnard i sar, 1998). Termin „GABA-BZ receptor“ danas više nije u upotrebi, jer je poznato da je benzodiazepinsko vezno mesto samo jedno od nekoliko alosternih veznih mesta na GABA<sub>A</sub> receptoru, kao i to da ovo vezno mesto nije prisutno na svim podtipovima GABA<sub>A</sub> receptora. Takođe, podela na BZ<sub>1</sub> i BZ<sub>2</sub> receptore je prevaziđena, jer je tokom 80-tih i 90-tih godina XX veka, primenom savremenih tehnika molekularne biologije, pokazano prisustvo više od dva podtipa GABA<sub>A</sub> receptora, što će biti objašnjeno u daljem tekstu.

Potencijal benzodiazepina za izazivanje zavisnosti uočen je samo godinu dana nakon kliničkog uvođenja prvog leka iz ove grupe, kada je pokazano da primena visokih doza hlordiazepoksida u toku nekoliko meseci dovodi do razvoja fizičke zavisnosti koja se manifestuje sindromom obustave nakon prekida terapije. U periodu između 2. i 8. dana nakon prekida primene hlordiazepoksida kod 10 od 11 pacijenata razvili su se depresija, psihoza, agitacija, nesаница, gubitak apetita, a kod dvoje pacijenata i konvulzivni napadi

(Hollister i sar., 1961). Druga studija, sprovedena na pacijentima koji su болоvali od shizofrenije, pokazala je da obustava diazepama, nakon primene visokih doza, dovodi do sindroma obustave kod 6 od 13 pacijenata, pri čemu se epileptični napad razvio kod jednog pacijenta osmog dana nakon obustave (Hollister i sar., 1963). Publikovani nalazi su ukazali na to da benzodiazepini, kao i kratkododelujući barbiturati i meprobamat, dovode do sindroma obustave, kao glavne karakteristike fizičke zavisnosti, ali da je ovaj sindrom slabije izražen i da se javlja kasnije nakon obustave benzodiazepina u poređenju sa sindromom obustave nakon prekida primene barbiturata i meprobamata (Hollister i sar., 1961). Zabrinutost oko potencijalnih problema zbog zloupotrebe benzodiazepina je rasla tokom prve dve decenije od njihovog uvođenja u terapiju, tako da je sredinom 1970-tih godina započeta regulacija propisivanja diazepama i njemu sličnih lekova, a 1979. godine skrenuta je pažnja javnosti od strane američke vlade na rastući i veoma ozbiljan problem široke primene benzodiazepina, što je poznato pod nazivom „*Valium hearing*“ (Szara, 1980).

Nakon više od pola veka od uvođenja prvog benzodiazepina, ovi lekovi i dalje ostaju jedni od najpropisivanijih psihotropnih lekova u kliničkoj praksi. S obzirom na široku primenu van licenciranog indikacijskog područja (eng. *off-label*), potvrde od strane regulatornih tela za većinu stanja i poremećaja za koje se benzodiazepini koriste često izostaju. Ipak, prema trenutnim smernicama i preporukama, benzodiazepini se najčešće primenjuju u terapiji sledećih stanja: anksioznosti, afektivnih poremećaja, poremećaja spavanja, obustave alkohola, delirijuma, nasilnog i agresivnog ponašanja, poremećaja izazvanih primenom neuroleptika (Dell'oso i Lader, 2013). Međutim, zbog poznatog potencijala izazivanja tolerancije i zavisnosti, trajanje primene benzodiazepina je ograničeno na do četiri sedmice, što je ove lekove svrstalo u drugu liniju izbora u terapiji hroničnih poremećaja, kao što su anksioznost ili epilepsija (Lader, 2011; Baldwin i sar., 2013).

Efikasnost, brz nastup dejstva i relativna bezbednost benzodiazepina predstavljaju istraživački izazov za ispitivanje mogućnosti stvaranja novih liganada koji bi pokazali efikasnost komparabilnu sa benzodiazepinima, ali koji bi imali bolji profil dejstva nakon ponavljane primene, odnosno koji ne bi dovodili do tolerancije na željene, terapijske, efekte i ne bi izazivali zavisnost. Danas je jasno da jednu od prepreka na putu sinteze „idealnog

liganda benzodiazepinskog veznog mesta“ predstavljaju i nedovoljno poznati mehanizmi pomoću kojih klasični benzodiazepini dovode do razvoja tolerancije i fizičke zavisnosti. Stoga, veoma je važno razumeti kako tačan mehanizam akutnog dejstva ovih lekova (mehanizam alosterne modulacije GABA<sub>A</sub> receptora), tako i potencijalna mesta adaptivnih promena koje se razvijaju nakon dugotrajne primene benzodiazepina.

### **1.2 BENZODIAZEPINI: POZITIVNI ALOSTERNI MODULATORI GABA<sub>A</sub> RECEPTORA**

#### **1.2.1 GABA<sub>A</sub> receptori**

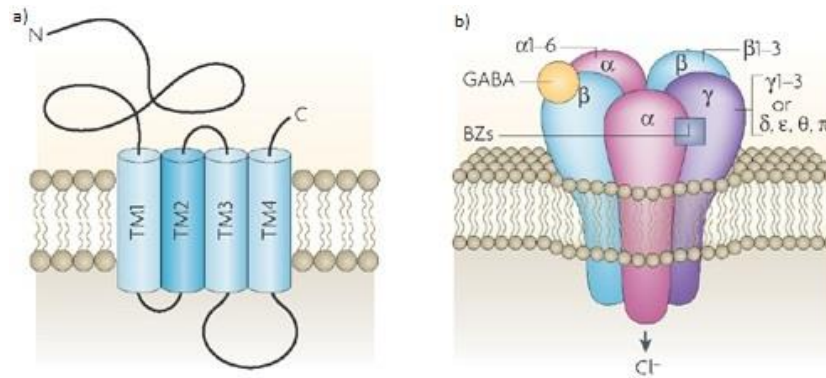
GABA<sub>A</sub> receptori pripadaju receptorima koji sadrže jonski kanal, koji se još nazivaju i ligand-zavisni jonski kanali. Ovi receptori podeljeni su u tri superfamilije, pri čemu GABA<sub>A</sub> receptori pripadaju grupi receptora sa Cys-petljom. Osim GABA<sub>A</sub> receptora, ovoj grupi pripadaju i nikotinski receptori za acetilholin, receptori za glicin, 5HT<sub>3</sub> serotonininski receptori i receptori koje aktivira Zn<sup>2+</sup> (Hogg i sar., 2005). Pored veznog mesta za neurotransmiter, koje se još naziva i ortosterno mesto, svi receptori koji sadrže jonski kanal formiraju i vodom ispunjenu poru za prolazak jona. U slučaju GABA<sub>A</sub> receptora, vezivanje GABA-e za ortosterno mesto izaziva konformacione promene proteina i dovodi do povećane propustljivosti za anjone, i to prevashodno za hloridne jone (Olsen i Sieghart, 2008). Smer prolaska hloridnih jona zavisi od koncentracionog i električnog gradijenta za hloridne jone, koji su diktirani prisustvom specifičnih transportera (Owens i Kriegstein, 2002). Uglavnom u mozgu odraslih, aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora vodi hiperpolarizaciji ćelijske membrane usled ulaska hloridnih jona u ćeliju, zbog visokih ekstracelularnih koncentracija ovog jona. S obzirom da su efekti koje GABA ostvaruje preko aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora brzi, smatra se da GABA<sub>A</sub> receptori imaju ključnu ulogu u prenosu brze inhibitorne neurotransmisije u mozgu.

Unutar superfamilije receptora sa Cys petljom pokazan je visok stepen homologije što je sugerisalo da, kao i nikotinski receptori, GABA<sub>A</sub> receptori jesu hetropentameri, sastavljeni

od 5 polipeptidnih lanaca, odnosno podjedinica (Olsen i Sieghart, 2008). Danas je pokazano prisustvo 19 različitih podjedinica GABA<sub>A</sub> receptora koje su svrstane u 8 klasa:  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\rho_{1-3}$ , a od kojih je svaka kodirana posebnim genom (Uusi-Oukari i Korpi, 2010.). Pomoću metoda *in situ* hibridizacije i imunohistohemije pokazano je da iRNK i polipeptidni lanci za podjedinice GABA<sub>A</sub> receptora pokazuju jedinstvenu vremenski i prostorno dobro kontrolisanu distribuciju (Pirker, 2000). Podjedinice  $\alpha_1$ ,  $\beta_{1-3}$  i  $\gamma_2$  eksprimirane su u većini regija mozga, pa receptori koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu čine preko 60% GABA<sub>A</sub> receptora (Pirker, 2000; Rudolph i Möhler, 2006). Nasuprot njima, podjedinice  $\alpha_{2-6}$ ,  $\gamma_1$  i  $\delta$  pokazuju visoku imunoreaktivnost u određenim regijama mozga. Tako je za  $\alpha_2$  podjedinicu pokazano da je eksprimirana u prednjem mozgu, talamusu, kičmenoj moždini i malom mozgu i da približno 15 do 20% GABA<sub>A</sub> receptora sadrži ovu podjedinicu. Za  $\alpha_6$  podjedinicu je pokazano da se nalazi isključivo na granuliranim ćelijama malog mozga i kohlearnom jedru, dok je  $\gamma_1$  podjedinica eksprimirana u centralnom i srednjem amigdalooidnom jedru, delovima *substantia nigra pars reticulata* i *inferior olivae*. Receptori koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu čine približno 7% od ukupnog broja GABA<sub>A</sub> receptora, ali je visoka ekspresija ove podjedinice pokazana u hipokampusu (približno 30% GABA<sub>A</sub> receptora), olfaktornom režnju i hipotalamusu. Ekspresija  $\alpha_4$  podjedinice pokazana je u talamusu, dentatnom girusu i bazalnim ganglijama, a  $\alpha_3$  podjedinica je pokazala još ograničeniju distribuciju u određenim slojevima olfaktornog bulbusa i unutrašnjim slojevima korteksa (Pirker, 2000; Sieghart i Sperk, 2002; Rudolph i Möhler, 2006). Tri  $\rho$  podjedinice čine familiju farmakološki različitih GABA<sub>A</sub> ergičkih Cl<sup>-</sup> kanala, eksprimiranih u retini, koji se nazivaju GABA<sub>C</sub> receptori (IUPHAR sugerše da se ovi receptori ne razdvajaju od ostalih GABA<sub>A</sub> receptora) (Barnard i sar., 1998).

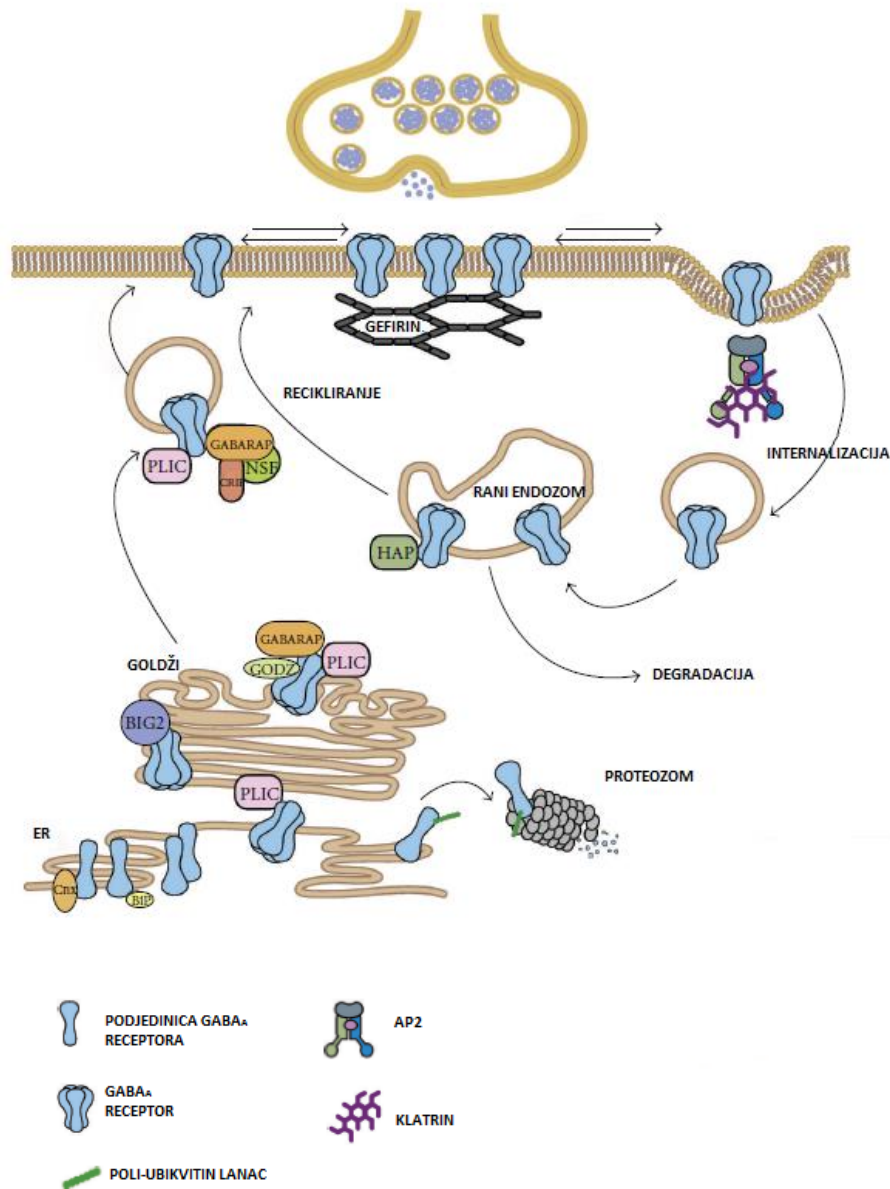
Topologija membrane sugerše da sve podjedinice poseduju građu karakterističnu za superfamiliju kojoj pripadaju. Kao što je prikazano na **Slici 1**, podjedinice se karakterišu sa izraženo dugačkim ekstracelularnim N-terminalnim krajem, četiri hidrofobna transmembranska regiona (označeni od TM1 do TM4) i velikom intracelularnom petljom između TM3 i TM4 (Sieghart i Sperk, 2002). Dugački N-terminalni kraj podjedinica učestvuje u građi veznog mesta za GABA-u i u građi nekih alosternih veznih mesta, npr.

benzodiazepinskog veznog mesta. Pretpostavlja se da ovaj deo podjedinice kontroliše proces oligomerizacije (Jacob i sar., 2008). Transmembranski region 2 oivičava vodom ispunjeni kanal, dok je intracelularni domen između TM3 i TM4 od značaja za stupanje u interakciju sa citoplazmatskim proteinima, i predstavlja ciljno mesto za posttranslacione modifikacije (fosforilaciju, palmitoilaciju, ubikvitinaciju) (**Slika 1**).



**Slika 1: Prikaz građe podjedinice GABA<sub>A</sub> receptora (a) i pentamerne strukture GABA<sub>A</sub> receptora (b) (Jacob i sarad., 2008).**

Proces formiranja receptora od polipeptidnih podjedinica dešava se u endoplazmatičnom retikulumu (ER), tako da samo „konformaciono zreli“ receptori napuštaju ER, dok preostali bivaju translocirani u proteozome i degradirani. Za više detalja u procesu stvaranja GABA<sub>A</sub> receptora, pogledati **Sliku 2**. Proces oligomerizacije podjedinica u heteropentamer dešava se u toku 5 min nakon procesa translacije, ali je neefikasan, jer samo 25% stvorenih podjedinica biva ugrađeno u heteromerne receptore (Jacob i sar., 2008). Broj teorijski mogućih kombinacija podjedinica je ogroman, ali su studije pokazale da samo ograničeni broj kombinacija napušta ER, ovi receptori bivaju transportovani u Goldžijev aparat, gde se segregiraju u vezikule za transport i ugrađuju u plazmatsku membranu. Pokazano je da se većina receptora ugradi u membranu ekstrasinaptički, a zatim tokom vremena difunduje kroz lipidni dvosloj i zavisno od podjedinica koje su prisutne, neki receptori bivaju nakupljani u sinapsama. Većina receptora eksprimiranih na ćelijskoj membrani sadrži 2α, 2β i 1γ (γ može biti zamenjena sa δ, ε, ili π) podjedinicu, dok homomerni receptori, αγ i βγ heteromeri bivaju razgrađeni (Sieghart i Sperk, 2002; Jacob i sar., 2008).



Slika 2: Proces formiranja i transport GABA<sub>A</sub> receptora pomoću različitih proteina (Vinkers i Olivier, 2012). AP2 – adaptor protein 2, BIG2 – brefeldin-A-inhibišući faktor izmene GDP/GTP 2 (eng. brefeldin-A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2) GABARAP – protein povezan sa GABA<sub>A</sub> receptorom (eng. GABA<sub>A</sub> receptor associated protein), PLIC – protein koji povezuje IAP sa citoskeletom (eng. proteins that link IAP to the cytoskeleton), NSF – N-etilmaleimid osetljivi faktor (eng. N-ethylmaleimide-sensitive factor), CRIP – cisteinom bogat intestinalni protein (eng. cysteine-rich intestinal protein), HAP – protein povezan sa Huntingtomom (eng. Huntington-associated protein), GODZ – goldži specifičan DHHC Zn<sup>2+</sup> prsti protein Cnx – kalneksin (eng. calnexin), BIP – protein koji vezuje imunoglobulin (eng. binding immunoglobulin protein)

Postsinaptičko mesto sadrži klastere od između 10 do nekoliko stotina GABA<sub>A</sub> receptora. Pored toga, GABA<sub>A</sub> receptori mogu biti smešteni perisinaptički (manje od 30 μm udaljeni od centra sinapse) ili ekstrasinaptički. Sinaptički GABA<sub>A</sub> receptori bivaju prolazno aktivirani visokim koncentracijama GABA-e (1,5 – 3 mM) koje se oslobode u sinaptičku pukotinu kada akcioni potencijal stigne do kraja presinaptičkog nervnog završetka (Tretter i Moss, 2008). Kompozicija postsinaptičkih GABA<sub>A</sub> receptora veoma zavisi od lokalizacije receptora i receptori koji sadrže  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$  podjedinicu su uglavnom smešteni u sinapsi. Ekstrasinaptički GABA<sub>A</sub> receptori izloženi su konstantnim niskim koncentracijama GABA-e, koja iscuri iz sinapsi ili koja potiče iz ne-neuronskih izvora. Niske koncentracije GABA-e aktiviraju receptore koji poseduju visoki afinitet, ali nisku efikasnost i učestvuju u toničkoj inhibiciji CNS-a. Ekstrasinaptički receptori uglavnom sadrže  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  ili  $\alpha_6$  podjedinice (Tretter i Moss, 2008).

### 1.2.2 Alosterna vezna mesta GABA<sub>A</sub> receptora

Pojam alosterizam ukazuje na mogućnost modulisanja aktivnosti receptora pomoću konformacionih promena izazvanih vezivanjem liganda za mesta topografski različita od ortosternog mesta, odnosno veznog mesta za endogeni ligand (Christopoulos, 2002). Ligandi koji se vezuju za alosterna vezna mesta nazivaju se alosterni modulatori, i oni mogu pojačati ili ublažiti odgovor izazvan agonistom, pa se ovakvi ligandi nazivaju pozitivni ili negativni alosterni modulatori (Hogg i sar., 2005). U pogledu na GABA<sub>A</sub> receptor, pokazano je prisustvo brojnih alosternih veznih mesta, kao što je vezno mesto za benzodiazepine, neurosteroidne, opšte anestetike uključujući barbiturate, etomidat, propofol, inhalacione anestetike, i etanol (Olsen i Sieghart, 2008). Utvrđeno je da se neka od ovih alosternih veznih mesta nalaze unutar transmembranskih domena pojedinačnih podjedinica, dok se druga vezna mesta, kao što je benzodiazepinsko, nalaze na međupovršini između dve podjedinice (Olsen i Sieghart, 2008).



### 1.2.3 Ligandi benzodiazepinskog mesta vezivanja

Lokalizacija benzodiazepinskog veznog mesta na međupovršini između  $\alpha$  i  $\gamma$  podjedinica ukazuje da je vezivanje liganada za benzodiazepinsko mesto na prvom mestu diktirano podtipom  $\alpha$  i  $\gamma$  podjedinice. Klasični benzodiazepini, kao što su diazepam i flunitrazepam, poseduju afinitet za GABA<sub>A</sub> receptore koji sadrže  $\alpha_1\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta\gamma_2$  ili  $\alpha_5\beta\gamma_2$ . Ovi ligandi ne poseduju afinitet za receptore koji sadrže  $\alpha_4$  ili  $\alpha_6$  podjedinicu, a njihova aktivnost na receptorima koji sadrže  $\gamma_1$  ili  $\gamma_3$  podjedinicu uz jednu od  $\alpha$  podjedinica je znatno smanjena (Olsen i Sieghart, 2008). GABA<sub>A</sub> receptori koji poseduju sposobnost da vežu benzodiazepine nazivaju se „diazepam-osetljivi“ receptori, dok se receptori koji sadrže  $\alpha_4$  ili  $\alpha_6$  podjedinicu nazivaju „diazepam-neosetljivi“ GABA<sub>A</sub> receptori. Glavnu razliku između „diazepam-osetljivih“ i „diazepam-neosetljivih“ receptora čini prisustvo aminokiseline histidina na poziciji 101 u građi  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  podjedinica, odnosno na poziciji 126 i 105 u građi  $\alpha_3$  i  $\alpha_5$  podjedinica, umesto koje se u strukturi  $\alpha_4$  i  $\alpha_6$  podjedinica nalazi aminokiselina arginin (Möhler i sar., 2001; Möhler, 2006). Dakle, mutacija samo jedne aminokiselinske rezidue na određenoj poziciji u strukturi  $\alpha$  podjedinice je dovoljna da GABA<sub>A</sub> receptori izgube afinitet za benzodiazepinske ligande (kao što su mutacije  $\alpha_1$ [H101R],  $\alpha_2$ [H101R],  $\alpha_3$ [H126R] i  $\alpha_5$ [H105R]) (Wieland i sar., 1992). S druge strane, prethodne studije su pokazale da struktura  $\gamma_2$  podjedinice utiče ne samo na afinitet liganada za benzodiazepinsko vezno mesto, već i na efikasnost kojom ligandi za ovo vezno mesto menjaju odgovor na GABA-u. Tako je u pogledu na efekte diazepamata pokazano da zamena aminokiselinske rezidue  $\gamma_2$  podjedinice na poziciji 77 iz fenilalanina u izoleucin ne menja u značajnoj meri afinitet diazepamata za GABA<sub>A</sub> receptore, ali dovodi do značajnog smanjenja maksimalnog influksa Cl<sup>-</sup> jona izazvanog GABA-om (Ogris i sar., 2004, Ramerstorfer i sar., 2010).

Klasični benzodiazepini, poput diazepamata, neselektivno se vezuju i aktiviraju „diazepam-osetljive“ GABA<sub>A</sub> receptore. Kao što se može videti u **Tabeli 1**, diazepam poseduje komparabilne nanomolarne afinitete (izražene kroz vrednosti K<sub>i</sub>) za različite podtipove GABA<sub>A</sub> receptora, koji iznose približno 10 nM (Huang i sar., 2002). Takođe je pokazano

da *in vitro* primena diazepama u koncentracijama značajno iznad vrednosti  $K_i$  (100 nM) dovodi do povećanja odgovora na GABA-u za  $246 \pm 16\%$ ,  $400 \pm 22\%$ ,  $461 \pm 34\%$ , i  $322 \pm 7\%$  u poređenju sa primenom same GABA-e na receptorima koji sadrže  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  i  $\alpha_5$  podjedinicu (Savić i sar., 2010). Ovakav odgovor diazepama smatra se punim pozitivnim alosternim efektom, pa se često efikasnosti drugih liganada upoređuju sa efikasnošću diazepama. Posmatrano sa aspekta efikasnosti, ligandi koji dovode do odgovora znatno nižeg od onog primećenog za diazepam nazivaju su parcijalnim pozitivnim alosternim modulatorima (npr. imidazenil). S druge strane, ligandi koji se selektivno vezuju i/ili selektivno aktiviraju određene podtipove GABA<sub>A</sub> receptora nazivaju se selektivnim ligandima benzodiazepinskog veznog mesta (npr. zolpidem; za afinitete odabranih liganada pogledati **Tabelu 1**) (Costa i Guidotti, 1996).

Sintetisani su i negativni alosterni modulatori GABA<sub>A</sub> receptora, koji takođe poseduju afinitet za benzodiazepinsko mesto vezivanja, kao što je DMCM. Međutim, ovi ligandi dovode do smanjenja afiniteta GABA<sub>A</sub> receptora za GABA-u i time smanjuju frekvenciju otvaranja Cl<sup>-</sup> kanala (Costa i Guidotti, 1996).

**Tabela 1: Afiniteti liganada za humane rekombinantne GABA<sub>A</sub> receptore koji sadrže pored imenovane  $\alpha$  podjedinice i  $\beta_3$  i  $\gamma_2$  podjedinicu. Afiniteti su prikazani kao vrednosti  $K_i$  izražene u nM (Huang i sar., 2000; Platt i sar., 2002; Li i sar., 2003; Savić i sar., 2010)**

ligand	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\alpha_5$
diazepam	14,0	7,8	13,9	13,4
zolpidem	29,6	160	380	>10000
flumazenil	0,8	0,9	1,1	0,6
$\beta$ CCt	0,72	15,0	18,9	111
XLi093	>1000	>1000	858	15

Treću klasu liganda za benzodiazepinsko vezno mesto čine supstance koje poseduju afinitet, ali ne i efikasnost za ovo vezno mesto, odnosno neutralni alosterni modulatori. Uprkos činjenici da neutralni modulatori ne poseduju efikasnost na GABA<sub>A</sub> receptorima, njihov značaj se prevashodno ogleda u sposobnosti da blokiraju *in vivo* i *in vitro* efekte pozitivnih i negativnih alosternih modulatora. Prvi uspešno sintetisan neutralni modulator

GABA<sub>A</sub> receptora je flumazenil (Ro 15-1788) (Hunkeler i sar., 1981); afiniteti flumazena za podtipove GABA<sub>A</sub> receptora prikazani su u **Tabeli 1**. Do danas flumazenil predstavlja jednu od glavnih farmakoloških eksperimentalnih alatki za ispitivanje selektivnosti liganada za benzodiazepinsko vezno mesto (Möhler, 2011). Dalji razvoj ovakvih supstanci doveo je do sinteze neutralnih alosternih modulatora koji poseduju selektivne afinitete za određene podtipove GABA<sub>A</sub> receptora, kakvi su  $\alpha_1$ -selektivni neutralni modulator  $\beta$ CCt ( $\beta$ -karbolin-3-karboksilat-t-butil estar) i  $\alpha_5$ -selektivni neutralni modulator XLi093 (4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboksilna kiselina, 8-etinil-5,6-dihidro-5-metil-6-okso-,1,3-propandiil estar); afiniteti ovih liganada za različite podtipove GABA<sub>A</sub> receptora nalaze se u **Tabeli 1** (Li i sar., 2003; Rowlett i sar., 2005).

### 1.3 POVEZIVANJE FARMAKOLOŠKIH EFEKATA BENZODIAZEPINA I AKTIVACIJE ODREĐENIH PODTIPOVA GABA<sub>A</sub> RECEPTORA

Imajući u vidu regionalno i celularno specifičnu distribuciju različitih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora i činjenicu da diazepam dovodi do čitavog spektra farmakoloških efekata (anksioliza, miorelaksacija, hipnoza, sedacija, antikonvulzivno dejstvo, amnestički efekat, oštećenje motorne koordinacije), razvijena je ideja da je za specifično farmakološko dejstvo diazepam odgovorna aktivacija određenog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora (Whiting, 2003). S obzirom da do danas molekularni supstrati ponašanja (biheviora) nisu definisani, studije na ćelijskom, biohemijskom ili molekularnom nivou ne mogu da pruže odgovor na pitanje koji su podtipovi receptora odgovorni za ispoljavanje bihevioralnih efekata benzodiazepina. U skladu sa ovom idejom, pristupilo se povezivanju uloge određenog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora i praćenog bihevioralnog odgovora na primenu benzodiazepina kod životinja. Uopšteno posmatrano izdvajaju se dva moguća pristupa bihevioralnim istraživanjima: i) genetički pristup, koji podrazumeva ispitivanja efekata primene liganada na genetski modifikovanim životinjama kod kojih se tehnologijama molekularne biologije jedna od  $\alpha$  podjedinica GABA<sub>A</sub> receptora čini neosetljivom na efekte benzodiazepina ( $\alpha_1$ [H101R],  $\alpha_2$ [H101R],  $\alpha_3$ [H126R],  $\alpha_5$ [H105R] miševi) i ii) farmakološki pristup (Smith i Rudolph,

2012). Sa teorijskog aspekta, farmakološki pristup se bazira na primeni selektivnih pozitivnih ili negativnih alosternih modulatora ili na istovremenoj primeni neselektivnih pozitivnih ili negativnih alosternih modulatora uz selektivni neutralni modulator, u cilju sprečavanja ispoljavanja efekata preko podjedinice GABA<sub>A</sub> receptora za koju neutralni modulator poseduje afinitet (za pregled selektivnih liganada pogledati radove Costa i Guidotti, 1996; Möhler, 2006).

Primenom pristupa genetske modifikacije prethodne studije su pokazale da sedacija, ataksija i delimično anterogradna amnezija izostaju kada se diazepam primeni miševima kod kojih je  $\alpha_1$  podjedinica učinjena neosetljivom ne efekte benzodiazepina (Rudolph i sar., 1999; McKernan i sar, 2000). U pogledu na kognitivni efekat benzodiazepina pokazano je da mutacija na receptorima koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu dovodi do poboljšanja kognitivnih funkcija, što je sugerisalo da, uz receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, i receptori koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu učestvuju u amnezijskom efektu ovih liganada (Crestani i sar., 2002). Slično je pokazano i za antikonvulzivno dejstvo diazepama. Naime, kod miševa koji nose tačkastu mutaciju na jednoj od sledećih podjedinica GABA<sub>A</sub> receptora:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , ili  $\alpha_5$  dolazi do delimičnog slabljenja antikonvulzivnog dejstva diazepama, a trostruka mutacija navedenih podjedinica (dakle sva tri podtipa receptora su "diazepam- neosetljivi" kod jedne jedinke) dovodi do potpunog gubitka antikonvulzivnog dejstva (Rudolph i sar., 1999; Fradley i sar., 2007). Anksiolitičko dejstvo diazepama je dominantno posredovano receptorima koji sadrže  $\alpha_2/\alpha_3$  podjedinicu (Löw i sar, 2000), dok je miorelaksantno dejstvo posredovano receptorima koji sadrže  $\alpha_2/\alpha_3/\alpha_5$  podjedinicu (Crestani i sar., 2002).

Farmakološke studije na životinjama su u velikoj meri potvrdile nalaze studija na genetski modifikovanim životinjama i dodatno proširile prethodna zapažanja. Tako je pokazano da primena liganada koji selektivno aktiviraju podtipove GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$  podjedinice (TPA023) ili  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ili  $\alpha_5$  podjedinice (L838-417) dovodi do anksiolitičkog dejstva (McKernan i sar., 2000; Atack i sar., 2006). S druge strane, selektivni negativni alosterni modulator za receptore koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu ( $\alpha_5$ IA) dovodi do poboljšanja memorije, bez izraženih anksiojenih i prokonvulzivnih efekata (Dawson i sar., 2006). U skladu sa studijama na genetski modifikovanim životinjama, pokazano je da primena

selektivnog neutralnog modulatora za receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu,  $\beta$ CCt-a, može sprečiti sedativni efekat, oštećenje motorne koordinacije i delimično amnezijski efekat diazepama (Savić i sar., 2009., Milić i sar., 2012). Dodatno je pokazano da primena ovog neutralnog modulatora čak može potencirati anksiolitičko dejstvo midazolama u testu uzdignutog plus lavirinta (UPL) (Savić i sar., 2004). Primenjen u visokoj dozi,  $\beta$ CCt dovodi i do ublažavanja mišićne relaksacije, moguće usled neselektivnog antagonizma na receptorima koji sadrže ne- $\alpha_1$  podjedinicu (Milić i sar., 2012). Antagonizam na receptorima koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu, postignut primenom  $\alpha_5$ -selektivnog neutralnog modulatora XLi093, dovodi do produbljivanja sedativnog efekta diazepama i delimično sprečava oštećujuće efekte diazepama na sticanje memorije u testu Morisovog vodenog lavirinta (Savić i sarad., 2009).

### **1.4 FENOMENI KOJI SE MOGU RAZVITI NAKON DUGOTRAJNE PRIMENE BENZODIAZEPINA**

#### **1.4.1 TOLERANCIJA**

##### **1.4.1.1 Razvoj tolerancije na bihevioralne efekte benzodiazepina nakon ponavljane primene**

Tolerancija na efekte leka se definiše kao proces redukcije odgovora organizma na lek nakon ponavljane primene, što dovodi do potrebe za povećanjem doze leka u cilju postizanja istog farmakološkog odgovora (Miller i Gold, 1990; Hutchinson i sar., 1996). Tolerancija može voditi ublažavanju neželjenih efekata, ali može dovesti i do gubitka efikasnosti leka (Löscher i Schmidt, 2006) Poznato je da ponavljana primena benzodiazepina dovodi do razvoja tolerancije na neke bihevioralne efekte brže nego na ostale. Istraživanja na životinjama i ljudima su pokazala da se tolerancija prvo razvija na sedativni efekat benzodiazepina (Bateson, 2002). U pogledu na istraživanja na životinjama, slabljenje sedativnog dejstva je zabeleženo već nakon 3 do 5 dana ponavljane primene (File, 1981., Hutchinson i sar., 1996), dok razvoj tolerancije na sedativno dejstvo kod ljudi zavisi od izbora benzodiazepina koji se koristi (pregled literature u Vinkers i Olivier, 2012). Dugotrajnu primenu benzodiazepina u terapiji epilepsije sprečava razvoj tolerancije na

antikonvulzivno dejstvo (Löscher i Schmidt, 2006). Istraživanja na životinjama su pokazala da se slabljenje antikonvulzivnog efekta razvija u toku tri nedelje ponavljane primene benzodiazepina (File, 1983). Međutim, nastanak tolerancije se može izbeći povremenom primenom benzodiazepina, pa se benzodiazepini i dalje koriste u terapiji *status epilepticus*-a kod ljudi (Brodie, 1990; Vinkers i Olivier, 2012). Razvoj tolerancije na anksiolitičko dejstvo kod životinja i ljudi i dalje je predmet rasprave. U pogledu na studije na životinjama, postoje dokazi koji potvrđuju razvoj tolerancije na praćeni anksiolitički efekat (Fernandes i sar., 1999), dok istovremeno postoje i nalazi izostanka razvoja tolerancije (Stock i sard., 2000), pa čak i potenciranja anksiolitičkog dejstva nakon ponavljane primene (Khan i Haleem, 2008). Međutim, kao zajednički zaključak studija na životinjama i ljudima može se izneti da ukoliko se tolerancija na anksiolitičko dejstvo i razvija, u svakom slučaju razvija se sporije nego na sedativni efekat (pregled literature Bateson, 2002). Važno je skrenuti pažnju da dugotrajnu primenu benzodiazepina kod ljudi može ometati i izostanak razvoja tolerancije na neželjene efekte, kao što je slučaj sa kognitivnim oštećenjem izazvanim benzodiazepinima. Studije na pacijentima i zdravim dobrovoljcima su pokazale da se potpuna tolerancija na otežano sticanje memorije i ostale kognitivne efekte ne razvija čak ni nakon nekoliko godina ponavljane primene benzodiazepina (Griffiths i Weerts, 1997; Lader, 2011). S druge strane, u istraživanju na pacovima McNamara i Skelton (1997) pokazali su da se tolerancija na amnezijско dejstvo diazepama može razviti nakon 30 dana ponavljane primene diazepama.

Istraživanja u prethodnim decenijama doprinela su boljem razumevanju tolerancije, ali tačni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ovog fenomena i dalje nisu poznati. Danas se smatra da je tolerancija na efekte benzodiazepina prevashodno farmakodinamske, a ne farmakokinetičke prirode (Smith i Darlington, 1994). Međutim, prilikom istraživanja razvoja tolerancije, naročito na životinjama, potrebno je razmotriti i ulogu ostalih formi tolerancije, kao što su naučena tolerancija i ukrštena tolerancija. Poseban tip naučene tolerancije se opisuje terminom bihevioralna tolerancija, koji ukazuje na veštine koje se razvijaju usled ponavljane primene agensa i izlaganja određenoj situaciji, pri čemu subjekt nauči da se prilagođeno ponaša uprkos stanju blage do umerene intoksikacije (Löscher i

Schmidt, 2006). Jedan od primera naučene tolerancije kod životinja je fenomen tolerancije prilikom ponovnog sprovođenja testa UPL (eng. *one-trial tolerance*), kada se prilikom ponovnog izlaganja aparaturi UPL pod dejstvom benzodiazepina gubi anksiolitički efekat zabeležen prilikom prethodnog izlaganja (File i sar., 1990; Schneider i sar., 2011). Konačno, sa kliničkog aspekta primene benzodiazepina važno je napomenuti ulogu ukrštene tolerancije. Pojam ukrštene tolerancije ukazuje na činjenicu da ponavljana primena jednog benzodiazepina dovodi do razvoja tolerancije i na ostale lekove iz ove grupe (Löscher i Schmidt, 2006). Ukrštena tolerancija između benzodiazepina je zabeležena kod ljudi (Aranko i sar., 1983) i životinja (Rosenberg, 1995; Auta i sar., 2008).

Prilikom ispitivanja mehanizama tolerancije navedene studije su uglavnom pokušale da odgovore na dva ključna pitanja: i) otkrivanje adaptivnih promena koje se nalaze u osnovi razvoja tolerancije i ii) uloge različitih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju ovog fenomena. Trenutni dokazi usmereni ka neuroadaptivnim promenama unutar CNS-a ukazuju na smanjenu osetljivost GABA<sub>A</sub> receptora na efekte benzodiazepina posle ponavljane primene. S druge strane, istraživanja koja bi pružila odgovor na pitanje o ulozi različitih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju fenomena tolerancije doprinela bi rasvetljavanju ideje o sintezi sugerisanog „idealnog liganda benzodiazepinskog veznog mesta“.

### **1.4.1.2 Pretpostavljeni neuroadaptivni mehanizmi koji se nalaze u osnovi tolerancije na efekte benzodiazepina**

Jedan od pretpostavljenih mehanizama koji se nalazi u osnovi tolerancije na efekte benzodiazepina je izostanak povezivanja (engl. *coupling*) između veznog mesta GABA-e i benzodiazepina unutar GABA<sub>A</sub> receptora. Nepovezivanje unutar GABA<sub>A</sub> receptora se definiše kao smanjena sposobnost benzodiazepina da potenciraju postsinaptičke efekte GABA-e, udruženo sa smanjenom sposobnošću GABA-e da potencira vezivanje benzodiazepina (Bateson, 2002). Još 1984. godine Gallagher i saradnici su elektrofiziološkim eksperimentima pokazali da nepovezivanje efekata GABA-e i

benzodiazepina nije povezano sa značajnim promenama u afinitetu za GABA-u ili benzodiazepine, ali tačan mehanizam koji se nalazi u osnovi ovog smanjenog povezivanja i dalje nije poznat. Inicijalni dokazi su upućivali da se u osnovi ovog fenomena nalazi povećana internalizacija GABA<sub>A</sub> receptora usled ponavljane primene benzodiazepina (Tehrani i Barnes, 1991; Ali i Olsen, 2001). Pretpostavke o smanjenoj osetljivosti usled povećane internalizacije i endocitoze receptora potkrepljene su kasnijim dokazima o prisustvu GABA<sub>A</sub> receptora unutar klatrinom-obloženih vezikula, odgovornih za ukljanjanje proteina sa površine ćelijske membrane (Tehrani i Barnes 1993; Lüscher i Keller, 2004). Dokazi o povećanoj internalizaciji GABA<sub>A</sub> receptora u skladu su sa nalazima o relativnim promenama u nivou određenih podjedinica, koji ukazuju na trend snižavanja nivoa podjedinica koje učestvuju u građi „diazepam-osetljivih“ receptora i porasta nivoa onih podjedinica koje učestvuju u građi „diazepam-neosetljivih“ receptora (Uusi-Oukari i Korpi, 2010). Osim praćenja nivoa samih proteina, u određenom broju studija sreće se praćenje nivoa iRNK za određene podjedinice. Nalazi u promeni nivoa iRNK direktnije ukazuju na promene koje se dešavaju na nivou genske ekspresije, a u široj slici ukazuju na korake koji se verovatno dešavaju nakon početne internalizacije receptora (Uusi-Oukari i Korpi, 2010). Ovi nalazi su veoma važni, jer procesi internalizacije teku veoma brzo i verovatno nisu jedini odgovorni molekularni supstrat tolerancije. Receptori koji se nalaze unutar endozoma mogu biti „reciklirani“ i veoma brzo ponovo ugrađeni u ćelijsku membranu ili degradirani u ER. Jedna novija studija (Jacob i sar. 2012) ukazuje na povećanu degradaciju  $\alpha 2$  podjedinice GABA<sub>A</sub> receptora kao uzrok smanjene ekspresije ove podjedinice na ćelijskoj membrani i smanjenog postsinaptičkog odgovora GABA-e, nakon 24 h primene flurazepama; za više detalja o procesima sinteze, transporta i degradacije GABA<sub>A</sub> receptora pogledati **Sliku 2**.

Prethodno opisane promene ukazuju na postsinaptičke neuroadaptivne promene nakon primene benzodiazepina. Međutim, treba imati u vidu da GABA može retrogradno da izazove promene i u presinaptičkom neuronu. Tako je pokazano da 14 dana ponavljane primene diazepamata dovodi do povećane ekspresije iRNK za GAD67, a da se nivo ovog



enzima vraća na kontrolni nivo u vremenskom periodu koji je potreban za gubitak tolerancije na praćeni efekat nakon prekida primene diazepama (Izzo i sar., 2000).

### **1.4.1.3 Povezivanje aktivacije određenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora i fenomena tolerancije**

Kao što je prethodno pomenuto, rezultati studija na molekularnom nivou mogu da pruže podatke o promenama u ekspresiji određenih podjedinica nakon ponavljane primene benzodiazepina, ali još uvek nisu pružili odgovore na pitanje uloge aktivacije različitih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u fenomenu tolerancije na praćeni bihevioralni efekat. Sa farmakološkog aspekta, veoma je važno pitanje koji podtipovi GABA<sub>A</sub> receptora učestvuju u razvoju tolerancije na praćeni efekat i da li je za nastanak tolerancije na praćeni efekat potrebna aktivacija istih ili različitih podtipova receptora u odnosu na akutni efekat (Vinkers i Olivier, 2012). Jedna studija sprovedena na genetski modifikovanim životinjama imala je za cilj da ispita ulogu različitih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u nastanku tolerancije na sedativno dejstvo diazepama (van Rijnsoever i sar., 2004). Ova studija je pokazala da aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_2$  ili  $\alpha_3$  podjedinicu nije neophodna za razvoj tolerancije na sedativno dejstvo. S druge strane, izostanak aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu tokom ponavljane primena diazepama  $\alpha_5$ [H105R] miševima sprečava nastanak tolerancije na sedativni efekat. Zaključak ove studije je da je istovremena aktivacija receptora koji sadrže  $\alpha_1$  i  $\alpha_5$  podjedinicu neophodna za razvoj tolerancije na sedativno dejstvo diazepama. Nalaz o neophodnosti aktivacije receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu za razvoj tolerancije na sedativno dejstvo može se naći i u studiji Elliot i White, 2000. Ova studija je pokazala da se tolerancija na sedativno dejstvo ne razvija nakon ponavljane primene zolpidema, liganda čiji je afinitet za receptore koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu oko 1000 puta manji od afiniteta za receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu (Sanna, 2002), dok primena istog režima dovodi do razvoja tolerancije na sedativno dejstvo lorazepama. Međutim, Vlainić i Peričić (2009) su pokazale da primena zolpidema, kao i

primena diazepama, dovodi do razvoja tolerancije na sedativno i antikonvulzivno dejstvo i time, suprotno prethodnim dokazima, sugerisale da aktivacija receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu nije neophodna za razvoj tolerancije na praćene efekte. Ponavljana primena zolpidema i lorazepama dovela je do razvoja tolerancije na hipotermijsko dejstvo nakon 4 dana i miorelaksantno dejstvo nakon 7 dana ponavljane primene (Elliot i White, 2000).

U pogledu na antikonvulzivno dejstvo, uloga podtipova GABA<sub>A</sub> receptora ispitana je nakon ponavljane primene neselektivnog liganda benzodiazepinskog mesta (diazepam), dominantno  $\alpha_5$ -selektivnog liganda koji aktivira i GABA<sub>A</sub> receptore koji sadrže  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$  podjedinice (imidazenil) i prevashodno  $\alpha_1$ -selektivnog liganda (zolpidem) (Auta i sar., 2008). Ova farmakološka studija je pokazala da ponavljana primena diazepama i zolpidema dovodi do razvoja tolerancije na antikonvulzivno dejstvo i ukrštene tolerancije između ova dva liganda, udruženo sa smanjenom ekspresijom iRNK za  $\alpha_1$  podjedinicu u prefrontalnom korteksu. Dodatno, izostanak aktivacije receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu pri primeni imidazena bio je dovoljan za izostanak razvoja tolerancije na antikonvulzivno dejstvo imidazena. Takođe, ponavljana primena imidazena nije dovela do snižene ekspresije iRNK za  $\alpha_1$  podjedinicu u prefrontalnom korteksu, niti je dovela do razvoja ukrštene tolerancije sa diazepamom ili zolpidemom. Griebel i sar. (2003) su pokazali da ponavljana primena liganda smanjene efikasnosti na receptorima koji sadrže  $\alpha_1$  i  $\alpha_5$  podjedinicu, uz pun agonistički efekat na receptorima koji sadrže  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$  podjedinice, kao što SL651498, takođe ne vodi nastanku tolerancije na antikonvulzivno dejstvo, niti uzrokuje razvoj tolerancije na anksiolitički efekat.

### 1.4.2 ZAVISNOST

#### 1.4.2.1 Razvoj fizičke zavisnosti nakon ponavljane primene benzodiazepina

Još od 1961. kada je Hollister publikovao nalaz sa hlordiazepoksidom, poznato je da benzodiazepini dovode do zavisnosti. Međutim, definicija zavisnosti se značajno promenila sredinom osamdesetih i početkom devedesetih godina XX veka. Prema Vodiču za postavljanje dijagnoza mentalnih poremećaja Američkog društva psihijatarata - DSM III

(*Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*) iz 1980. godine dijagnoza zavisnosti je zahtevala ispoljavanje tolerancije ili sindroma obustave. Međutim sa revizijom DSM III kriterijuma, 1987. godine, uvedeno je da su tolerancija i sindrom obustave samo dva od devet kriterijuma za postavljanje dijagnoze zavisnosti, pri čemu je potrebno ispoljavanje 3 kriterijuma u toku mesec dana, ponavljano u dužem vremenskom periodu za postavljanje dijagnoze. Trend neobaveznosti ispoljavanja tolerancije i sindroma obustave za postavljanje dijagnoza zavisnosti i zloupotrebe se zadržao do 2013. godine i aktuelne verzije DSM 5 (Nielsen i sar., 2012). Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije (MKB-10) zavisnost se definiše kao skup fizioloških, kognitivnih i bihevioralnih fenomena koji vode izraženoj potrebi za uzimanjem supstance, teškoćama u kontrolisanju primene, prisustvu fiziološkog sindroma obustave prilikom prekida primene ili smanjenja doze, toleranciji na efekte leka, izostanku drugih interesovanja i zadovoljstva i ponavljanju primene leka uprkos štetnosti (Lader, 2011).

Zavisnost na benzodiazepine je prevashodno bazirana na fizičkim kriterijumima koje je postavio DSM III – razvoju tolerancije i obustave (Nielsen i sar., 2012). Zapravo, ponavljana primena benzodiazepina dovodi do fizičke ili fiziološke zavisnosti, sa sindromom obustave kao osnovnom manifestacijom koja se javlja prilikom pokušaja smanjenja doze ili prekida primene benzodiazepina (Ashton, 2005; Dell’osso i Lader, 2013). Simptomi obustave se javljaju kod približno 15–30% pacijenata prilikom pokušaja smanjenja doze benzodiazepina ili prekida primene nakon 4 do 6 sedmica ponavljane primene. Nije dovoljno poznato zašto se sindrom obustave javlja kod nekih pacijenata dok kod drugih izostaje (Lader, 2011). Sindrom obustave može biti od blagog i kratkotrajnog do veoma ozbiljnog i ponekad dužeg trajanja. Simptomi koji se javljaju prilikom obustave su uglavnom uobičajeni za anksiozna stanja (anksioznost, agorafobija, panični napadi, nesаница, depresija, problemi sa pamćenjem i koncentracijom, disforija, palpitacije i bolovi u mišićima) ili specifični za obustavu benzodiazepina (preosetljivost na svetlost) (Ashton, 2005). Ponekad se mogu javiti i životno-ugrožavajući problemi kao što su epileptični napadi, koji mogu voditi i *status epilepticus*-u, *delirium tremens*, sumanutosti sa suicidalnim idejama (Dell’osso i Lader, 2013).

Razvoj fizičke zavisnosti na supstance slične benzodiazepinima u laboratoriji se najčešće prati kroz ispoljavanje znaka obustave nakon prestanka primene leka oglednim životinjama („spontana obustava“) ili nakon precipitacije sindroma obustave primenom antagoniste, kao što su flumazenil ili CGS 8216 („precipitirana obustava“) (Ator i Griffiths, 2003; Licata i Rowlett, 2008). Prilikom sprovođenja ovih studija veoma je važno uzeti u obzir farmakokinetičke osobine leka, kako zbog izbora odgovarajućeg režima primene tako i zbog vremenskog perioda u kome se očekuje ispoljavanje simptoma i znaka obustave. Spontano ispoljavanje sindroma obustave najčešće se javlja u vremenskom periodu oko 24 h nakon poslednje primene tretmana, ali ono je pre svega diktirano vremenom polueliminacije leka, prisustvom aktivnih metabolita i dozom koja se koristi (Ator i Griffiths, 2003). Takođe, dužina ponavljane primene tretmana može uticati na ozbiljnost sindroma obustave. Iako je studija na dobrovoljcima pokazala da se precipitirani sindrom obustave javlja nakon 7 dana primene diazepama i da se po stepenu ozbiljnosti ne razlikuje u odnosu na tretman od 14 ili 28 dana (Mintzer i Griffiths, 2005), istraživanja na životinjama pokazuju da se stepen ozbiljnosti sindroma obustave povećava sa dužinom trajanja ponavljane primene tretmana (Lukas i Griffiths, 1984). Dodatno, bihevioralna procena potencijala izazivanja fizičke zavisnosti trebalo bi da uključi praćenje više znaka ili simptoma, u cilju sveobuhvatnije analize promena koja se mogu javiti nakon prestanka primene leka (Ator i Griffiths, 2003). Ispoljavanje negativnog emocionalnog stanja praćeno kroz nivo anksioznosti predstavlja najčešće korišćeni pristup ispitivanju sindroma obustave kod oglednih životinja (Koob i Volkow, 2010). Međutim, osim promena u nivou anksioznosti, pri ispitivanju potencijala fizičke zavisnosti benzodiazepina veoma često se prati i povećana osetljivost ka konvulzivnim napadima nakon prekida primene ponavljane terapije (Mirza i Nielsen, 2006).

### **1.4.2.2 Pretpostavljeni neuroadaptivni mehanizmi koji dovode do razvoja fizičke zavisnosti na benzodiazepine**

Ponavljana primena benzodiazepina dovodi do neuroadaptivnih promena unutar CNS-a, što rezultuje razvojem tolerancije na neke bihejvioralne efekte ovih lekova i fizičke zavisnosti koja se manifestuje prilikom prekida primene terapije. Prethodno je objašnjeno da adaptivni mehanizmi odgovorni za razvoj tolerancije najverovatnije uključuju nedovoljno poznatim mehanizmima smanjenu osetljivost GABA–ergičke neurotransmisije. Međutim, sa aspekta fizičke zavisnosti, čini se da promene na nivou GABA-ergičke transmisije nisu dovoljne da dovedu do razvoja i ispoljavanja ovog fenomena. Stephens je 1995. predložio hipotezu da usled ojačane inhibicije, posredovane ponavljanom primenom benzodiazepina, u mozgu dolazi do kompenzatorne senzitivizacije ekscitatorne neurotransmisije, najverovatnije glutamatergičke, koja vodi ponovnom uspostavljanju ravnoteže u CNS-u. Posledično, prestanak primene benzodiazepina vodi preteranoj ekscitaciji CNS-a posredovanom glutamatom, zbog iznenadnog smanjenja inhibitorne neurotransmisije. Glutamat se činio ključnim kandidatom za promene u ekscitatornoj neurotransmisiji iz dva razloga: i) postoji bliska veza glutamatergičke i GABA-ergičke neurotransmisije i ii) neosporna je ključna uloga glutamatergičke neurotransmisije u sinaptičkoj plastičnosti, odnosno neuroadaptivnim procesima u CNS-u (Allison i Pratt, 2003).

Savremeni dokazi o učešću adaptacije glutamatergičke neurotransmisije upućuju na povećanu ekscitaciju posredovanu AMPA receptorima, koja je vremenski i prostorno ograničena. Veći broj istraživanja rađen je na izolovanim neuronima hipokampusa i ona su pokazala da obustava primene benzodiazepina dovodi do povećanog vezivanja radioobeleženog liganda AMPA receptora, što je praćeno povećanom neuralnom transmisijom, a pretpostavljeni uzrok ovakvih nalaza je povećana sinaptička ekspresija AMPA receptora (Das i sar., 2008). Nalaz povećane ekspresije podjedinica AMPA receptora (GluR1) u hipokampusu i korteksu dovodi se u vezu sa povećanim nivoom anksioznosti koji se beleži kod istih životinja (Izzo i sar., 2001). Potvrda o ulozi promena na nivou AMPA receptora u povećanju nivoa anksioznosti dobijena je i primenom

antagoniste AMPA receptora GYKI 52466 nakon obustave benzodiazepina, što je dovelo do izostanka promena na nivou AMPA receptora i izostanka ispoljavanja povećanog nivoa anksioznosti (Van Sickle i sar., 2004). Uz značajno učešće AMPA receptora u razvoju povećanog nivoa anksioznosti, pokazana je uloga NMDA receptora u otklanjanju ovog simptoma, odnosno u vremenskom ograničavanju ispoljavanja fizičke zavisnosti. Zapravo, pokazano je da dva dana nakon obustave primene benzodiazepina dolazi do nishodne regulacije NMDA receptora (NR2B podjedinice), udruženo sa smanjenjem NMDA-posredovane neuralne transmisije (Van Sickle i sar., 2002), kao i da se ova nishodna regulacija može sprečiti primenom nekompetitivnog antagoniste NMDA receptora dan ranije, što produžava trajanje povećanog nivoa anksioznosti (Van Sickle i sar., 2004).

### **1.4.2.3 Povezivanje aktivacije određenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora i fenomena fizičke zavisnosti**

Do danas još uvek nije u potpunosti utvrđena uloga aktivacije određenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju neuroadaptivnih promena odgovornih za ispoljavanje fenomena fizičke zavisnosti. Farmakološki pristup primene liganada selektivnih za određene podtipove GABA<sub>A</sub> receptora pruža mogućnost daljeg rasvetljavanja mehanizama razvoja ovog fenomena. Značajan doprinos na ovom putu dali su Mirza i Nielsen (2006), koji su primenom neselektivnih liganada, selektivnih liganada za određene podtipove GABA<sub>A</sub> receptora (L-838,417, SL651498 i zolpidem), kao i primenom liganada sa parcijalnom pozitivnom aktivnošću (NS2664, bretazenil i NS2710) pokušali da ispituju razvoj fizičke zavisnosti, praćeno kroz povećanu osetljivost ka konvulzivnim napadima izazvanim parcijalnim inverznim agonistom FG7142. Rezultati navedene studije sugerišu da je za razvoj fizičke zavisnosti neophodna aktivacija svih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora. Dodatno, Ator i saradnici (2010) pokazali su da za izostanak razvoja fizičke zavisnosti nije dovoljan samo gubitak aktivnosti na receptorima koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, već da je istovremeno neophodna i smanjena aktivnost na drugim podtipovima receptora.

### 1.4.3 ADIKCIJA

#### 1.4.3.1 Razvoj adikcije na benzodiazepine

Iako definicije Svetske zdravstvene organizacije i Američkog društva psihijatara ne prave razliku između fizičke zavisnosti i psihičke zavisnosti ili adikcije, u naučnim studijama se termin fizičke zavisnosti koristi za definisanje adaptivnog stanje koje se manifestuje intenzivnim fizičkim simptomima nakon prekida primene leka, dok se pojam adikcije koristi da se ukaže na bihejvioralnu konotaciju i odnosi se na stanje zadovoljstva izazvano primenom sredstva i težnju za ponovnom ili kontinuiranom primenom uprkos neželjenim posledicama (Koob i Bloom, 1998; Cami i Ferré, 2003). Dok se zavisnost na benzodiazepine prevashodno bazira na ispoljavanju fizičke zavisnosti i tolerancije nakon ponavljane primene, ovi lekovi poseduju i karakteristike zajedničke za sredstva koja dovode do adikcije. Osobina leka, odnosno sredstva, koja u najvećoj meri ukazuje na znatan potencijal izazivanja adikcije je potkrepljujući efekat leka. Za lek se može reći da ispoljava potkrepljujući efekat ukoliko njegovo prisustvo povećava verovatnoću – potkrepljuje – odgovor/ponašanje koje obezbeđuje ponovno dobijanje leka (Griffiths and Weerts, 1997). Prethodne studije na ljudima su pokazale da benzodiazepini poseduju značajan potkrepljujući efekat. Međutim, za razliku od drugih sredstava koja izazivaju adikciju, potkrepljujući efekat benzodiazepina se javlja primarno kod pacijenata sa istorijom zloupotrebe alkohola, drugih sedativa, poremećajima spavanja i anksioznih pacijenata, i značajno je slabiji u poređenju sa potkrepljujućim efektom drugih sredstava zloupotrebe, npr. kokaina (Griffiths and Weerts, 1997).

### **1.4.3.2 Pretpostavljeni neuroadaptivni mehanizmi koji dovode do razvoja adikcije na benzodiazepine**

Poznato je da je zajednička karakteristika sredstava koja dovode do adikcije da deluju na mezokortikalni i mezolimbčki dopaminergički sistem, koji potiče iz zone ventralnog tegmentuma i projektuje dopaminergičke neurone ka prefrontalnom korteksu, *nucleus accumbens*-u, kao i limbickim strukturama, na prvom mestu amigdaloidnom kompleksu (Cami i Ferré, 2003; Koob i Volkow, 2010). Različitim mehanizmima delovanja, sredstva koja izazivaju adikciju povećavaju nivo dopamina u navedenim strukturama i indukuju sinaptičku plastičnost na glutamatergičkim sinapsama, kao posebnu formu dugotrajne potencijacije (Lüscher i Malenka, 2011). Benzodiazepini dovode do dezinhibicije dopaminergičkih neurona u zoni ventralnog tegmentuma zahvaljujući specifičnoj ekspresiji  $\alpha_1$  podtipa GABA<sub>A</sub> receptora na GABA-ergičkim interneuronima. Pokazano je da izazivanjem izražene hiperpolarizacije GABA-ergičkih interneurona, benzodiazepini sprečavaju inhibiciju dopaminergičkih neurona i na taj način povećavaju nivo dopamina u *nucleus accumbens*-u (Tan i sar., 2010). Dodatno je pokazano da je aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu odgovorna za indukciju adaptivnih promena na nivou glutamatergičkih sinapsi na dopaminergičkim neuronima u zoni ventralnog tegmentuma, nakon primene jedne doze diazepama ili  $\alpha_1$ -selektivnog liganda, zolpidema (Heikkinen i sar., 2009).

### **1.4.3.3 Povezivanje aktivacije određenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora i fenomena adikcije**

U cilju procene potkrepljujućeg efekta leka u istraživanjima na životinjama najčešće se koristi test samo-primene. Istraživanja na majmunima su pokazala da neselektivni benzodiazepini, kao i  $\alpha_1$ -selektivni ligandi (zolpidem i zaleplon) deluju kao potkrepljujući agensi u studijama samo-primene. Potkrepljujući efekat je pokazan i za ligande manje efikasnosti u poređenju sa klasičnim benzodiazepinima, kao što su TPA123 i L-838,417



(Licata i Rowlett 2008; Ator i sar., 2010). S druge strane, primena parcijalnog agoniste na receptorima koji sadrže  $\alpha_2$  ili  $\alpha_3$  podjedinicu, TPA023, nije dovela do ispoljavanja potkrepljujućeg efekta. Posmatrani zajedno, ovi podaci pokazuju da puna aktivacija na GABA<sub>A</sub> receptorima koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu može biti dovoljna za ispoljavanje potkrepljujućeg efekta u testu samo-primene kod majmuna, ali i da aktivacija ovog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora nije neophodna. Prema dosadašnjim podacima, čini se da je za ispoljavanje potkrepljujućeg efekta leka dovoljna aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_2$  (veća od ~ 10%) i/ili umerena aktivacija receptora koji sadrže  $\alpha_3$  podjedinicu (najmanje 40% efikasnosti) (Licata i Rowlett, 2008).

Tan i saradnici (2010) sprovedi su studiju na genetski modifikovanim miševima u kojoj su pokazali da je za ispoljavanje adiktivnog potencijala benzodiazepina neophodna aktivacija receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, dok aktivacija receptora koji sadrže  $\alpha_3$  podjedinicu nije neophodna kako bi miševi razvili preferenciju prema midazolamu u testu samostalne primene, koji se koristi za procenu adiktivnog potencijala liganada. Autori su sugerisali da aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu može predstavljati prvi korak u generisanju adaptivnih promena odgovornih za razvoj adikcije, istovremeno ističući da pitanje tačnog mehanizma koji dovodi do fenomena adikcije i dalje ostaje nerešeno (Tan i sar., 2011).

### 1.5 PERSPEKTIVA DALJIH ISTRAŽIVANJA

Nerazjašnjeni mehanizmi razvoja tolerancije i zavisnosti, kao i povremeno protivrečni nalazi u dostupnoj literaturi, ukazuju na potrebu za daljim ispitavanjem navedenih fenomena koji se mogu javiti nakon ponavljane primene benzodiazepina. Uočava se da do danas nije dovoljno urađeno na direktnom povezivanju primećenih neuroadaptivnih promena sa bihevioralnim nalazima. Dodatno, u cilju daljeg razvoja liganada za benzodiazepinsko vezno mesto veoma je važno razmatrati njihov farmakološki profil u uslovima ponavljane primene. Stoga, sa stanovišta terapijske primene potencijalnih

„idealnih liganada benzodiazepinskog veznog mesta“, na prvom mestu treba odgovoriti na pitanje uloge aktivacije podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju farmakoloških efekata tolerancije i fizičke zavisnosti.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovih istraživanja biće ispitivanje uticaja režima primene diazepama na razvoj fenomena tolerancije i fizičke zavisnosti, praćenih kroz ispoljavanje promena u bihevioralnim efektima diazepama kod pacova Wistar soja. Dodatno, primenom farmakološkog pristupa selektivne blokade podtipova GABA<sub>A</sub> receptora, ispitaće se uloga GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$ - i  $\alpha_5$ - podjedinicu u nastanku navednih fenomena. Definisani ciljevi biće postignuti kroz naredne faze:

**2.1** Prva faza istraživanja biće sprovedena sa ciljem ispitivanja razvoja tolerancije nakon ponavljane primene diazepama. U toku ove faze istraživanja naredni koraci će biti sprovedeni:

**2.1.1.** U prvoj fazi istraživanja ispitaće se uticaj ponavljane primene različitih doza diazepama na ispoljavanje sedativnog, anksiolitičkog i miorelaksantnog dejstva ovog benzodiazepina. Praćeni efekti nakon ponavljane primene biće upoređeni sa efektima nakon akutne primene, u cilju ispitivanja potencijala za razvoj tolerancije. Jedan od ciljeva ove faze istraživanja biće i procena uticaja svakodnevnog rukovanja i primene tretmana na ponašanje životinja.

**2.1.2** U narednom koraku, uz neophodna prilagođavanja prvobitnog protokola, ispitaće se uticaj različitih doza diazepama, dužine primene i učestalosti primene na razvoj tolerancije. Rezultati ove faze istraživanja biće uzeti u obzir prilikom odabira protokola za dalje istraživanje.

**2.1.3** U daljim istraživanjima, ponavljanom primenom  $\alpha_1$  selektivnog- i  $\alpha_5$  selektivnog-neutralnog modulatora uz diazepam, ispitaće se uloga navedenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora na razvoj tolerancije na praćeni efekat diazepama. Bihevioralni efekti biće praćeni i upoređivani sa efektima posle akutne i ponavljane primene diazepama. U okviru ove faze ispitivanja, odrediće se koncentracije diazepama i neutralnih modulatora u krvi i mozgu nakon praćenja određenog bihevioralnog efekta.

**2.2** Cilj druge faze istraživanja biće da se ispita razvoj fizičke zavisnosti nakon obustave ponavljane primene diazepama. U toku ove faze istraživanja naredni koraci biće sprovedeni:

**2.2.1** U drugoj fazi istraživanja ispitaće se uticaj režima ponavljane primene diazepama na razvoj i ispoljavanje fizičke zavisnosti, procenjeno kroz praćenje nivoa anksioznosti i/ili sniženje praga konvulzivne aktivnosti nakon naglog prekida primene diazepama. Praćeni efekti biće poređeni sa efektima kontrolne grupe u cilju procene potencijala razvoja fizičke zavisnosti.

**2.2.2** Naredni korak u ovoj fazi istraživanja biće ispitivanje uloge GABA<sub>A</sub> receptora, i posebno podtipa GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrži  $\alpha_1$  podjedinicu, u ispoljavanju fizičke zavisnosti. Ovo će se postići primenom neselektivnog (flumazenil) ili  $\alpha_1$  selektivnog ( $\beta$ CCt) neutralnog modulatora nakon obustave ponavljane primene diazepama, a neposredno pre samog testiranja. Efekti nakon primene selektivnog i neselektivnog neutralnog modulatora biće poređeni sa grupom kojoj je obustavljena primena diazepama i sa grupom kojoj je akutno primenjen diazepam.

**2.2.3** Uporednom primenom diazepama sa  $\alpha_1$  selektivnim neutralnim modulatorom GABA<sub>A</sub> receptora ( $\beta$ CCt), prema prethodno utvrđenom režimu primene, ispitaće se uticaj ovog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora na razvoj fizičke zavisnosti, praćeno kroz ispoljavanje povećanog nivoa anksioznosti i sniženje konvulzivnog praga u odnosu na kontrolnu grupu.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 ŽIVOTINJE

Eksperimenti su sprovedeni na pacovima Wistar soja (Farma za uzgoj eksperimentalnih životinja, VMA, Beograd). Ukupan broj životinja korišćenih u eksperimentima bio je 400. Životinje su bile smeštene u standardnim kavezima (dimenzije kaveza: 265 x 180 x 420 mm), između 4 i 6 pacova po jednom kavezu. Telesna masa pacova na početku eksperimenta iznosila je između 180 i 200 g. Životinje su merene svakodnevno pre primene tretmana i nakon toga hranjene tako da napreduju približno 2 do 3 g dnevno. Pristup vodi bio je *ad libitum*. Prostirka je menjana tri puta sedmično (ponedeljkom, sredom i petkom). Temperatura u prostoriji u kojoj su pacovi bili smešteni iznosila je  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , relativna vlažnost vazduha bila je između 40 i 70%. Ciklusi dan/noć smenjivali se se na 12 h (svetlo je uključivano u 6:00 h), a intenzitet svetla u prostoriji bio je 120 lx. Sva testiranja su sprovedena u toku svetle faze, i to između 8:00 i 13:00 h. Sve sprovedene procedure su u skladu sa Direktivom EEC 86/609 i odobrene su od strane Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U istraživanjima je korišćen međugrupni dizajn, odnosno različiti tretmani su primenjivani različitim, nezavisnim grupama životinja. Broj životinja po grupi bio je između 8 i 14.

#### 3.2 SUPSTANCE

U ispitivanjima su korišćeni komercijalno dostupni neselektivni pozitivni modulator  $\text{GABA}_A$  receptora diazepam, neselektivni neutralni modulator flumazenil i eksperimentalne supstance sintetisane u laboratoriji prof. James M Cook-a, Department of Chemistry, University of Wisconsin-Milwaukee, SAD: neutralni modulator selektivan za  $\text{GABA}_A$

receptore koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu, XLi093 (4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboksilna kiselina, 8-etinil-5,6-dihidro-5-metil-6-okso-,1,3-propandiil estar) (Li i sar., 2003) i neutralni modulator selektivan za GABA<sub>A</sub> receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu,  $\beta$ CCt ( $\beta$  karbolin-3-karboksilat-t-butil estar) (Rowlett i sar., 2005). Navedene supstance su rastvarane i/ili suspendovane u rastvaraču sastava: 1% Tween 80, 14% propilenglikol i do 100% destilovana voda. Sve supstance su primenjivane intraperitonealno (*i.p.*) u zapremini 1 ml/kg. Za izazivanje konvulzivnih napada korišćen je antagonist GABA<sub>A</sub> receptora pentilentetrazol, rastvoren u 0,9% NaCl. Za uvođenje životinja u anesteziju korišćen je intravenski anestetik ketamin (Ketamidol, Richter Pharma Ag, Wels, Austrija), primenjen *i.p.* u dozi 100 mg/kg.

### 3.3 BIHEJVIOALNI TESTOVI

#### 3.3.1 Test spontane lokomotorne aktivnosti (SLA test)

Test SLA se koristi za procenu uticaja tretmana na motornu aktivnost životinje. Nakon primene odgovarajućeg tretmana, pojedinačne životinje se spuštaju u kavez od pleksiglasa (dimenzija 40 cm x 25 cm x 35 cm) i ponašanje pacova se prati pod crvenim svetlom u vremskom periodu od 20 min do 30 min. Iznad kaveza se nalazi kamera koja je povezana sa računarnom smeštenim u susednoj prostoriji i pomoću instaliranog ANY-maze programa (Stoelting CO., Wood Dale, IL, SAD) prate se parametri motorne aktivnosti. Virtuelna površina kaveza je podeljena na centralnu zonu, koja čini 20% ukupne površine aparature i perifernu zonu. Da bi program detektovao prisustvo životinje u centralnoj zoni, preko 70% površine životinje mora da se nađe u ovoj zoni, a da se ne bi detektovao izlaz iz centralne zone najmanje 50% površine tela mora da ostane u zoni. Kao parametri motorne aktivnosti praćeni su ukupni pređeni put, pređeni put u centralnoj zoni i pređeni put u perifernoj zoni kaveza. Dodatno, pređeni put je praćen i analiziran po 5-minutnim intervalima.

SLA test je korišćen u eksperimentima ispitivanja razvoja tolerancije na sedativno dejstvo diazepam (od EKSPERIMENTA 1.1 do EKSPERIMENTA 1.5).

### 3.3.2 Uzdignuti plus lavirint (UPL)

UPL predstavlja široko korišćeni animalni model anksioznosti, za koji je pokazano da je osetljiv na promene nivoa anksioznosti u oba smera, odnosno da se primenom UPL može detektovati anksiogeni i anksiolitički efekat primenjene manipulacije ili tretmana. UPL se bazira na konfliktu između urođenog straha glodara prema otvorenom prostoru i težnje životinje da ispita novi prostor u kome se nalazi (Rodgers i Johnson, 1995).

Aparatura uzdignutog plus lavirinta se sastoji od dva zatvorena kraka (dimenzija: 50 cm x 10 cm x 40 cm) i dva naspramno postavljena otvorena kraka (50 cm x 10 cm) sa ivicama (0,3 cm), koji su povezani centralnom zonom (10 cm x 10 cm). Aparatura je 50 cm odignuta od poda. Testiranja se vrše pod crvenim svetlom, intenziteta 10 lx, i nakon svakog testiranja aparatura se očisti razblaženim alkoholom i ubrusom. Ponašanje životinje u aparaturi se snima pomoću kamere, a podaci se obrađuju upotrebom programa ANY-maze. Životinja se spušta u centralnu zonu aparature, glavom okrenutom ka zatvorenom kraku i ponašanje se prati u toku 5 min. Kao standardni spaciotemporalni parametri koji ukazuju na promene nivoa anksioznosti analizirani su: procenat vremena provedenog u otvorenim kracima ( $100 \times \text{vreme u otvorenim kracima} / (\text{vreme u otvorenim kracima} + \text{vreme u zatvorenim kracima})$ ), procenat ulazaka u otvorene krake ( $100 \times \text{broj ulazaka u otvorene krake} / (\text{broj ulazaka u otvorene} + \text{broj ulazaka u zatvorene krake})$ ). Pored ova dva parametra, prati se i vreme provedeno u distalnim delovima otvorenih kraka, a distalni deo otvorenog kraka predstavlja 30% površine ovih kraka najudaljenije od centralne zone. Pored parametara anksioznosti prate se i parametri koji ukazuju na motornu aktivnost pacova: ukupni pređeni put, broj ulazaka u sve krake ( $\text{broj ulazaka u otvorene krake} + \text{broj ulazaka u zatvorene krake}$ ) i broj ulazaka u zatvorene krake lavirinta. Dodatno, vreme provedeno u proceni rizika se definiše kao vreme provedeno u istraživanju okoline kada

životinja prednjim šapama i glavom napusti zatvoreni krak, dok se zadnjim delom tela još uvek nalazi u zatvorenom kraku. Ovaj parametar predstavlja različitu dimenziju ponašanja u odnosu na druge praćene parametre anksioznosti i motorne aktivnosti i blisko je povezan sa procesima donošenja odluke, izbegavanja opasnosti i konfliktom između privlačenja i odbijanja (Cruz i sar., 1994; Rodgers i Johnson, 1995). Program beleži ulazak u otvorene krake lavirinta, zatvorene krake lavirinta, ili distalne delove otvorenih kraka kada se preko 90% telesne površine pacova nađe u ovim delovima prostora, dok više od 10% površine još uvek mora da se nalazi u ovim delovima da program ne bi detektovao izlaz iz zone.

UPL test je korišćen u eksperimentu ispitivanja tolerancije na anksiolitičko dejstvo diazepama (EKSPERIMENT 1.1) i eksperimentima ispitivanja nivoa anksioznosti nakon obustave ponavljane primene diazepama (EKSPERIMENTI 2.1 do 2.3).

### **3.3.3 Test jačine stiska (JS)**

Test JS predstavlja bihejvioralni test za procenu mišićne snage pacova i koristi se za ispitivanje miorelaksantnog dejstva lekova i procenu toksičnog potencijala nekih supstanci (Maurissen i sar., 2003). Nakon primene odgovarajućeg tretmana, pacovu se dozvoli da prednjim šapama uhvati trapezoidnu metalnu žicu koja je pričvršćena za uređaj za merenje jačine stiska (proizvođač Ugo Basile, Italija). Nakon toga eksperimentator polako vuče životinju od uređaja, dok se pacov samo prednjim šapama drži za žicu, a zadnje šape su odvojene od podloge. Sila pri kojoj pacov ispušta žicu koju vuče, izražena po telesnoj masi pacova, predstavlja parametar koji se meri u ovom testu.

Test JS je korišćen u eksperimentu ispitivanja tolerancije na miorelaksantno dejstvo diazepama (EKSPERIMENT 1.1).



### 3.3.4 Intravenski pentilentetrazolski test (*i.v.* PTZ) test

PTZ, antagonist GABA<sub>A</sub> receptora, koristi se u laboratorijskim istraživanjima zbog svog konvulzivnog i anksiogenog efekta. Primenjen u odgovarajućim dozama PTZ može izazvati miokloničke, kloničke i toničke napade. Intravenski PTZ test predstavlja izuzetno precizan test za procenu praga konvulzivne aktivnosti kod pojedinačne životinje i omogućava dobijanje validnih podataka na relativno malom broju životinja (Löscher, 2009).

Na špric (zapremine 20 ml) poznatog unutrašnjeg dijametra zakači se infuzioni sistem za bebe sa leptir iglom dimenzija 25 G x 3/4 in. Sistem se ispuni rastvorom PTZ, koncentracije 40 mg/ml i postavi se na infuzionu pumpu (Stoelting Co., Wood Dale Illinois, SAD). Pre početka eksperimenta, repna vena pacova se dilatira u toploj vodi, a rep se nakon toga prebriše suvim ubrusom. Pacov se stavi u kutiju od pleksiglasa sa rupama za ventilaciju (dimenzije kutije: 22 cm x 10 cm x 10 cm). Igla infuzionog sistema se pozicionira u repnu venu, a prisustvo igle u veni verifikuje se pojavljivanjem krvi u infuzionom sistemu. Tek nakon što se potvrdi položaj igle u veni započinje se *i.v.* primena PTZ brzinom 0,5 ml/min. Ponašanje životinje istovremeno prate dva posmatrača. Beleži se zapremina rastvora PTZ potrebna za razvoj prvog kloničko-toničkog napada kod svake životinje (Fahey i sar., 2006), a doza PTZ potrebna za izazivanje napada izračunava prema formuli: zapremina PTZ (ml) x koncentracija PTZ (mg/ml) / telesna masa (kg). Ukoliko se toničko-klonički napad nije javio do postizanja prethodno određene maksimalne zapremine PTZ koja se može primeniti (0,7 ml), onda se ova zapremina uzima za izračunavanje doze PTZ. Dobijeni podaci za životinje kod kojih se napad nije razvio zbog neadekvatne primene (igla van vene) nisu uzeti u obzir prilikom obrade rezultata.

U prezentovanom radu *i.v.* PTZ test je korišćen za procenu konvulzivnog praga nakon obustave ponavljane primene diazepama u EKSPERIMENTU 2.3.

### 3.4 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA LIGANADA U PLAZMI I MOZGU

Nakon dekapitacije, uzorci krvi su skupljani iz karotidne arterije, zatim centrifugirani na  $5000\times g$  15 min, a supernatant (serum/plazma) je zatim podvrgavan predpripremi za kvantifikaciju (videti ispod). Mozgovi su takođe odmah vađeni, čišćeni pincetom i ispirani fiziološkim rastvorom, odmeravani u epruveti, i na kraju homogenizovani u 2 ml metanola rotor–stator blenderom (T 25 digital Ultra–Turax, IKA, Nemačka) na 16000 rpm tokom 2 min. Zatim je homogenat dopunjavan do 5 ml metanolom, centrifugiran ( $9000\times g$ , 15 min) i podvrgavan predpripremi za kvantifikaciju LC–MS/MS analitičkom metodom.

Koncentracije odabranih supstanci u serumu i moždanom tkivu (diazepama,  $\beta$ CCt-a i XLi093-a) određivane su pomoću Waters Alliance 2695, Mass Lynx, Waters ZQ 2000 kvadrapolnog analizatora koji koristi jonizaciju u elektrospreju (eng. the electrospray ionization interface, ESI–MS; Waters, Milford, MA, USA), a podaci su dobijeni praćenjem izabranog jona (eng. selected ion monitoring—SIM) jonske mase  $m/z$  237 i skeniranjem opsega jonskih masa  $m/z$  100–400 (eng. full–scan ESI+ mode). Limiti kvantifikacije u oba eksperimenta bili su 1  $\mu g/l$  (uzorci seruma/plazme) i 10  $\mu g/l$  (uzorci moždanog tkiva). Za predpripremu uzoraka korišćena je tečno–čvrsta ekstrakcija (eng. solid–phase extraction—SPE) uz pomoć Oasis<sup>®</sup> HLB kertridža (Waters, Milford, MA, USA), prethodno kondicioniranih metanolom i destilovanom vodom. Kao uzorci su nanošeni zakišeljani serum/plazma ili razblaženi zakišeljani supernatant homogenata mozga, a kertridži su ispirani sa 1 ml 5% metanola. Kertridži su zatim sušeni pod vakuumom, a supstance od interesa su eluirane sa 1 ml metanola. Nakon evaporacije ostaci su rekonstituisani u 1 ml mobilne faze, koja se sastojala od smeše: 5 mM amonijum formijat (pH 3,5): acetonitril sa 0,1% mravlje kiseline = 45% : 55% izokratski uslovi; i onda injektovani u LC sistem. Za separaciju jedinjenja korišćena je kolona XTerra RP18 (Waters, Milford, MA, USA). Žrtvovanje i uzimanje uzoraka obavljeno je u namenskim prostorijama vivarijuma Farmaceutskog fakulteta, dok je analitička obrada uzoraka urađena u saradnji sa Katedrom za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

### 3.5 PRIMENJENI EKSPERIMENTALNI PROTOKOLI

#### EKSPERIMENT 1.1

Ispitivanje tolerancije na sedativno, anksiolitičko i miorelaksantno dejstvo diazepama u dozi 2 mg/kg, primenjenog nakon 14 dana ponavljane *i.p.* primene diazepama u dozi 0,5 mg/kg, 2 mg/kg ili 10 mg/kg, jednom dnevno

Na početku eksperimenta životinje su randomizovano podeljene u pet različitih grupa od po deset životinja. Eksperimentalne grupe su prikazane u **Tabeli 2**. Dvema grupama je ponavljano, jednom dnevno u toku 14 dana primenjivan rastvarač u zapremini 1 ml/kg. Preostale tri grupe su tretirane jednom dnevno u toku 14 dana diazepamom u jednoj od sledećih doza: 0,5 mg/kg, 2 mg/kg ili 10 mg/kg, primenjenim *i.p.* Na dan testiranja, odnosno petnaestog dana od početka eksperimenta, životinjama iz grupa ponavljano tretiranih diazepamom i životinjama iz jedne grupe tretirane rastvaračem primenjen je *i.p.* diazepam 2 mg/kg, 5 min pre početka testiranja. Ove četiri grupe su formirale: DZP 0,5-DZP 2, DZP 2-DZP 2, DZP 10-DZP 2 i SOL-DZP 2 grupe. Životinjama iz preostale grupe koja je ponavljano tretirana rastvaračem, primenjen je rastvarač i pre testiranja (SOL-SOL grupa). Dodatno, u cilju procene uticaja svakodnevnog rukovanja i primene rastvarača na ponašanje životinja i na efekat tretmana, ispitane su još dve grupe od po 8 životinja koje su bile izložene jednokratnoj *i.p.* primeni rastvarača ili diazepama 2 mg/kg, 5 min pre testiranja, bez prethodne manipulacije. Sve životinje su testirane prvo u testu SLA u toku 20 min, odmah nakon toga u UPL u toku 5 min, i na kraju u testu JS. Redosled testova je izabran tako što su prvo sprovedene manje invazivne procedure pa zatim zahtevniji testovi.

**Tabela 2: Eksperimentalni protokol, EKSPERIMENT 1.1**

OZNAKA GRUPE	PONAVLJANI TRETMAN (1 – 14 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (15. DANA)
<b>SOL-SOL</b>	SOL	SOL
<b>SOL-DZP 2</b>	SOL	2 mg/kg DZP
<b>DZP 0,5-DZP 2</b>	0,5 mg/kg DZP	2 mg/kg DZP
<b>DZP 2-DZP 2</b>	2 mg/kg DZP	2 mg/kg DZP
<b>DZP 10-DZP 2</b>	10 mg/kg DZP	2 mg/kg DZP

DZP – diazepam, SOL – rastvarač

### EKSPERIMENT 1.2

Ispitivanje razvoja tolerancije na sedativno dejstvo diazepamom 2 mg/kg nakon ponavljane primene iste doze diazepamom dva puta dnevno u toku 7 i 14 dana i praćenje nivoa anksioznosti 24 h nakon poslednje primene tretmana i ispitivanja sedativnog efekta

Pre početka eksperimenta, životinje su randomizovano podeljene u četiri grupe od po deset životinja i nakon toga podvrgnute su ponavljanoj *i.p.* primeni tretmana dva puta dnevno (u 8:00 i 16:00 h). Eksperimentalne grupe su prikazane u **Tabeli 3**. U periodu između prvog i sedmog dana, tri grupe su tretirane rastvaračem, dok su pacovi iz preostale, četvrte grupe primali diazepam 2 mg/kg. Osmog dana, životinjama iz dve grupe koje su prethodnih 7 dana primale rastvarač, ponovo je primenjen rastvarač i one su formirale grupe: SOL-SOL i SOL-DZP 2 (14 DANA). Preostalim dvema grupama, od kojih je jedna grupa prethodnih sedam dana bila tretirana rastvaračem, a druga diazepamom 2 mg/kg, osmog dana ujutru je primenjen diazepam 2 mg/kg. Ove dve grupe su činile eksperimentalne grupe: SOL-DZP 2 (7 DANA) i DZP 2-DZP 2. Sve životinje su 5 min nakon jutarnje primene tretmana 8. dana testirane u toku 30 min u testu SLA. Nadalje, od osmog dana popodne do četrnaestog dana životinjama je nastavljena ponavljana primena tretmana kao i u prvih 7 dana, osim što je grupi SOL-DZP 2 (7 DANA) nastavljena primena diazepamom 2 mg/kg. Petnaestog dana pre testiranja jedino je grupi SOL-SOL primenjen rastvarač, dok je preostalim grupama

primenjen diazepam 2 mg/kg i nakon 5 min sve životinje su testirane u testu SLA, u toku 30 min. U analizu praćenih efekata u testu SLA nakon 7 dana ponavljane primene nisu uključeni rezultati za grupu SOL-DZP 2 (14 DANA), a u analizi efekata nakon 14 dana nisu uzeti u obzir rezultati za grupu SOL-DZP 2 (7 DANA). Ove dve grupe su testirane kako je prethodno navedeno, da bi se obezbedilo da sve grupe prođu identičnu proceduru. Nakon 24 h od poslednje primene tretmana i testiranja petnaestog dana, životinje iz grupa SOL-SOL, SOL-DZP 2 (7 DANA) i DZP 2-DZP 2 testirane su u UPL.

**Tabela 3: Eksperimentalni protokol, EKSPERIMENT 1.2**

OZNAKA GRUPE	PONAVLJANI TRETMAN (1 – 7 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (8. DANA)	PONAVLJANI TRETMAN (8 – 14 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (15. DANA)
SOL-SOL	SOL	SOL	SOL	SOL
SOL-DZP 2 (7 DANA)	SOL	2 mg/kg DZP	2 mg/kg DZP	2 mg/kg DZP
SOL-DZP 2 (14 DANA)	SOL	SOL	SOL	2 mg/kg DZP
DZP 2-DZP 2	2 mg/kg DZP	2 mg/kg DZP	2 mg/kg DZP	2 mg/kg DZP

DZP – diazepam, SOL – rastvarač

### EKSPERIMENT 1.3

Ispitivanje uticaja ponavljane primene  $\alpha_1$ -selektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora,  $\beta$ CCt-a u dozi 5 mg/kg, na razvoj tolerancije na sedativno dejstvo diazepama 5 mg/kg nakon ponavljane *i.p.* primene diazepama 5 mg/kg dva puta dnevno u toku 7 i 14 dana

Pre početka ponavljane primene, životinje su testirane u testu SLA, u cilju formiranja grupa sa bliskim bazalnim vrednostima parametara iz testa SLA. Nakon bazalnog testiranja, životinje su podeljene u četiri eksperimentalne grupe (**Tabela 4**) i podvrgnute ponavljanoj primeni tretmana. U periodu između prvog i sedmog dana, svim životinjama je dva puta dnevno (u 8:00 h i 16:00 h) primenjivan odgovarajući tretman *i.p.* putem. Broj pacova po grupi bio je između 8 i 10. Dve grupe životinja su primale po dve *i.p.* injekcije rastvarača

(SOL-SOL i SOL-DZP 5 grupe), jedna grupa je primala diazepam 5 mg/kg i rastvarač (DZP 5-DZP 5 grupa), a preostala, četvrta, grupa svakodnevno je primala diazepam u dozi 5 mg/kg i  $\beta$ CCt 5 mg/kg (DZP 5- $\beta$ CCt 5). Osmog dana, neposredno pre testiranja u SLA jedino je životinjama iz grupe SOL-SOL primenjen rastvarač, dok je svim ostalim životinjama primenjen diazepam u dozi 5 mg/kg. Nakon testiranja u testu SLA, u trajanju od 30 min, grupi DZP 5- $\beta$ CCt 5 primenjeno je 5 mg/kg  $\beta$ CCt-a, dok su sve ostale životinje primile rastvarač. Nadalje je nastavljena ponavljana primena tretmana kao i u periodu između prvog i sedmog dana. Petnaestog dana, neposredno pre ponovnog testiranja u testu SLA, životinjama je primenjen tretman kao i osmog dana, što je podrazumevalo da su sve životinje, osim onih iz grupe SOL-SOL, primile diazepam u dozi 5 mg/kg, dok su životinje iz SOL-SOL grupe primile rastvarač. Nakon testiranja u SLA, polovini grupe DZP 5- $\beta$ CCt 5 (4 pacova) primenjen je  $\beta$ CCt u dozi 5 mg/kg, a 15 min kasnije primenjena je i anestezija i životinje su žrtvovane u cilju određivanja koncentracija diazepamima i  $\beta$ CCt-a. Preostale životinje iz ove grupe (4 pacova) anestezirane su odmah nakon završenog testiranja u SLA testu, i žrtvovane takođe radi određivanja koncentracija diazepamima i  $\beta$ CCt-a u plazmi i mozgu.

**Tabela 4: Eksperimentalni protokol, EKSPERIMENT 1.3**

OZNAKA GRUPE	PONAVLJANI TRETMAN (1 – 7 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (8. DANA)	TRETMAN POSLE TESTIRANJA (8. DANA)	PONAVLJANI TRETMAN (8 – 14 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (15. DANA)
<b>SOL-SOL</b>	SOL + SOL	SOL	SOL	SOL + SOL	SOL
<b>SOL-DZP 5</b>	SOL + SOL	5 mg/kg DZP	SOL	SOL + SOL	5 mg/kg DZP
<b>DZP 5-DZP 5</b>	5 mg/kg DZP + SOL	5 mg/kg DZP	SOL	5 mg/kg DZP + SOL	5 mg/kg DZP
<b>DZP 5-<math>\beta</math>CCt 5</b>	5 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt	5 mg/kg DZP	5 mg/kg $\beta$ CCt	5 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt	5 mg/kg DZP

DZP – diazepam, SOL – rastvarač

### EKSPERIMENT 1.4

Ispitivanje uticaja ponavljane primene  $\alpha_5$ -selektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora, XLi093, u dozi 5 mg/kg na razvoj tolerancije na sedativno dejstvo diazepama 5 mg/kg nakon ponavljane *i.p.* primene diazepama 5 mg/kg dva puta dnevno u toku 7 i 14 dana i praćenje nivoa anksioznosti 48 h nakon poslednje primene tretmana i ispitivanja sedativnog dejstva

Pre početka ponavljane primene tretmana životinje su testirane u testu SLA u toku 30 min, u cilju formiranja grupa sa homogenim bazalnim vrednostima parametara motorne aktivnosti. Pacovi su zatim podeljeni u četiri grupe od po 10 životinja i podvrgnuti su ponavljanoj primeni tretmana, kao što je prikazano u **Tabeli 5**. Tretman je primenjivan dva puta dnevno (u 8:00 h i 16:00 h), *i.p.* putem. Životinje iz grupa SOL-SOL i SOL-DZP 5 svakodnevno su primale po dve injekcije rastvarača. Grupa DZP 5- DZP 5 je svakodnevno uz diazepam 5 mg/kg dobijala i rastvarač, dok su životinje iz grupe DZP 5-XLi093 5 uz diazepam u dozi 5 mg/kg primale i XLi 093 u dozi 5 mg/kg. Osmog dana ujutru, svim životinjama je primenjen diazepam u dozi 5 mg/kg, osim životinja iz grupe SOL-SOL koje su i tada primile rastvarač, i 5 min nakon primene tretmana sproveden je test SLA, u toku 30 min. Nakon testiranja pacovima iz grupa SOL-SOL, SOL-DZP 5 i DZP 5-DZP 5 primenjen je rastvarač, dok su životinje iz grupe DZP 5-XLi093 5, primile XLi093 u dozi 5 mg/kg. Od osmog dana popodne do četrnaestog dana nastavljena je ponavljana primena tretmana kao i u prvih 7 dana. Ponovno testiranje u SLA sprovedeno je petnaestog dana ujutru, nakon primene diazepama 5 mg/kg. Dva dana (48 h) nakon poslednje primene tretmana i procene motorne aktivnosti u SLA, životinje iz grupa SOL-SOL, DZP 5-DZP 5 i DZP 5-XLi093 5 testirane su u testu UPL u cilju procene uticaja obustave tretmana na nivo anksioznosti kod pacova.

**Tabela 5: Eksperimentalni protokol, EKSPERIMENT 1.4**

OZNAKA GRUPE	PONAVLJANI TRETMAN (1 – 7 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (8. DANA)	TRETMAN POSLE TESTIRANJA (8. DANA)	PONAVLJANI TRETMAN (8 – 14 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (15. DANA)
<b>SOL-SOL</b>	SOL + SOL	SOL	SOL	SOL + SOL	SOL
<b>SOL-DZP 5</b>	SOL + SOL	5 mg/kg DZP	SOL	SOL + SOL	5 mg/kg DZP
<b>DZP 5-DZP 5</b>	5 mg/kg DZP + SOL	5 mg/kg DZP	SOL	5 mg/kg DZP + SOL	5 mg/kg DZP
<b>DZP 5-XLi093 5</b>	5 mg/kg DZP + 5 mg/kg XLi093	5 mg/kg DZP	5 mg/kg XLi093	5 mg/kg DZP + 5 mg/kg XLi093	5 mg/kg DZP

DZP – diazepam, SOL – rastvarač

### EKSPERIMENT 1.5

Ispitivanje uticaja ponavljane primene  $\alpha_1$ -selektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora,  $\beta$ CCt-a, u dozi 5 mg/kg, i ponavljane primene  $\alpha_5$ -selektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora, XLi093, u dozi 10 mg/kg, na razvoj tolerancije na sedativno dejstvo diazepamata 5 mg/kg nakon ponavljane *i.p.* primene diazepamata 5 mg/kg dva puta dnevno u toku 3 i 7 dana. Određivanje koncentracije liganada u plazmi i mozgu nakon procene motorne aktivnosti. Procena ponašanja u UPL 48 h nakon poslednje primene tretmana

Pre početka ponavljane primene tretmana životinje su testirane u SLA u cilju formiranja eksperimentalnih grupa sa približnim bazalnim vrednostima parametara motorne aktivnosti. Životinje su nakon testiranja podeljene u pet grupa, od po 11 do 14 životinja po grupi. Eksperimentalne grupe i primenjivani tretmani prikazani su u **Tabeli 6**. U toku prva tri dana ponavljane primene dve grupe su svakodnevno, dva puta dnevno, primale po dve injekcije rastvarača (SOL-SOL i SOL-DZP 5 grupe), dok su preostale tri grupe istovremeno uz primenu 5 mg/kg diazepamata tretirane dva puta dnevno rastvaračem (DZP 5-DZP 5) ili  $\beta$ CCt-om u dozi 5 mg/kg (DZP 5-  $\beta$ CCt 5) ili sa XLi093 u dozi 10 mg/kg (DZP 5-XLi093



10). Odgovarajući tretman primenjivan je dva puta dnevno (u 8:00 h i 16:00 h), *i.p.* putem. Nakon 3 dana ponavljane primene, četvrtog dana ujutru jedino pacovima iz grupe SOL-SOL je primenjen rastvarač, dok je svim ostalim životinjama primenjen diazepam u dozi 5 mg/kg i 5 min nakon primene tretmana životinje su testirane u SLA testu u trajanju od 30 min. Nakon testiranja je primenjen odgovarajući tretman: pacovima iz grupe DZP 5- $\beta$ CCt 5 primenjen je  $\beta$ CCt u dozi 5 mg/kg, pacovima iz grupe DZP 5-XLi093 10 primenjen je XLi093 u dozi 10 mg/kg, a ostalim životinjama je primenjen rastvarač. Životinje iz SOL-SOL grupe su isključene iz daljeg eksperimenta. Od četvrtog dana popodne do sedmog dana ponavljani tretman je primenjivan kao i u prva tri dana eksperimenta (dva puta dnevno, *i.p.* putem). Osmog dana ujutru, 5 min nakon primene diazepama 5 mg/kg životinje su ponovo testirane u SLA testu u trajanju od 30 min. Po 8 pacova iz svake grupe 48 h nakon poslednje primene tretmana testirano je u UPL.

**Tabela 6: Eksperimentalni protokol, EKSPERIMENT 1.5**

OZNAKA GRUPE	PONAVLJANI TRETMAN (1 – 3 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (4. DANA)	TRETMAN POSLE TESTIRANJA (4. DANA)	PONAVLJANI TRETMAN (4 – 7 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (8. DANA)
<b>SOL-SOL</b>	SOL + SOL	SOL	SOL	-	-
<b>SOL-DZP 5</b>	SOL + SOL	5 mg/kg DZP	SOL	SOL + SOL	5 mg/kg DZP
<b>DZP 5-DZP 5</b>	5 mg/kg DZP + SOL	5 mg/kg DZP	SOL	5 mg/kg DZP + SOL	5 mg/kg DZP
<b>DZP 5-<math>\beta</math>CCt 5</b>	5 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt	5 mg/kg DZP	5 mg/kg $\beta$ CCt	5 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt	5 mg/kg DZP
<b>DZP 5-XLi093 10</b>	5 mg/kg DZP + 10 mg/kg XLi093	5 mg/kg DZP	10 mg/kg XLi093	5 mg/kg DZP + 10 mg/kg XLi093	5 mg/kg DZP

DZP – diazepam, SOL – rastvarač

**EKSPERIMENT 2.1**

Ispitivanje nivoa anksioznosti u testu UPL 24 h nakon obustave ponavljane primene diazepama 2 mg/kg, jednom dnevno, *i.p.* putem u toku 21 dana i ispitivanje uticaja akutne primene neselektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora flumazenila 10 mg/kg na ispoljavanje anksioznosti

Na početku eksperimenta, 40 pacova je randomizovano podeljeno u 4 grupe i sve životinje su podvrgnute ponavljanoj primeni tretmana jednom dnevno (9:00 h). Kao što je prikazano u **Tabeli 7**, dve grupe su ponavljano tretirane diazepamom 2 mg/kg, dok je preostalim dvema grupama primenjivan rastvarač. Na dan testiranja, 24 sata nakon poslednje primene tretmana, pacovi iz jedne grupe kojoj je ponavljano primenjivan rastvarač primili su diazepam 2 mg/kg, i ove životinje su činile akutni diazepam (AD) grupu. Pacovi iz druge grupe koja je ponavljano primala rastvarač nisu primili nikakav tretman i oni su formirali kontrolnu grupu. Životinje iz preostale dve grupe, koje su u toku dvadeset jednog dana primale diazepam, na dan testiranja ili nisu primile nikakav tretman, ili su primile flumazenil 10 mg/kg i formirale su grupe obustava diazepama (OD) i obustava diazepama + flumazenil (OD + FLU 10).

**Tabela 7: Eksperimentalni protokol EKSPERIMENT 2.1**

OZNAKA GRUPE	PONAVLJANI TRETMAN (1 – 21 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (22. DANA)
<b>KONTROLA</b>	SOL	-
<b>AD</b>	SOL	2 mg/kg DZP
<b>OD</b>	2 mg/kg DZP	-
<b>OD + FLU 10</b>	2 mg/kg DZP	10 mg/kg FLU

DZP – diazepam, FLU – flumazenil, SOL – rastvarač

**EKSPERIMENT 2.2**

Ispitivanje nivoa anksioznosti u UPL 24 h nakon prekida ponavljane *i.p.* primene diazepamom 2 mg/kg tokom 21 dana i ispitivanje uticaja akutne primene različitih doza  $\alpha_1$ -selektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora  $\beta$ CCt-a (1,25 mg/kg, 5 mg/kg i 20 mg/kg) na ispoljavanje anksioznosti

Pre početka eksperimenta, životinje su randomizovano podeljene u 6 grupa, po 10 životinja (**Tabela 8**). Četiri grupe životinja su ponavljano tokom 21 dana, jednom dnevno primale diazepam u dozi 2 mg/kg, dok je životinjama iz preostale dve grupe jednom dnevno primenjivan rastvarač. Na dan testiranja, 24 h nakon poslednje primene tretmana, a neposredno pred testiranje u UPL, životinjama iz grupa ponavljano tretiranih diazepamom u dozi 2 mg/kg, primenjen je rastvarač ili  $\beta$ CCt u jednoj od doza: 1,25 mg/kg, 5 mg/kg ili 20 mg/kg i ove životinje su činile grupe obustava diazepamom (OD), OD +  $\beta$ CCt 1,25; OD +  $\beta$ CCt 5 i OD +  $\beta$ CCt 20. Preostalim dvema grupama koje su ponavljano tretirane rastvaračem tokom dvadeset jednog dana, na dan testiranja (24 h nakon poslednje primene tretmana, a neposredno pre testiranja u UPL), primenjen je rastvarač ili diazepam u dozi 2 mg/kg, i ove životinje su činile kontrolnu grupu i grupu akutni diazepam (AD).

**Tabela 8: Eksperimentalni protokol, EKSPERIMENT 2.2**

OZNAKA GRUPE	PONAVLJANI TRETMAN (1 – 21 DANA)	TRETMAN PRE TESTIRANJA (22. DANA)
<b>KONTROLA</b>	SOL	SOL
<b>AD</b>	SOL	2 mg/kg DZP
<b>OD</b>	2 mg/kg DZP	SOL
<b>OD + <math>\beta</math>CCt 1,25</b>	2 mg/kg DZP	1,25 mg/kg $\beta$ CCt
<b>OD + <math>\beta</math>CCt 5</b>	2 mg/kg DZP	5 mg/kg $\beta$ CCt
<b>OD + <math>\beta</math>CCt 20</b>	2 mg/kg DZP	20 mg/kg $\beta$ CCt

DZP – diazepam, SOL – rastvarač

**EKSPERIMENT 2.3**

Ispitivanje nivoa anksioznosti u UPL i osetljivosti na konvulzivne napade izazvane PTZ 24 h nakon prekida ponavljane *i.p.* primene diazepama 2 mg/kg u toku 14, 21 i 28 dana, i uticaj ponavljane primene  $\alpha_1$ -selektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora  $\beta$ CCt-a u dozi 5 mg/kg uz diazepam 2 mg/kg na praćene efekte

Na početku eksperimenta životinje su randomizovano podeljene u 9 grupa od po 10 pacova. Pacovima je ponavljano, jednom dnevno (u 8:30 h) u toku 14, 21, ili 28 dana, *i.p.* putem primenjivan tretman rastvaračem (SOL-SOL grupa), diazepamom u dozi 2 mg/kg (DZP 2-SOL grupa) ili diazepamom 2 mg/kg i  $\beta$ CCt-om u dozi 5 mg/kg (DZP 2-  $\beta$ CCt 5). Detaljan prikaz eksperimentalnih grupa i primenjenog tretmana nalazi se u **Tabeli 9**. Na dan testiranja, 24 h nakon primene poslednjeg tretmana, životinje su prvo testirane u UPL, i odmah nakon toga u *i.v.* PTZ testu.

**Tabela 9: Eksperimentalni protokol, EKSPERIMENT 2.3**

OZNAKA GRUPE	PONAVLJANI TRETMAN (1 – 7 DANA)	PONAVLJANI TRETMAN (8 – 14 DANA)	PONAVLJANI TRETMAN (15 – 21 DANA)	PONAVLJANI TRETMAN (22 – 28 DANA)
<b>SOL-SOL (14)</b>	-	-	SOL + SOL	SOL + SOL
<b>DZP 2-SOL (14)</b>	-	-	2 mg/kg DZP + SOL	2 mg/kg DZP + SOL
<b>DZP 2-<math>\beta</math>CCt 5 (14)</b>	-	-	2 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt	2 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt
<b>SOL-SOL (21)</b>	-	SOL + SOL.	SOL + SOL	SOL + SOL
<b>DZP 2-SOL (21)</b>	-	2 mg/kg DZP + SOL	2 mg/kg DZP + SOL	2 mg/kg DZP + SOL
<b>DZP 2-<math>\beta</math>CCt 5 (21)</b>	-	2 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt	2 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt	2 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt
<b>SOL-SOL (28)</b>	SOL + SOL	SOL + SOL	SOL + SOL	SOL + SOL
<b>DZP 2-SOL (28)</b>	2 mg/kg DZP + SOL	2 mg/kg DZP + SOL	2 mg/kg DZP + SOL	2 mg/kg DZP + SOL
<b>DZP 2-<math>\beta</math>CCt 5 (28)</b>	2 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt	2 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt	2 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt	2 mg/kg DZP + 5 mg/kg $\beta$ CCt

DZP – diazepam, SOL – rastvarač

### 3.6 STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

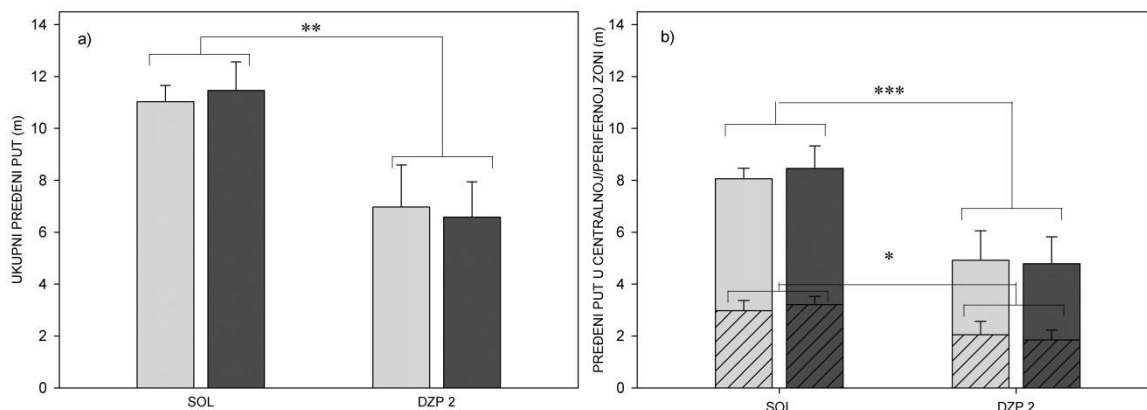
Svi podaci prikazani na slikama i u tabelama predstavljaju srednje vrednosti grupe sa standardnim greškama. Nakon provere normalne distribucije podataka, statistička obrada rezultata je rađena primenom parametarskih testova. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) korišćena je u eksperimentima ispitivanja razvoja tolerancije na bihevioralne efekte diazepama (EKSPERIMENTI 1.1 do 1.5) i kada je ispitivan uticaj prekida ponavljane primene različitih tretmana na ispoljavanje nivoa anksioznosti (EKSPERIMENT 2.1 i EKSPERIMENT 2.2). Dvofaktorska ANOVA primenjena je za poređenje efekata nakon akutne i ponavljane primene tretmana u EKSPERIMENTU 1.1, u cilju validacije primenjenog protokola EKSPERIMENTI 2.1 i 2.2 i radi ispitivanja uticaja tretmana i dužine ponavljane primene na ispoljavanje anksioznosti u EKSPERIMENTU 2.3. Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanim merenjem korišćena je prilikom analize pređenog puta iz testa SLA, analizirano po 5 min intervalima (EKSPERIMENTI 1.1 do 1.5) Kada bi ANOVA pokazala značajan uticaj faktora na praćeni parametar ( $p < 0,05$ ), rađeni su *post hoc* testovi (Tukey ili Student Newman Keuls), kako bi se detektovale razlike između pojedinih nivoa faktora. Ukoliko bi dvofaktorska ANOVA sa ponavljanim merenjem pokazala značajnu interakciju između faktora, onda bi se naknadno uradilo više jednofaktorskih ANOVA, za pojedinačne nivoe faktora, i po potrebi *post hoc* testovi. Za analizu podataka korišćeni su programi ANY-maze i SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Richmond, CA, SAD).

## 4. REZULTATI

### EKSPERIMENT 1.1

**1.1.1.** Procena uticaja rukovanja i svakodnevne primene rastvarača na ponašanje životinja u testovima SLA, UPL, i JS

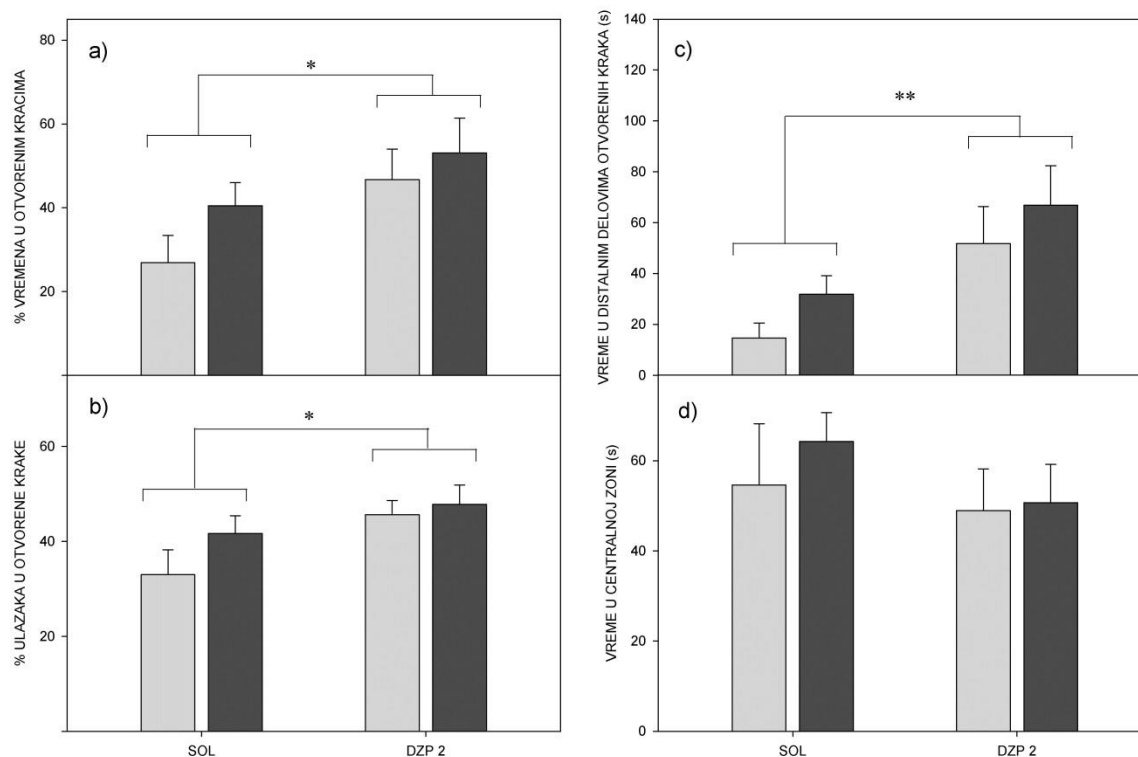
Primenom dvofaktorskih analiza varijansi ispitan je uticaj rukovanja i svakodnevne primene rastvarača na ponašanje životinja nakon primene diazepama u dozi 2 mg/kg ili rastvarača, poređenjem grupa eksperimentalno naivnih životinja i životinja kojima je svakodnevno u toku 14 dana primenjivan rastvarač. Kao što je prikazano na **Slici 3, grafici a) i b)**, akutna primena diazepama u dozi 2 mg/kg dovela je do značajnog smanjenja motorne aktivnosti u testu SLA, izraženo kroz značajno smanjenje ukupnog pređenog puta ( $F_{(1,32)} = 12,861$ ,  $p = 0,001$ ), smanjenje puta pređenog u centralnoj zoni ( $F_{(1,32)} = 7,261$ ,  $p = 0,011$ ) i smanjenje puta pređenog u periferoj zoni aparature ( $F_{(1,32)} = 13,418$ ,  $p < 0,001$ ). Primenjenom analizom nije pokazan značajan uticaj rukovanja i svakodnevne primene rastvarača na ponašanje životinja u SLA testu (ukupni pređeni put:  $F_{(1,32)} < 0,001$ ,  $p = 0,984$ ; pređeni put u centralnoj zoni:  $F_{(1,32)} = 0,013$ ,  $p = 0,910$ ; pređeni put u perifernoj zoni  $F_{(1,32)} = 0,006$ ,  $p = 0,939$ ). Takođe, nije zabeležena značajna interakcija između dva faktora (tretman i svakodnevno rukovanje) ni za jedan od tri parametra SLA testa (ukupni pređeni put:  $F_{(1,32)} = 0,107$ ,  $p = 0,745$ ; pređeni put u centralnoj zoni  $F_{(1,32)} = 0,185$ ,  $p = 0,670$ ; pređeni put u perifernoj zoni  $F_{(1,32)} = 0,0642$ ,  $p = 0,802$ ).



**Slika 3: Uticaj primene rastvarača (SOL) ili diazepama u dozi 2 mg/kg (DZP 2) na ponašanje eksperimentalno naivnih životinja (sivi stubići) i životinja kojima je primenjivan rastvarač 14 dana (tamno sivi stubići) u testu SLA. Grafik a) prikazuje uticaj primenjenog tretmana na ukupni pređeni put. Grafik b) prikazuje uticaj primenjenog tretmana na pređeni put u centralnoj zoni (šrafirani deo stubića) i pređeni put u perifernoj zoni (ukupna visina stubića). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL grupama. Broj životinja po grupi bio je između 8 i 10.**

Primenom dvofaktorskih analiza varijansi na parametre iz testa UPL pokazano je da akutna primena diazepama 2 mg/kg dovodi do anksiolitičkog efekta bez obzira da li su životinje bile podvrgnute prethodnom rukovanju i svakodnevnoj primeni rastvarača, što je pokazano kroz izostanak uticaja faktora rukovanje i izostanak značajne interakcije između faktora rukovanje i tretman na praćene parametre u UPL (vrednosti za praćene parametre prikazane su u **Tabeli 10**). Anksiolitički efekat akutne primene diazepama 2 mg/kg izražen je kroz značajno povećanje procenta vremena provedenog u otvorenim kracima ( $F_{(1,31)} = 5,426$ ,  $p = 0,027$ ), značajno povećanje procenta ulazaka u otvorene krake lavirinta ( $F_{(1,31)} = 5,231$ ,  $p = 0,029$ ) i povećanje vremena provedenog u distalnim delovima otvorenih kraka ( $F_{(1,31)} = 9,724$ ,  $p = 0,004$ ) u odnosu na kontrolnu grupu; prikazano na **Slici 4, grafici od a) do c)**. Sa druge strane, nije pokazan značajan uticaj akutne primene 2 mg/kg diazepama na vreme provedeno u centralnoj zoni UPL ( $F_{(1,31)} = 1,037$ ,  $p = 0,316$ ); **Slika 4, grafik d)**. Takođe, nije pokazan značajan uticaj akutne primene diazepama na parametre povezane sa

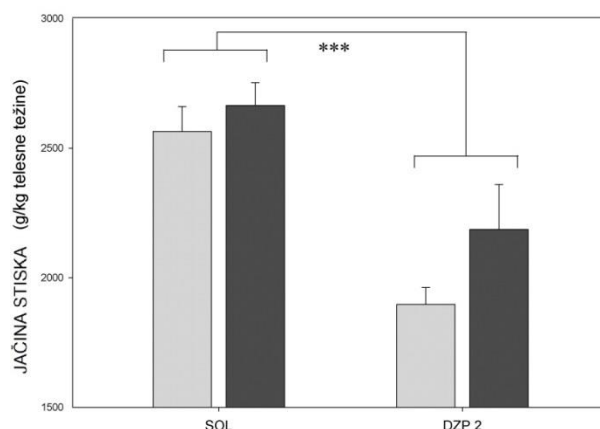
motornom aktivnošću, i to ukupni pređeni put ( $F_{(1,31)} = 0,509$ ,  $p = 0,481$ ) i broj ulazaka u zatvorene krake lavirinta ( $F_{(1,31)} = 0,421$ ,  $p = 0,521$ ).



**Slika 4:** Uticaj primene rastvarača (SOL) ili diazepama u dozi 2 mg/kg (DZP 2) eksperimentalno naivnim životinjama (sivi stubići) i životinjama kojima je primenjivan rastvarač 14 dana (tamno sivi stubići) na parametre anksioznosti u UPL. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  u poređenju sa SOL grupama. Broj životinja po grupi bio je između 8 i 10.

Analiza rezultata iz testa JS, prikazana na **Slici 5**, pokazala je značajno smanjenje jačine stiska nakon primene diazepama 2 mg/kg ( $F_{(1,31)} = 24,169$ ,  $p < 0,001$ ), bez obzira da li je životinjama prethodno rukovano u cilju svakodnevne primene rastvarača ( $F_{(1,31)} = 2,805$ ,  $p = 0,104$ ). Takođe, nije pokazana značajna interakcija između faktora tretman i rukovanje ( $F_{(1,31)} = 0,606$ ,  $p = 0,423$ ).



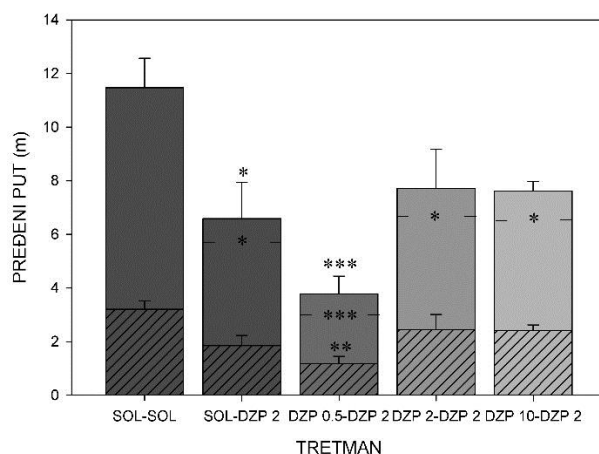


**Slika 5:** Uticaj primene rastvarača (SOL) ili diazepama u dozi 2 mg/kg (DZP 2) eksperimentalno naivnim životinjama (sivi stubići) i životinjama kojima je primenjivan rastvarač 14 dana (tamno sivi stubići) na jačinu stiska. \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL grupama. Broj životinja po grupi bio je između 8 i 10.

**1.1.2.** Ispitivanje tolerancije na sedativno, anksiolitičko i miorelaksantno dejstvo diazepama 2 mg/kg nakon 14 dana ponavljane i.p. primene diazepama u dozi 0,5 mg/kg, 2 mg/kg ili 10 mg/kg, jednom dnevno

Analiza parametara SLA testa je pokazala značajan uticaj ponavljane primene rastućih doza diazepama (0,5; 2 i 10 mg/kg) na efekte diazepama 2 mg/kg. Zapravo, jednofaktorske analize varijansi su pokazale veoma značajan uticaj tretmana na ukupni pređeni put ( $F_{(4,45)} = 6,675$ ,  $p < 0,001$ ) i pređeni put u perifernoj zoni ( $F_{(4,45)} = 7,231$ ,  $p < 0,001$ ), dok je uticaj tretmana na parametar pređeni put u centralnoj zoni bio slabije izražen ali i dalje značajan ( $F_{(4,45)} = 4,006$ ,  $p = 0,007$ ). Kao što je prikazano na **Slici 6**, u skladu sa post hoc (Tukey) testom, primena diazepama u dozi 2 mg/kg dovela je do značajnog smanjenja ukupnog pređenog puta kod grupa koje su ponavljano primale rastvarač (SOL-DZP 2) ili diazepam u dozi 0,5 mg/kg (DZP 0,5-DZP 2);  $p$  vrednosti 0,019 i  $p < 0,001$  u odnosu na SOL-SOL grupu. Tukey test je pokazao da primena diazepama 2 mg/kg dovodi do značajnog smanjenja puta pređenog u centralnoj zoni jedino nakon ponavljane primene diazepama u dozi 0,5 mg/kg (DZP 0,5-DZP 2);  $p$  vrednost 0,003 u poređenju sa SOL-SOL grupom (**Slika 6**). U pogledu na parametar pređeni put u perifernoj zoni aparature, primena

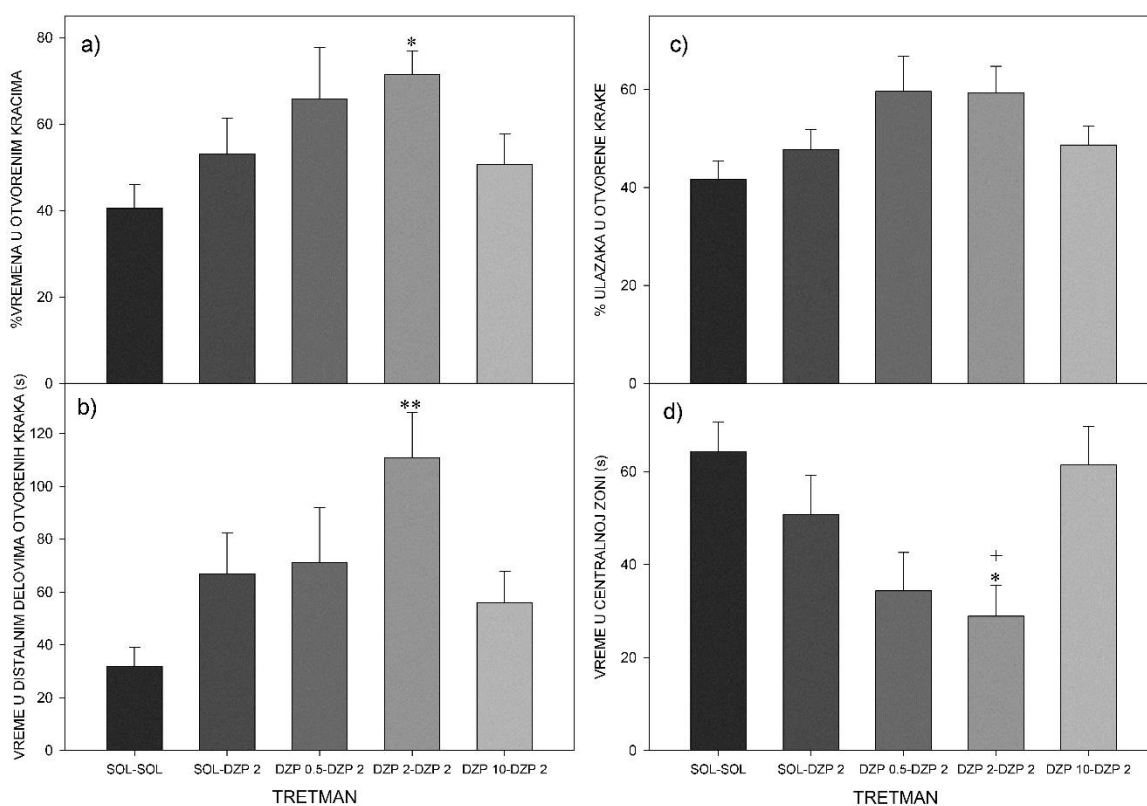
diazepama 2 mg/kg pre testiranja dovela je do značajnog smanjenja pređenog puta kod svih grupa koje su ponavljano primale diazepam u jednoj od doza: 0,5, 2 ili 10 mg/kg; p vrednosti za grupe SOL-DZP 2, DZP 0,5-DZP 2, DZP 2-DZP 2 i DZP 10-DZP 2 bile su, redom,  $p = 0,014$ ,  $p < 0,001$ ,  $p = 0,048$  i  $p = 0,041$  u poređenju sa SOL-SOL grupom (Slika 6).



**Slika 6:** Uticaj primene rastvarača (SOL-SOL) ili diazepama 2 mg/kg nakon 14 dana ponavljane primene rastvarača (SOL-DZP 2), diazepama 0,5 mg/kg (DZP 0,5-DZP 2), diazepama 2 mg/kg (DZP 2-DZP 2) ili diazepama 10 mg/kg (DZP 10-DZP 2) na parametre iz SLA testa. Nešrafirani deo stubića predstavlja razliku između ukupnog pređenog puta (visina stubića) i pređenog puta u centralnoj zoni (šrafirani deo stubića), tj. predstavlja pređeni put u perifernoj zoni. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL-SOL grupom. Broj životinja po grupi bio je između 8 i 10.

Primenom jednofaktorskih analizi varijansi pokazan je značajan uticaj ponavljane primene tretmana na parametre anksioznosti u testu UPL: procenat vremena provedenog u otvorenim kracima UPL ( $F_{(4,41)} = 2,627$ ,  $p = 0,048$ ), procenat ulazaka u otvorene krake lavirinta ( $F_{(4,41)} = 2,616$ ,  $p = 0,049$ ), vreme provedeno u distalnim delovima otvorenih kraka ( $F_{(4,41)} = 3,965$ ,  $p = 0,008$ ); prikazano na **Slici 7**. *Post hoc* test je pokazao da primena 2 mg/kg diazepama nakon 14 dana ponavljane primene iste doze ovog benzodiazepina dovodi do značajnog anksiolitičkog efekta, izraženo kroz značajno povećanje procenta vremena provedenog u otvorenim kracima ( $p = 0,045$ ), značajno povećanje vremena

provedenog u distalnim delovima otvorenih kraka ( $p = 0,003$ ) i tendenciju povećanja procenta ulazaka u otvorene krake ( $p = 0,084$ ) u odnosu na SOL-SOL grupu; **Slika 7, grafici a), b) i c)**, redom. S druge strane, nije pokazana značajna razlika u efektima 2 mg/kg diazepama nakon ponavljane primene rastvarača, diazepama 0,5 mg/kg ili diazepama 10 mg/kg u odnosu na SOL-SOL grupu. Jednofaktorska analiza varijanse je pokazala značajan uticaj tretmana na vreme provedeno u centralnoj zoni ( $F_{(4,41)} = 4,272$ ,  $p = 0,006$ ). *Post hoc* Tukey test je pokazao da primena 2 mg/kg diazepama nakon 14 dana ponavljane primene iste doze diazepama značajno smanjuje vreme provedeno u centralnoj zoni u poređenju sa SOL-SOL grupom ( $p = 0,016$ ), kao i u poređenju sa DZP 10-DZP 2 grupom ( $p = 0,032$ ); **Slika 7, grafik d)**.



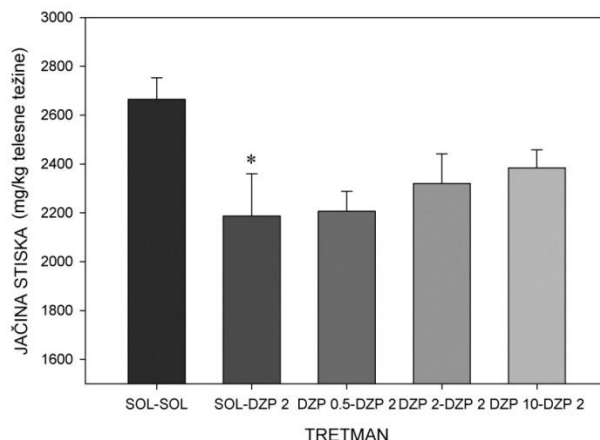
**Slika 7: Uticaj primene rastvarača (SOL-SOL) ili diazepama 2 mg/kg nakon 14 dana ponavljane primene rastvarača (SOL-DZP 2), diazepama 0,5 mg/kg (DZP 0,5-DZP 2), diazepama 2 mg/kg (DZP 2-DZP 2) ili diazepama 10 mg/kg (DZP 10-DZP 2) na parametre iz testa UPL. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  u poređenju sa SOL-SOL grupom, +  $p < 0,05$  u poređenju sa DZP 10-DZP 2 grupom. Broj životinja po grupi bio je između 8 i 10.**

U pogledu na parametre motorne aktivnosti, jednofaktorska ANOVA nije pokazala značajan uticaj tretmana na parametar ukupan pređeni put ( $F_{(4,41)} = 2,251$ ,  $p = 0,080$ ). Primenom jednofaktorske ANOVA, pokazan je značajan uticaj tretmana na broj ulazaka u zatvorene krake ( $F_{(4,41)} = 6,292$ ,  $p < 0,001$ ). Tukey test je pokazao da primena diazepama u dozi 2 mg/kg nakon 14 dana ponavljane primene najniže doze diazepama (DZP 0,5-DZP 2) ili srednje doze diazepama (DZP 2-DZP 2) značajno smanjuje broj ulazaka u zatvorene krake u poređenju sa SOL-SOL grupom ( $p < 0,001$  i  $p = 0,026$ ). Dodatno je zapažen značajno manji broj ulazaka u zatvorene krake lavirinta za grupu DZP 0,5-DZP 2 u poređenju sa SOL-DZP 2 grupom ( $p = 0,014$ ), **Tabela 10**.

**Tabela 10: Uticaj akutne primene rastvarača ili 2 mg/kg diazepama (SOL ili DZP 2) i ponavljane primene tretmana (SOL-SOL, SOL-DZP 2, DZP 0,5-DZP 2, DZP 10-DZP 2) na parametre motorne aktivnosti u testu UPL. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL-SOL grupom; +  $p < 0,05$  u poređenju sa SOL-DZP 2 grupom.**

	SOL	DZP 2	SOL- SOL	SOL- DZP 2	DZP 0,5- DZP2	DZP2- DZP2	DZP10- DZP2
Ukupni pređeni put (m)	8,67±0,96	10,02±1,31	10,32±0,75	10,34±0,85	6,86±1,25	10,22±1,00	9,59±0,90
Ulasci u zatvorene krake	6,00±0,68	6,25±0,70	7,40±0,62	6,22±0,83	3,00±0,60 ****+	4,56±0,73 *	5,50±0,45

Jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj ponavljane primene rastućih doza diazepama na jačinu stiska pacova ( $F_{(4,41)} = 3,008$ ,  $p = 0,029$ ) (**Slika 8**). Tukey test je pokazao da primena 2 mg/kg diazepama dovodi do slabljenja jačine stiska u odnosu na SOL-SOL grupu jedino kod životinja koje su prethodnih 14 dana bile izložene svakodnevnoj primeni rastvarača (SOL-DZP 2 grupa),  $p$  vrednost 0,032. Smanjenje jačine stiska bilo je blisko dostizanju značajnosti za grupu DZP 0,5- DZP 2 u poređenju sa SOL-SOL grupom ( $p = 0,053$ ), dok *post hoc* testom nisu detektovane razlike u efektima nakon primene diazepama 2 mg/kg posle 14 dana primene diazepama u dozi 2 mg/kg ili 10 mg/kg, u poređenju sa SOL-SOL grupom.

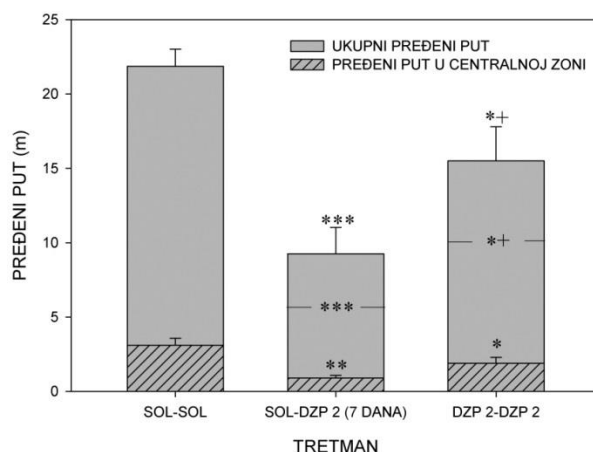


**Slika 8:** Uticaj primene rastvarača (SOL-SOL) ili diazepama 2 mg/kg nakon 14 dana ponavljane primene rastvarača (SOL-DZP 2), diazepama 0,5 mg/kg (DZP 0,5-DZP 2), diazepama 2 mg/kg (DZP 2-DZP 2) ili diazepama 10 mg/kg (DZP 10-DZP 2) na jačinu stiska. \*  $p < 0,05$  u poređenju sa SOL-SOL grupom. Broj životinja po grupi bio je između 8 i 10.

## EKSPERIMENT 1.2.

Analiza parametara motorne aktivnosti iz SLA testa nakon 7 dana ponavljane primene tretmana primenom jednofaktorskih analizi varijansi pokazala je značajan uticaj tretmana na ukupni pređeni put ( $F_{(2,25)} = 11,473$ ,  $p < 0,001$ ), put pređen u centralnoj zoni ( $F_{(2,25)} = 7,805$ ,  $p = 0,002$ ) i put pređen u perifernoj zoni aparature ( $F_{(2,25)} = 10,502$ ,  $p < 0,001$ ). Kao što je prikazano na **Slici 9**, *post hoc* SNK test je pokazao da su akutne primene diazepama 2 mg/kg kako posle 7 dana primene rastvarača (grupa SOL-DZP 2 (7 DANA)) tako i nakon ponavljane primene diazepama (grupa DZP 2-DZP 2) dovele do značajno manjeg ukupnog pređenog puta ( $p < 0,001$  i  $p = 0,017$ ), manjeg pređenog puta u centralnoj zoni ( $p = 0,002$  i  $p = 0,032$ ) i manjeg pređenog puta u perifernoj zoni ( $p < 0,001$  i  $p = 0,024$ ) u odnosu na SOL-SOL grupu. Ipak, *post hoc* testom je pokazano da je smanjenje motorne aktivnosti za grupu DZP 2-DZP 2 manje izraženo u odnosu na smanjenje aktivnosti za grupu SOL-DZP 2 (7 DANA); praćeno kroz značajno veći ukupni pređeni put i pređeni put u perifernoj zoni

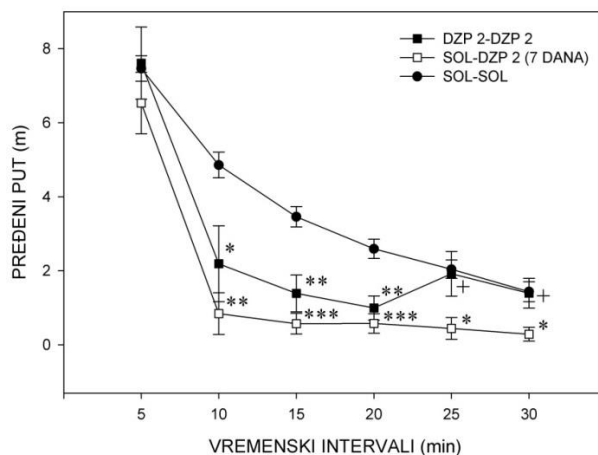
za grupu DZP 2-DZP 2 u odnosu na grupu SOL-DZP 2 (7 DANA); p vrednosti 0,026 za ukupni pređeni put i 0,030 za pređeni put u perifernoj zoni.



**Slika 9:** Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 7 dana na efekte diazepama 2 mg/kg u SLA testu. Nešrafirani deo stubića predstavlja razliku između ukupnog pređenog puta i pređenog puta u centralnoj zoni, tj. predstavlja pređeni put u perifernoj zoni. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL-SOL grupom, +  $p < 0,05$  u poređenju sa SOL-DZP 2 (7 DANA) grupom. Broj životinja po grupi bio je 10, 8 i 10 za SOL-SOL, SOL-DZP 2 (7 DANA) i DZP2-DZP2 grupu.

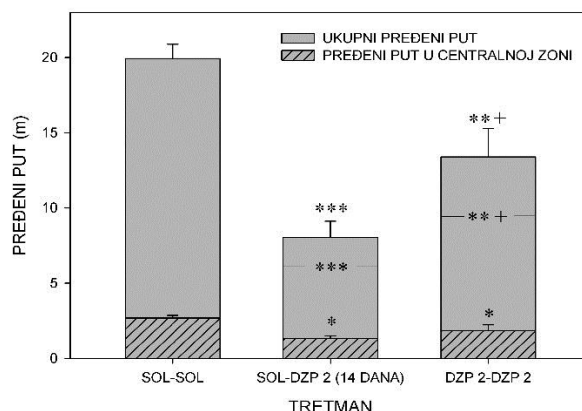
Kada se ukupni pređeni put analizira po 5-minutnim intervalima primenom dvofaktorske analize varijanse sa ponavljanim merenjima, primenjena analiza pokazuje značajan uticaj oba faktora, tretman ( $F_{(2,25)} = 11,464$ ,  $p < 0,001$ ) i vremenski interval ( $F_{(5,125)} = 75,409$ ,  $p < 0,001$ ), kao i značajnost interakcije između faktora ( $F_{(10,125)} = 2,389$ ,  $p = 0,012$ ) (Slika 10). Dalje, primena jednofaktorskih analizi varijansi za pojedinačne vremenske intervale pokazuje da je uticaj tretmana na pređeni put bio značajan od 5 min do kraja testa (5-10 min:  $F_{(2,25)} = 7,789$ ,  $p = 0,002$ ; 10-15 min:  $F_{(2,25)} = 15,466$ ,  $p < 0,001$ ; 15-20 min  $F_{(2,25)} = 13,452$ ,  $p < 0,001$ ; 20-25 min:  $F_{(2,25)} = 3,926$ ,  $p = 0,033$ ; 25-30 min:  $F_{(2,25)} = 3,984$ ,  $p = 0,034$ ). *Post hoc* analiza je pokazala da je grupa SOL-DZP 2 (7 DANA) prelazila značajno manji put počevši od 5 min do kraja testa u odnosu na SOL-SOL grupu (5-10 min:  $p = 0,002$ ; 10-15 min:  $p < 0,001$ , 15-20 min:  $p < 0,001$ , 20-25 min:  $p = 0,039$ , i 25-30 min:  $p = 0,041$ ). Za grupu DZP 2-DZP 2 je pokazano da je pređeni put između 5 min i 20 min bio značajno manji nego za SOL-SOL grupu (5-10 min:  $p = 0,016$ , 10-15 min:  $p = 0,001$ , 15-20

min:  $p = 0,001$ ), dok je pređeni put između 20 min i 30 min bio značajno veći nego za grupu SOL-DZP 2 (7 DANA) (20-25 min:  $p = 0,024$ , 25-30 min:  $0,020$ ).



**Slika 10:** Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 7 dana na pređeni put u SLA testu po 5-minutnim intervalima. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL-SOL grupom, +  $p < 0,05$  u poređenju sa SOL-DZP 2 (7 DANA) grupom

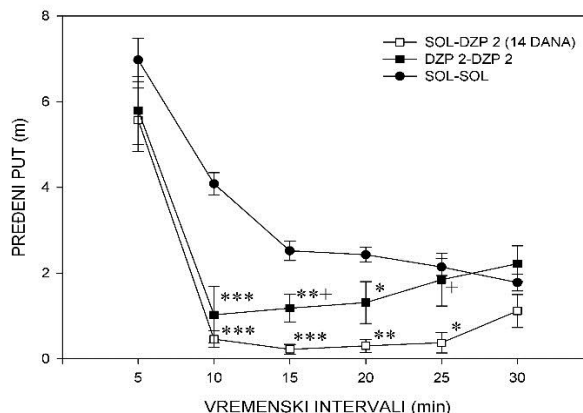
Jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj ponavljane primene tretmana u toku 14 dana na parametre motorne aktivnosti SLA testa: ukupni pređeni put ( $F_{(2,23)} = 14,576$ ,  $p < 0,001$ ), pređeni put u centralnoj zoni ( $F_{(2,23)} = 5,250$ ,  $p = 0,013$ ) i pređeni put u perifernoj zoni ( $F_{(2,23)} = 15,272$ ,  $p < 0,001$ ). Kao što je prikazano na **Slici 11**, *post hoc* SNK test je pokazao da je akutna primena diazepama 2 mg/kg nakon 14 dana primene rastvarača (SOL-DZP 2 (14 DANA) grupa), kao i nakon ponavljane primene diazepama 2 mg/kg (DZP 2-DZP 2 grupa), dovela do značajno manjeg ukupnog pređenog puta ( $p < 0,001$  i  $p = 0,003$ ), manjeg pređenog puta u centralnoj zoni ( $p = 0,014$  i  $p = 0,039$ ) i manjeg pređenog puta u perifernoj zoni ( $p < 0,001$  i  $p = 0,003$ ) u odnosu na SOL-SOL grupu. Dodatno, ukupni pređeni put i pređeni put u perifernoj zoni bili su veći za grupu DZP 2-DZP 2 u odnosu na grupu SOL-DZP 2 (14 DANA) ( $p = 0,027$  i  $p = 0,022$ , za oba parametra redom).



**Slika 11: Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 14 dana na efekte diazepamama 2 mg/kg u SLA testu. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL-SOL grupom, +  $p < 0,05$  u poređenju sa SOL-DZP 2 (7 DANA) grupom. Broj životinja po grupi bio je 10, 6, 10 za SOL-SOL, SOL-DZP 2 (7 DANA) i DZP2-DZP2 grupu.**

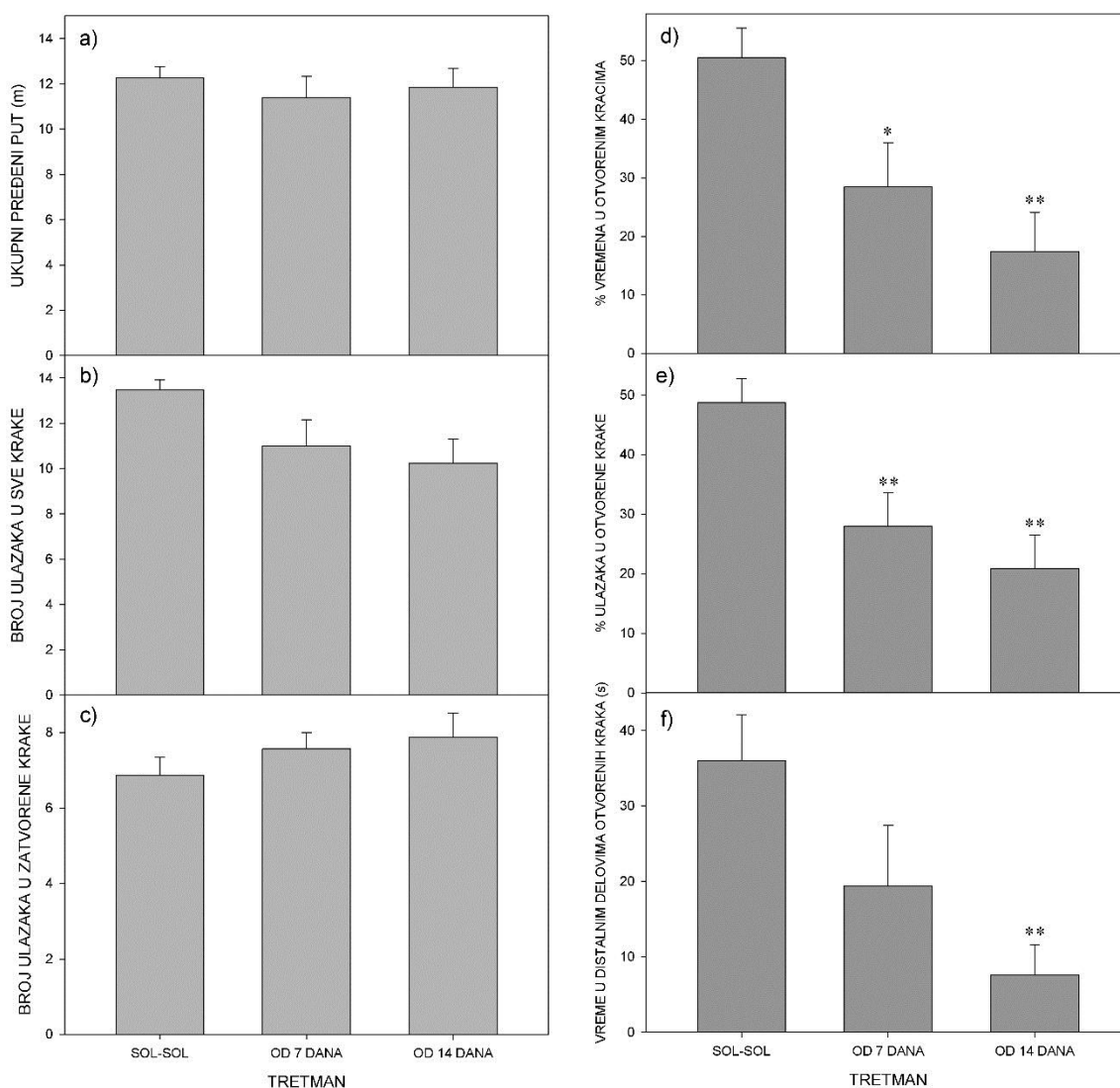
Analiza pređenog puta po 5-minutnim intervalima dvofaktorskom analizom varijanse sa ponavljanim merenjima pokazala je značajan uticaj faktora tretman ( $F_{(2,23)} = 14,572$ ,  $p < 0,001$ ) i vremenski interval ( $F_{(5,115)} = 58,500$ ,  $p < 0,001$ ), kao i interakciju između ova dva faktora ( $F_{(10,115)} = 2,703$ ,  $p = 0,005$ ) (Slika 12). Jednofaktorske analize varijansi za pojedinačne vremenske intervale pokazale su značajan uticaj tretmana na pređeni put između 5 min i 25 min (5-10 min:  $F_{(2,23)} = 16,583$ ,  $p < 0,001$ ; 10-15 min:  $F_{(2,23)} = 16,714$ ,  $p < 0,001$ ; 15-20 min:  $F_{(2,23)} = 8,183$ ,  $p = 0,002$ ; 20-25 min:  $F_{(2,23)} = 3,701$ ,  $p = 0,040$ ). *Post hoc* analizom je pokazano da je grupa SOL-DZP 2 (14 DANA) prešla značajno manji put u vremenskom periodu od 5 min do 25 min u odnosu na SOL-SOL grupu (5-10 min:  $p < 0,001$ ; 10-15 min:  $p < 0,001$ ; 15-20 min:  $p = 0,002$ , 20-25 min:  $p = 0,030$ ). Za grupu DZP 2-DZP 2 *post hoc* test je pokazao značajno manji pređeni put u odnosu na SOL-SOL grupu u periodu između 5 min i 20 min (5-10 min:  $p < 0,001$ , 10-15 min:  $p = 0,003$ , 15-20 min:  $p = 0,040$ ) i značajno veći pređeni put u odnosu na SOL-DZP 2 (14 DANA) grupu u intervalima 10-15 min ( $p = 0,023$ ) i 20-25 min ( $p = 0,032$ ).





**Slika 12:** Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 14 dana na pređeni put u SLA testu po 5-minutnim intervalima. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL-SOL grupom, +  $p < 0,05$  u poređenju sa SOL-DZP 2 (7 DANA) grupom.

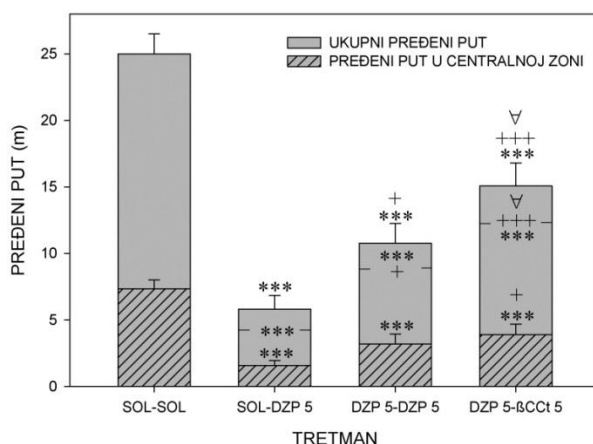
Analiza parametara povezanih sa motornom aktivnošću iz UPL, nakon obustave diazepama posle 7 i 14 dana ponavljane primene (grupe OD 7 DANA i OD 14 DANA), pokazala je značajan uticaj tretmana na ukupan broj ulazaka u sve krake ( $F_{(2,20)} = 3,550$ ,  $p = 0,048$ ); prikazano na **Slici 13**. *Post hoc* (SNK) test nije pokazao značajne razlike između pojedinačnih tretmana za ovaj parametar. Sa druge strane, pokazan je značajan uticaj tretmana na sva tri parametra povezana sa nivoom anksioznosti: procenat vremena provedenog u otvorenim kracima ( $F_{(2,20)} = 7,163$ ,  $p = 0,005$ ), procenat ulazaka u otvorene krake ( $F_{(2,20)} = 8,393$ ,  $p = 0,002$ ) i vreme provedeno u distalnim delovima otvorenih kraka ( $F_{(2,20)} = 5,794$ ,  $p = 0,010$ ); prikazano na **Slici 13, grafici od d) do f)**. *Post hoc* analiza je pokazala da je obustava diazepama nakon 7 i 14 dana ponavljane primene dovela do značajnog smanjenja procenta vremena provedenog u otvorenim kracima ( $p = 0,025$  i  $p = 0,005$ ) i procenta ulazaka u otvorene krake ( $p = 0,009$  i  $p = 0,003$ ) u odnosu na SOL-SOL grupu. Pacovi iz grupe kojoj je obustavljen diazepam posle 14 dana ponavljane primene značajno su kraće vremena proveli i u distalnim delovima otvorenih kraka u odnosu na SOL-SOL grupu ( $p = 0,009$ ).



**Slika 13: Parametri motorne aktivnosti (grafici od a do c) i parametri anksioznosti (grafici od d do f) iz testa UPL 24h nakon obustave diazepama 2 mg/kg, posle 7 i 14 dana ponavljane primene dva puta na dan. Grupe OD 7 DANA i OD 14 DANA predstavljaju grupe kojima je obustavljen diazepam posle 7 i 14 dana. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 u odnosu na SOL-SOL grupu. Broj životinja po grupi bio je 8, 7, i 8 za grupe SOL-SOL, OD 7 DANA i OD 14 DANA.**

**EKSPERIMENT 1.3.**

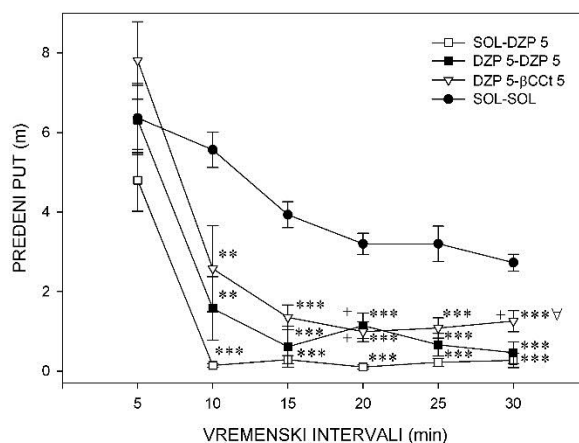
Jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj tretmana na ukupni pređeni put ( $F_{(3,26)} = 30,725$ ,  $p < 0,001$ ) u SLA testu nakon 7 dana ponavljane primene (prikazano na **Slici 14**). *Post hoc* analizom je pokazano da je ukupni pređeni put bio veoma značajno niži nakon primene diazepama 5 mg/kg posle 7 dana ponavljane primene rastvarača (grupa SOL-DZP 5), ili diazepama 5 mg/kg (grupa DZP 5-DZP 5) ili ponavljane primene diazepama 5 mg/kg i  $\beta$ CCt 5 mg/kg (grupa DZP 5- $\beta$ CCt 5) u odnosu na primenu samog rastvarača (SOL-SOL grupa);  $p < 0,001$  za sve tri grupe. Istovremeno, smanjenje ukupnog pređenog puta je bilo manje izraženo za grupe DZP 5-DZP 5 i DZP 5- $\beta$ CCt 5 u poređenju sa grupom SOL-DZP 5 ( $p = 0,024$  i  $p < 0,001$ , redom), dok je ukupni pređeni put za grupu DZP 5- $\beta$ CCt 5 bio čak veći nego pređeni put za grupu DZP 5-DZP 5 ( $p = 0,047$ ). Jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj tretmana i na parametar pređeni put u centralnoj zoni ( $F_{(3,26)} = 13,201$ ,  $p < 0,001$ ). *Post hoc* testom je pokazano da su grupe SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5 i DZP 5- $\beta$ CCt 5 prešle značajno manji put u centralnoj zoni u poređenju sa SOL-SOL grupom ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  i  $p < 0,001$ , redom). Pređeni put u centralnoj zoni nakon primene diazepama 5 mg/kg bio je značajno veći za grupu DZP 5- $\beta$ CCt 5 nego za grupu SOL-DZP 5 ( $p = 0,041$ ). Ponavljana primena tretmana u toku 7 dana je pokazala značajan uticaj na pređeni put u perifernoj zoni SLA testa ( $F_{(3,26)} = 30,369$ ,  $p < 0,001$ ). Kao i za parametar ukupni pređeni put, SNK test je pokazao veoma značajno smanjenje pređenog puta u perifernoj zoni ( $p < 0,001$ ) nakon primene diazepama 5 mg/kg za sve tri grupe (SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5 i DZP 5- $\beta$ CCt 5) u odnosu na SOL-SOL grupu. Ipak, pređeni put u perifernoj zoni je bio veći nakon primene diazepama grupama DZP 5-DZP 5 i DZP 5- $\beta$ CCt 5 nego grupi SOL-DZP 5 ( $p = 0,031$ ,  $p < 0,001$ ), dok je pređeni put u perifernoj zoni za grupu DZP 5- $\beta$ CCt 5 bio veći nego za DZP 5-DZP 5 grupu ( $p = 0,022$ ).



**Slika 14:** Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 7 dana na efekte diazepama 5 mg/kg u SLA testu. Nešrafirani deo stubića predstavlja razliku između ukupnog pređenog puta i pređenog puta u centralnoj zoni, tj. pređeni put u perifernoj zoni SLA kaveza. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na SOL-SOL grupu, +  $p < 0,05$ , +++  $p < 0,001$  u odnosu na SOL-DZP 5 grupu, ∇  $p < 0,05$  u odnosu na DZP 5-DZP 5 grupu. Broj životinja po grupi bio je 7, 8, 7 i 8 za grupe SOL-SOL, SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5 i DZP 5-βCCt 5.

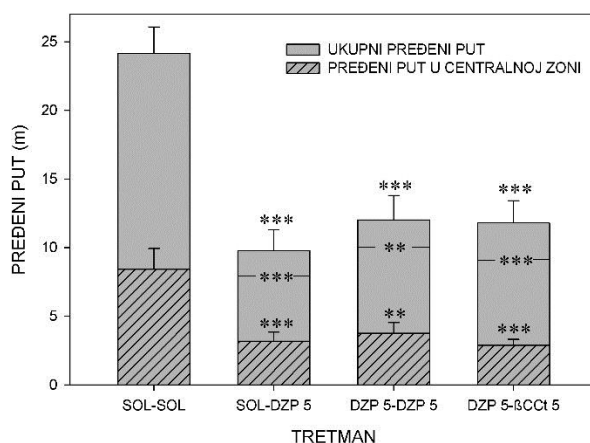
Analiza pređenog puta po 5-minutnim intervalima pokazala je značajan uticaj faktora tretman ( $F_{(3,26)} = 30,679$ ,  $p < 0,001$ ), vremenski interval ( $F_{(5,130)} = 63,836$ ,  $p < 0,001$ ) i interakcije između faktora ( $F_{(15,130)} = 2,493$ ,  $p = 0,003$ ) na praćeni parametar. Kada se primenom jednofaktorskih analiza varijansi ispita uticaj tretmana na pređeni put po pojedinačnim intervalima, pokaže se značajan uticaj tretmana na pređeni put od 5 min do kraja testa (5-10 min:  $F_{(3,26)} = 11,309$ ,  $p < 0,001$ ; 10-15 min:  $F_{(3,26)} = 23,380$ ,  $p < 0,001$ ; 15-20 min:  $F_{(3,26)} = 29,631$ ,  $p < 0,001$ ; 20-25 min:  $F_{(3,26)} = 20,810$ ,  $p < 0,001$ ; 25-30 min:  $F_{(3,26)} = 21,858$ ,  $p < 0,001$ ); prikazano na **Slici 15**. *Post hoc* testom je pokazano da primena diazepama 5 mg/kg dovodi do značajnog smanjenja pređenog puta u vremenskim intervalima od 5 min do 30 min za sve tri grupe (SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5 i DZP 5-βCCt 5) u poređenju sa primenom rastvarača (SOL-SOL grupa) (5-10 min:  $p < 0,001$ , 0,001 i 0,004 za navedene grupe redom;  $p$  vrednosti za sve grupe od 10 min do 30 min bile su  $< 0,001$ ). Pređeni put za grupu DZP 5-DZP 5 bio je veći u odnosu na pređeni put za grupu SOL-DZP 5 u periodu između 15 i 20 min ( $p = 0,013$ ). Dodatno, pređeni put za grupu DZP 5-βCCt 5 bio je veći od pređenog puta grupe SOL-DZP 5 u periodima 15-20 min i 25-30

min ( $p = 0,011$  i  $p = 0,013$ ), dok je u periodu 25-30 min pređeni put bio veći i od pređenog puta grupe DZP 5-DZP 5 ( $p = 0,024$ ).



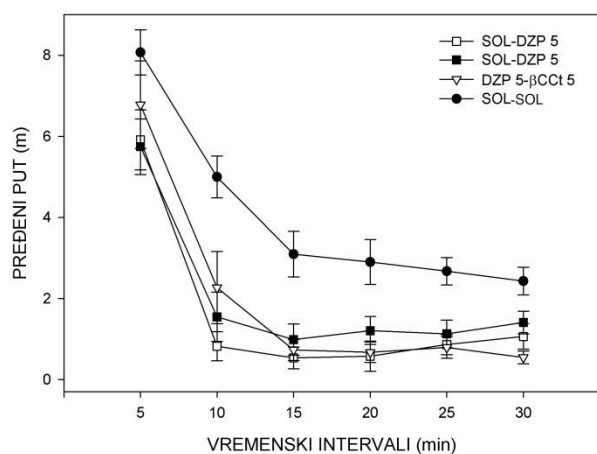
**Slika 15:** Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 7 dana na pređeni put u SLA testu po 5-minutnim intervalima. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na SOL-SOL grupu, +  $p < 0,05$  u odnosu na SOL-DZP 5 grupu, ∇  $p < 0,05$  u odnosu na DZP 5-DZP 5 grupu.

Analiza parametara SLA testa nakon 14 dana ponavljane primene tretmana pokazala je značajan uticaj tretmana na ukupni pređeni put ( $F_{(3,28)} = 13,435$ ,  $p < 0,001$ ), pređeni put u centralnoj zoni ( $F_{(3,28)} = 8,441$ ,  $p < 0,001$ ) i pređeni put u perifernoj zoni ( $F_{(3,28)} = 8,997$ ,  $p < 0,001$ ). Kao što je prikazano na **Slici 16**, *post hoc* testom je pokazano da primena diazepama u dozi 5 mg/kg nakon ponavljane primene rastvarača (SOL-DZP 5), ili diazepama (DZP 5-DZP 5) ili diazepama 5 mg/kg i βCCt-a 5 mg/kg (DZP 5-βCCt 5) dovodi do veoma značajnog smanjenja ukupnog pređenog puta u odnosu na primenu rastvarača SOL-SOL grupi ( $p < 0,001$  za sve tri grupe). SNK test je pokazao veoma značajno smanjenje pređenog puta u centralnoj i perifernoj zoni za grupe SOL-DZP 5 i DZP 5-βCCt 5 u odnosu na grupu SOL-SOL ( $p < 0,001$ ) i značajno smanjenje pređenog puta u centralnoj i perifernoj zoni za grupu DZP 5-DZP 5 u odnosu na SOL-SOL grupu ( $p = 0,001$  i  $p = 0,002$ ).



**Slika 16:** Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 14 dana na efekte diazepama 5 mg/kg u testu SLA. Nešrafirani deo stubića predstavlja razliku između ukupnog pređenog puta i pređenog puta u centralnoj zoni, tj. pređeni put u perifernoj zoni SLA kaveza. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na SOL-SOL grupu. Broj pacova po grupi bio je 7, 8, 7 i 10 za grupe SOL-SOL, SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5 i DZP 5-βCCt 5.

Analiza pređenog puta po 5-minutnim intervalima, primenom dvofaktorske ANOVA-e sa ponavljanim merenjima, pokazala je značajan uticaj faktora tretman ( $F_{(3,28)} = 13,451$ ,  $p < 0,001$ ) i faktora vremenski interval ( $F_{(5,140)} = 74,942$ ,  $p < 0,001$ ), ali nije pokazala značajnu interakciju između ova dva faktora ( $F_{(15,140)} = 1,051$ ,  $p = 0,408$ ); prikazano na **Slici 17**. Dakle, s obzirom da uticaj tretmana ne zavisi od vremenskog intervala koji se analizira, *post hoc* SNK test je pokazao da primena diazepama 5 mg/kg dovodi do veoma značajnog smanjenja pređenog puta za grupe SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5 i DZP 5-βCCt 5 u odnosu na SOL-SOL grupu ( $p < 0,001$ ).



**Slika 17: Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 14 dana na pređeni put u SLA testu po 5-minutnim intervalima.**

Po završetku bihevioralnih testiranja, određene su koncentracije  $\beta$ CCt-a i diazepam u plazmi i mozgu. Koncentracije  $\beta$ CCt-a u plazmi i mozgu 16 h nakon poslednje primene  $\beta$ CCt-a bile su opsegu desetina nmol/l, što je istovremeno preko 12 puta niže u odnosu na koncentracije ovog liganda 20 min nakon primene; koncentracije liganada prikazane su u **Tabeli 11**. Koncentracije diazepam određene kod istih životinja (s tim što je diazepam u dozi 5 mg/kg bio primenjen pre testiranja u SLA, između 38 min i 70 min pre žrtvovanja) dostigle su mikromolarne nivoe (**Tabela 11**).

**Tabela 11: Prikaz koncentracija  $\beta$ CCt-a i diazepam u mozgu i plazmi određenih u različitim vremenskim tačkama nakon ponavljane primene tretmana u toku 14 dana**

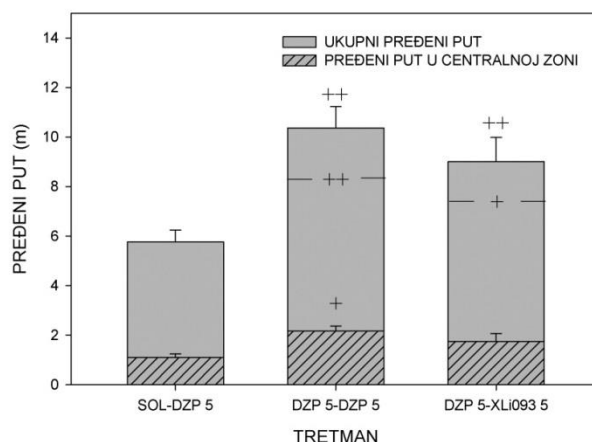
Određivani ligand	$\beta$ CCt		diazepam
	20 min	16 h	38 – 70 min
Koncentracija u mozgu (nmol/kg)	698,37±281,49	56,83±17,66	3040,87±843,24
Koncentracija u plazmi (nmol/kg)	370,58±170,30	11,52±2,58	1309,91±554,76

**EKSPERIMENT 1.4.**

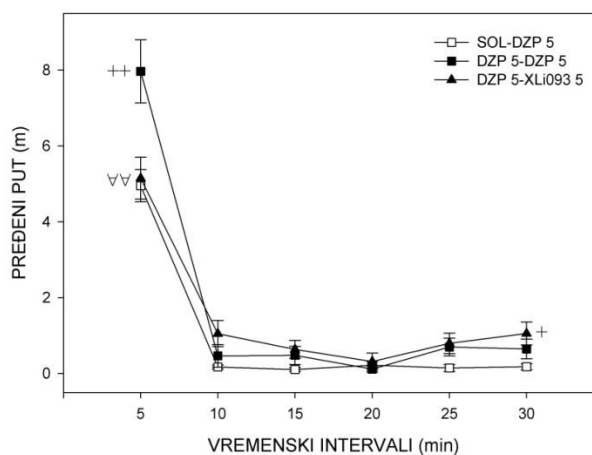
S obzirom da je u EKSPERIMENTU 1.3 primenom istog dizajna eksperimenta pokazano da primena diazepama u dozi 5 mg/kg nakon sedam dana primene rastvarača dovodi do izraženog sedativnog efekta u testu SLA, u prezentovanom eksperimentu kao pozitivna kontrolna grupa korišćena je SOL–DZP 5 grupa, odnosno u analizu parametara SLA nije uključena SOL–SOL grupa. Primenom jednofaktorskih analizi varijansi pokazan je značajan uticaj tretmana nakon 7 dana ponavljane primene na parametre motorne aktivnosti SLA testa: ukupni pređeni put ( $F_{(2,24)} = 8,729$ ,  $p = 0,001$ ), pređeni put u centralnoj zoni ( $F_{(2,24)} = 5,183$ ,  $p = 0,013$ ) i pređeni put u perifernoj zoni ( $F_{(2,24)} = 7,788$ ,  $p = 0,002$ ); prikazano na **Slici 18**. *Post hoc* SNK test je pokazao da je sedativni efekat diazepama 5 mg/kg praćen kroz parametre ukupni pređeni put i pređeni put u perifernoj zoni bio značajno slabije izražen za grupe DZP 5-DZP 5 i DZP 5-XLi093 5 u odnosu na grupu SOL-DZP 5;  $p$  vrednosti za parametre ukupni pređeni put i pređeni put u perifernoj zoni u odnosu na SOL-DZP 5 za grupu DZP 5-DZP 5 su 0,001 i 0,002, a  $p$  vrednosti za grupu DZP 5-XLi093 5 su 0,009 i 0,010. Dodatno, pređeni put u centralnoj zoni bio je veći nakon primene diazepama 5 mg/kg grupi DZP 5- DZP 5 nego grupi SOL- DZP 5 ( $p = 0,010$ ).

Analiza pređenog puta po 5-minutnim intervalima nakon 7 dana ponavljane primene tretmana pokazala je značajan uticaj faktora tretman ( $F_{(2,24)} = 8,739$ ,  $p = 0,001$ ) vremenski interval ( $F_{(5,120)} = 149,813$ ,  $p < 0,001$ ) i interakciju između faktora ( $F_{(10,120)} = 4,870$ ,  $p < 0,001$ ); **Slika 19**. Dalje je primenom jednofaktorskih analiza varijansi pokazan značajan uticaj tretmana na pređeni put u prvih 5 min testa (0-5 min:  $F_{(2,24)} = 7,224$ ,  $p = 0,004$ ) i poslednjih 5 min testa (25-30min:  $F_{(2,24)} = 3,515$ ,  $p = 0,046$ ). SNK test je pokazao da su životinje iz grupe DZP 5-DZP 5 u toku prvih 5 min testa prešle značajno veći put od životinja iz grupe SOL-DZP 5 ( $p = 0,007$ ), kao i da je put koji su prešle životinje iz grupe DZP 5-XLi093 5 bio značajno niži nego za životinje iz grupe DZP 5-DZP 5 ( $p = 0,004$ ). U poslednjih 5 min testa pokazano je da je pređeni put za grupu DZP 5-XLi093 bio značajno veći nego za grupu SOL-DZP 5 ( $p = 0,036$ ).





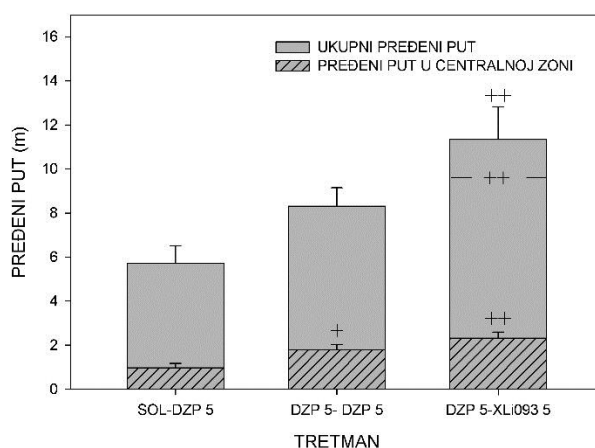
**Slika 18:** Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 7 dana na efekte diazepama 5 mg/kg u testu SLA. Nešrafirani deo stubića predstavlja razliku između ukupnog pređenog puta i pređenog puta u centralnoj zoni, tj. pređeni put u perifernoj zoni SLA kaveza. +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$  u odnosu na SOL-DZP 5 grupu. Broj pacova po grupi bio je 9.



**Slika 19:** Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 7 dana na pređeni put po 5-minutnim intervalima u SLA testu. +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$  u odnosu na SOL-DZP 5 grupu,  $\forall\forall$   $p < 0,01$  u odnosu na DZP 5-DZP 5 grupu.

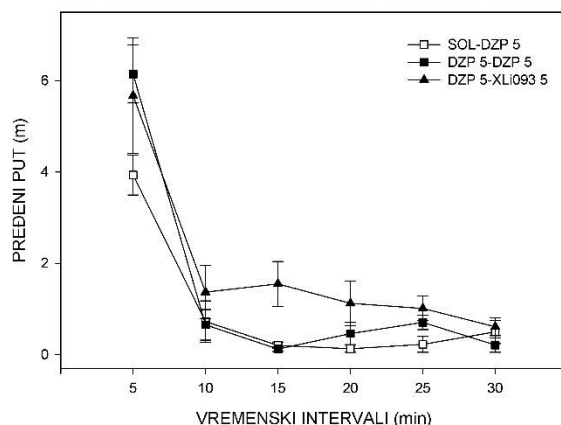
Analiza rezultata SLA testa nakon 14 dana ponavljane primene tretmana, primenom jednofaktorskih analizi varijansi, pokazala je značajan uticaj tretmana na parametre: ukupni pređeni put ( $F_{(2,24)} = 6,811$ ,  $p = 0,005$ ), pređeni put u centralnoj zoni ( $F_{(2,24)} = 8,084$ ,  $p =$

0,002) i pređeni put u perifernoj zoni ( $F_{(2,24)} = 5,630$ ,  $p = 0,010$ ). Kao što je prikazano na **Slici 20**, *post hoc* analiza je pokazala da su ukupni pređeni put i pređeni put u perifernoj zoni značajno veći za grupu DZP 5-XLi093 5 u odnosu na grupu SOL-DZP 5 ( $p = 0,003$  i  $p = 0,008$ , redom). Pređeni put u centralnoj zoni bio je značajno veći za grupe DZP 5-DZP 5 i DZP 5-XLi093 5 nego za SOL-DZP 5 grupu ( $p = 0,024$  i  $p = 0,002$ ).



**Slika 20:** Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 14 dana na efekte diazepama 5 mg/kg u SLA testu. Nešrafirani deo stubića predstavlja razliku između ukupnog pređenog puta i pređenog puta u centralnoj zoni, tj. pređeni put u perifernoj zoni. +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$  u odnosu na SOL-DZP 5 grupu. Broj životinja po grupi bio je 9.

Dvofaktorskom analizom varijanse pokazan je značajan uticaj tretmana ( $F_{(2,24)} = 6,790$ ,  $p = 0,005$ ) i vremenskog intervala ( $F_{(5,120)} = 52,232$ ,  $p < 0,001$ ), ali ne i interakcije između faktora ( $F_{(10,120)} = 1,258$ ,  $p = 0,262$ ) na pređeni put analiziran po 5-minutnim intervalima nakon 14 dana ponavljane primene tretmana (**Slika 21**). *Post hoc* analiza je pokazala da je nezavisno od analiziranog intervala pređeni put bio veći za grupu DZP 5-XLi093 5 u odnosu na grupu SOL-DZP 5 ( $p = 0,001$ ).



**Slika 21: Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 14 dana na pređeni put po 5-minutnim intervalima u SLA testu nakon primene diazepama 5 mg/kg.**

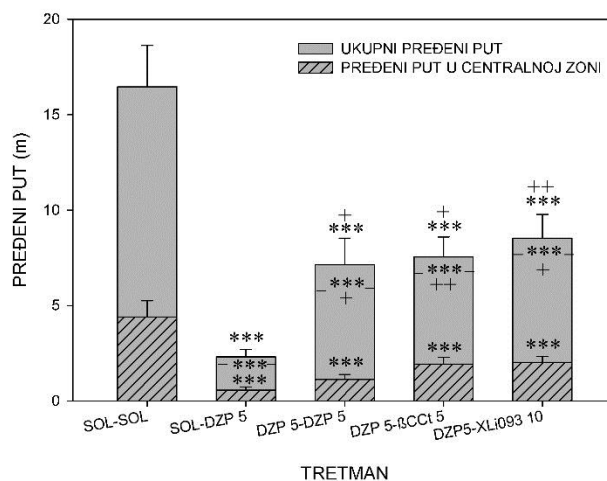
Analiza parametara iz testa UPL sprovedenog 48 h nakon obustave tretmana posle 14 dana ponavljane primene nije pokazala značajan uticaj tretmana na praćene parametre motorne aktivnosti ili anksioznosti, što je prikazano u **Tabeli 12**.

**Tabela 12: Uticaj obustave ponavljane primene tretmana u toku 14 dana (SOL-SOL, DZP 5-DZP 5 i DZP 5-XLi093 5) na parametre povezane sa motornom aktivnošću i parametre anksioznosti u testu UPL. Tabela prikazuje rezultate jednofaktorskih analiza varijansi.**

PARAMETAR	Parametri motorne aktivnosti			Parametri anksioznosti		
	Ukupan pređeni put	Broj ulazaka u sve krake	Broj ulazaka u zatvorene krake	% vremena u otvorenim kracima	% ulazaka u otvorene krake	Vreme u distalnim delovima otvorenih kraka
$F_{(2,17)}$	2,1683	0,1740	0,6752	0,4751	0,2126	0,9758
p	0,145	0,842	0,522	0,630	0,811	0,397

**EKSPERIMENT 1.5**

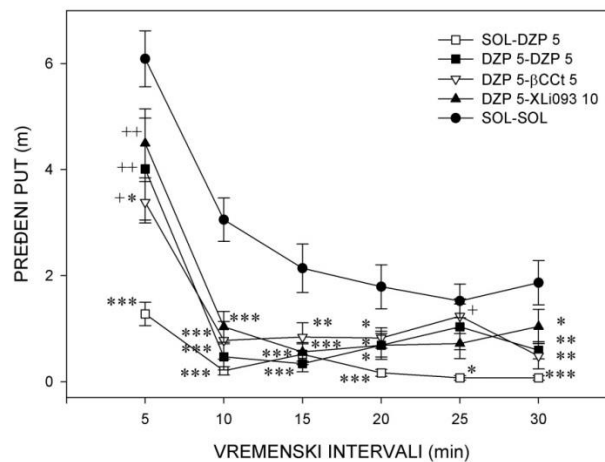
Primena jednofaktorskih analizi varijansi pokazala je veoma značajan uticaj ponavljane primene tretmana u toku 3 dana na parametre motorne aktivnosti iz SLA testa, i to na ukupni pređeni put ( $F_{(4,59)} = 14,024$ ,  $p < 0,001$ ), pređeni put u centralnoj zoni ( $F_{(4,53)} = 10,805$ ,  $p < 0,001$ ) i pređeni put u perifernoj zoni ( $F_{(4,53)} = 13,229$ ,  $p < 0,001$ ). *Post hoc* SNK test pokazao je da primena diazepamom u dozi 5 mg/kg pre testiranja u SLA dovodi do veoma značajnog smanjenja ukupnog pređenog puta, pređenog puta u centralnoj i perifernoj zoni, bez obzira na prethodno primenjivan tretman tokom prvih 3 dana. Naime, poređenjem vrednosti ovih parametara za grupe SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5, DZP 5- $\beta$ CCt 5 i DZP 5-XLi093 10 sa vrednostima za SOL-SOL grupu, *post hoc* test je pokazao p vrednosti manje od 0,001 za sve grupe i sva tri parametra; **Slika 22**. S druge strane, smanjenje ukupnog pređenog puta i pređenog puta u perifernoj zoni bilo je značajno slabije izraženo za grupe koje su ponavljano tretirane diazepamom, bilo uz rastvarač,  $\beta$ CCt ili XLi093, u poređenju sa vrednostima nakon akutne primene diazepamom, posle tri dana ponavljane primene rastvarača (ukupni pređeni put  $p = 0,013$  za DZP 5-DZP 5 grupu,  $p = 0,023$  za DZP 5- $\beta$ CCt 5 grupu, i  $p = 0,009$  za DZP 5-XLi093 10 grupu u poređenju sa SOL-DZP 5 grupom; pređeni put u perifernoj zoni:  $p = 0,010$  za DZP 5-DZP 5 grupu,  $p = 0,009$  za DZP 5- $\beta$ CCt 5 grupu, i  $p = 0,011$  za DZP 5-XLi093 10 grupu u poređenju sa SOL-DZP 5 grupom). U pogledu na parametar pređeni put u centralnoj zoni *post hoc* testom nisu pokazane razlike između grupa ponavljano tretiranih diazepamom (DZP 5-DZP 5, DZP 5- $\beta$ CCt 5, DZP 5-XLi093 10) i grupe SOL-DZP 5.



**Slika 22: Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 3 dana na efekte diazepama 5 mg/kg u SLA testu. Nešrafirani deo stubića predstavlja razliku između ukupnog pređenog puta (visina stubića) i pređenog puta u centralnoj zoni (šrafirani deo stubića), tj. pređeni put u perifernoj zoni. \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL-SOL grupom; +  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,001$  u odnosu na SOL-DZP 5 grupu. Broj životinja po grupi bio je 11 za SOL-SOL grupu i 14 za ostale grupe.**

Analiza pređenog puta po 5-minutnim intervalima, nakon 3 dana ponavljane primene tretmana, primenom dvofaktorske analize varijanse pokazala je značajan uticaj faktora tretman ( $F_{(4,53)} = 14,094$ ,  $p < 0,001$ ), faktora vremenski interval ( $F_{(5,265)} = 79,263$ ,  $p < 0,001$ ) i interakcije između faktora ( $F_{(20,265)} = 3,634$ ,  $p < 0,001$ ) na pređeni put (**Slika 23**). Dalje je primena jednofaktorskih analizi varijansi za pojedinačne vremenske intervale pokazala da je uticaj tretmana bio značajan za svih šest 5-minutnih intervala (0-5 min:  $F_{(4,53)} = 8,137$ ,  $p < 0,001$ ; 5-10 min:  $F_{(4,53)} = 14,573$ ,  $p < 0,001$ ; 10-15 min:  $F_{(4,53)} = 7,331$ ,  $p < 0,001$ ; 15-20 min:  $F_{(4,53)} = 5,347$ ,  $p = 0,001$ ; 20-25 min:  $F_{(4,53)} = 3,264$ ,  $p = 0,018$ ; 25-30 min:  $F_{(4,53)} = 6,528$ ,  $p < 0,001$ ). *Post hoc* analiza je potvrdila da je smanjenje pređenog puta izazvano primenom diazepama 5 mg/kg u toku prvih 5 min bilo skoro značajno za grupe DZP 5-DZP 5 i DZP 5-XLi093 10 ( $p = 0,073$  i  $p = 0,054$  u poređenju sa SOL-SOL grupom), a da je dostiglo statističku značajnost za grupu DZP 5-βCCt 5 ( $p = 0,019$ ), dok je za grupu SOL-DZP 5 smanjenje pređenog puta bilo visoko značajno u poređenju sa SOL-SOL grupom,  $p < 0,001$ . Ovako značajno smanjenje puta za grupu SOL-DZP 5 bilo je statistički izraženije nego umereno smanjenje pređenog puta za grupe DZP 5-DZP 5, DZP 5-βCCt 5 i DZP 5-XLi093 10 ( $p = 0,006$ ,  $p = 0,019$  i  $p = 0,002$ , za tri grupe redom). U

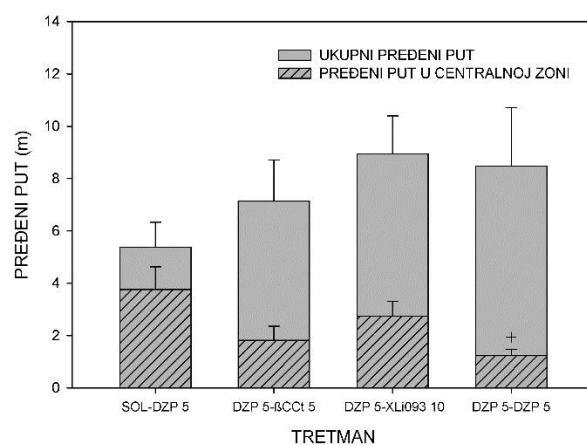
drugom i trećem vremenskom intervalu pokazan je veoma značajan uticaj primene 5 mg/kg diazepama na pređeni put bez obzira na ponavljani tretman koji je primenjivan: (5-10 min:  $p < 0,001$  za SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5, DZP 5- $\beta$ CCt 5 i DZP 5-XLi093 10 u poređenju sa SOL-SOL grupom; 10-15 min:  $p < 0,001$  za SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5 i DZP 5-XLi093 10 i  $p = 0,001$  DZP 5- $\beta$ CCt 5 u poređenju sa SOL-SOL grupom). U periodu između 15-20 min, uticaj primene diazepama na pređeni put bio je značajan, a delimično je zavisio od tretmana koji je prethodno primenjivan u toku 3 dana, što se vidi kroz p vrednosti koje su prema SNK testu bile:  $p < 0,001$  za SOL-DZP 5 grupu,  $p = 0,010$  za DZP 5-DZP 5 grupu,  $p = 0,011$  za DZP 5- $\beta$ CCt 5 grupu i  $p = 0,017$  za DZP 5-XLi093 10 grupu u poređenju sa SOL-SOL grupom. U periodu između 20 i 25 min jedino je akutna primena diazepama dovela do značajnog smanjenja pređenog puta ( $p = 0,014$  u poređenju sa SOL-SOL grupom) i taj efekat je bio izraženiji nego za grupu DZP 5- $\beta$ CCt 5 ( $p = 0,049$  u poređenju sa SOL-DZP 5 grupom). U poslednjem 5-minutnim intervalu smanjenje pređenog puta usled primene 5 mg/kg diazepama bilo je značajno za sve grupe:  $p < 0,001$  za SOL-DZP 5 grupu,  $p = 0,004$  za DZP 5-DZP 5 grupu,  $p = 0,004$  za DZP 5- $\beta$ CCt 5 grupu i  $p = 0,033$  za DZP 5-XLi093 10 grupu, u poređenju sa SOL-SOL grupom.



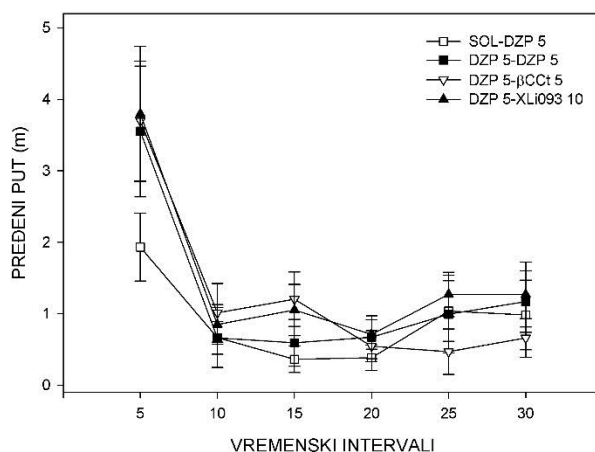
**Slika 23: Uticaj ponavljane primene tretmana (rastvarač, diazepam 5 mg/kg, diazepam 5 mg/kg i  $\beta$ CCt 5 mg/kg ili diazepam 5 mg/kg i XLi093 10 mg/kg) u toku 3 dana na pređeni put po 5-minutnim intervalima u SLA testu nakon primene diazepama 5mg/kg. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL-SOL grupom; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , u poređenju sa SOL-DZP 5 grupom.**

U analizu parametara SLA testa nakon 7 dana ponavljane primene tretmana uključene su grupe SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5, DZP 5- $\beta$ CCt 5 i DZP 5-XLi093 10 (prikazano na **Slici 24**). Jednofaktorske analize varijansi su pokazale izostanak uticaja ponavljane primene tretmana na ukupni pređeni put ( $F_{(3,36)} = 0,960$ ,  $p = 0,422$ ) i pređeni put u perifernoj zoni ( $F_{(3,36)} = 0,799$ ,  $p = 0,503$ ). S druge strane, uticaj tretmana na pređeni put u centralnoj zoni dostigao je statističku značajnost ( $F_{(3,36)} = 3,326$ ,  $p = 0,032$ ). *Post hoc* analiza je pokazala da primena diazepama u dozi 5 mg/kg nakon 7 dana ponavljane primene diazepama u istoj dozi dovodi do značajnog smanjenja pređenog puta u centralnoj zoni u odnosu na grupu SOL-DZP 5 ( $p = 0,032$ ).

Analiza pređenog puta po 5-minutnim intervalima nakon 7 dana ponavljane primene tretmana pokazala je jedino značajan uticaj vremenskog intervala ( $F_{(5,180)} = 22,621$ ,  $p < 0,001$ ) na pređeni put, dok je izostao uticaj tretmana ( $F_{(3,36)} = 0,800$ ,  $p = 0,502$ ) i uticaj interakcije ( $F_{(15,180)} = 0,863$ ,  $p = 0,603$ ) između ova dva faktora (**Slika 25**). *Post hoc* analiza je potvrdila da je pređeni put u prvih 5 min bio veoma značajno veći ( $p < 0,001$ ) nego u ostalim vremenskim intervalima.



**Slika 24:** Uticaj ponavljane primene tretmana u toku 7 dana na efekte diazepama 5 mg/kg u SLA testu. Nešrafirani deo stubića predstavlja razliku između ukupnog pređenog puta (visina stubića) i pređenog puta u centralnoj zoni (šrafirani deo stubića), tj. pređeni put u perifernoj zoni. +  $p < 0,05$  u odnosu na SOL-DZP 5 grupu. Broj životinja po grupi bio je 9, 11, 11 i 10 za SOL-DZP 5, DZP 5- $\beta$ CCt 5, DZP 5-XLi093 10 i DZP 5-DZP 5 grupe.



**Slika 25:** Uticaj ponavljane primene tretmana (rastvarač, diazepam 5 mg/kg, diazepam 5 mg/kg i βCCt 5 mg/kg ili diazepam 5 mg/kg i XLi093 10 mg/kg) u toku 7 dana na pređeni put po 5-minutnim intervalima u SLA testu nakon primene diazepam 5 mg/kg.

Analiza rezultata testa UPL, rađenog 48 h nakon poslednje primene tretmana i testiranja u SLA testu, pokazala je značajan uticaj tretmana jedino na parametar broj ulazaka u zatvorene krake ( $F_{(3,27)} = 4,923$ ,  $p = 0,007$ ), dok uticaj tretmana na preostale parametre motorne aktivnosti i parametre anksioznosti nije bio značajan; F i p vrednosti su prikazane u **Tabeli 13**. *Post hoc* testom je pokazano da je obustava primene diazepam (grupa DZP 5-DZP 5) dovela do značajno manjeg broja ulazaka u zatvorene krake u odnosu na grupu SOL-DZP 5 ( $p = 0,004$ ).

**Tabela 13:** Obustava ponavljane primene tretmana 7 dana za grupe: SOL-DZP 5, DZP 5-DZP 5, DZP 5-βCCt 5, DZP 5-XLi093 10. Rezultati jednofaktorskih analizi varijansi za parametre povezane sa motornom aktivnošću i parametre povezane sa anksioznošću u UPL testu.

PARAMETAR	Parametri motorne aktivnosti			Parametri anksioznosti		
	Ukupan pređeni put	Broj ulazaka u sve krake	Broj ulazaka u zatvorene krake	% vremena u otvorenim kracima	% ulazaka u otvorene krake	Vreme u distalnim delovima otvorenih kraka
$F_{(3,27)}$	2,867	1,070	4,913	1,871	0,908	0,524
p	0,055	0,378	0,007	0,158	0,450	0,450



### EKSPERIMENTI 2.1 I 2.2

#### 2.1.1. Ispitivanje uticaja obustave ponavljane primene diazepama iz EKSPERIMENTA 2.1 i EKSPERIMENTA 2.2.

Rezultati testa UPL za kontrolnu grupu i grupu kojoj je obustavljen diazepam posle 21 dana ponavljane primene (OD grupa) iz EKSPERIMENTA 2.1 upoređeni su sa rezultatima za ove dve grupe iz EKSPERIMENTA 2.2 u cilju validacije primenjenog protokola. Rezultati dvofaktorskih analizi varijansi ( $F_{(1,25)}$  i p vrednosti) za parametre povezane sa motornom aktivnošću i parametre anksioznosti nalaze se u **Tabeli 14**. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajan uticaj faktora tretman na procenat vremena provedenog u otvorenim kracima ( $p = 0,023$ ). S obzirom da uticaj eksperimentalnih uslova, kao drugog faktora, ni interakcija između faktora nisu bili značajni, ovakav nalaz ukazuje da obustava ponavljane primene 2 mg/kg diazepama dovodi do značajnijeg anksioznog efekta u odnosu na kontrolnu grupu u oba eksperimenta. Istovremeno, smanjenje procenta ulazaka u otvorene krake lavirinta i smanjenje vremena provedenog u distalnim delovima otvorenih kraka za grupe kojima je obustavljen diazepam u poređenju sa kontrolnim grupama bilo je blizu statističkih značajnosti ( $p = 0,085$  i  $p = 0,052$ , redom). Dvofaktorska ANOVA je pokazala da je obustava diazepama dovela do skoro značajnog povećanja vremena provedenog u ponašanju povezanim sa procenom rizika u odnosu na kontrolnu grupu ( $p = 0,075$ ). Uticaj obustave tretmana, eksperimentalnih uslova ili interakcija između ovih faktora nisu bili značajni ni za jedan od praćenih parametara povezanih sa motornom aktivnošću u UPL (**Tabela 14**).

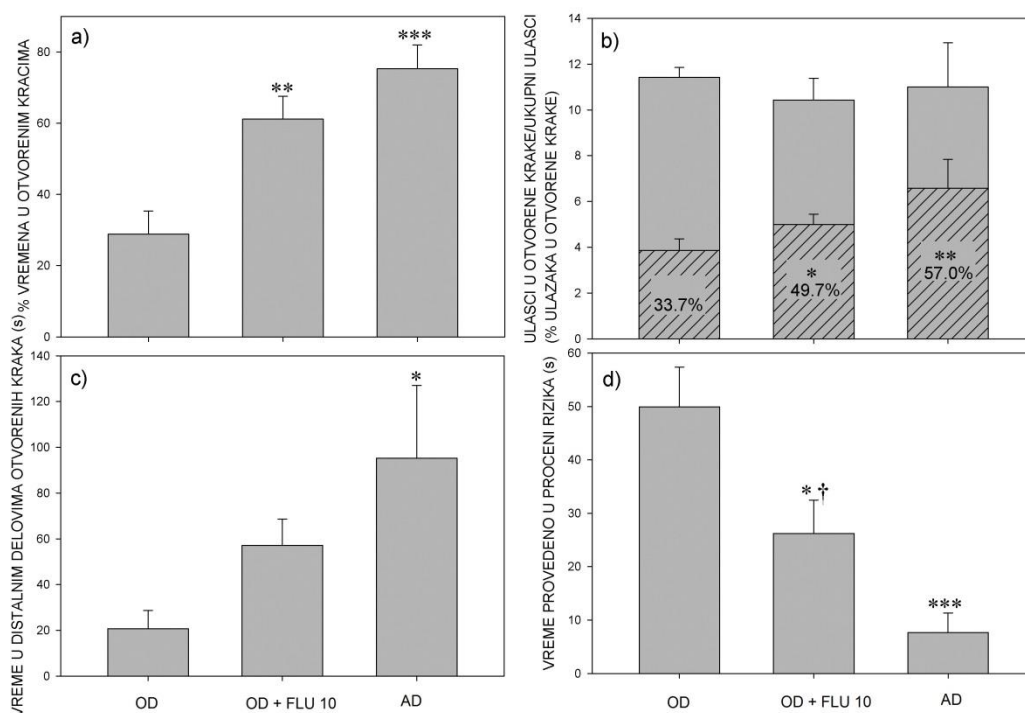
**Tabela 14: Efekti obustave ponavljane primene diazepama (OD) na ponašanje pacova u UPL i dvofaktorska analiza rezultata. Faktor tretman je uključio kontrolnu grupu i OD grupu, a faktor eksperiment: EKSPERIMENT 2.1. i EKSPERIMENT 2.2. Broj životinja po grupi bio je između 6 i 8.**

Parametar	EKSPERIMENT 2.1		EKSPERIMENT 2.2		Dvofaktorska ANOVA					
	KONTROLA	OD	KONTROLA	OD	Tretman		Eksperiment		Interakcija	
					F	p	F	p	F	P
% vremena u otvorenim kracima	43,50±3,34	28,86±6,48	46,67±8,16	31,25±6,70	5,85	0,023	0,20	0,659	0,01	0,951
% ulazaka u otvorene krake	41,63±2,58	33,71±4,47	37,00±5,20	34,25±3,56	1,86	0,085	0,27	0,606	0,44	0,516
Vreme u distalnim delovima otvorenih kraka (s)	36,49±3,24	20,67±8,00	38,43±8,75	24,60±8,26	4,18	0,052	0,16	0,689	0,02	0,899
Vreme provedeno u proceni rizika (s)	33,50±6,70	49,91±7,43	39,78±13,70	62,05±12,61	3,45	0,075	0,78	0,385	0,08	0,781
Ukupni pređeni put (m)	10,31±0,86	9,56±0,51	9,65±0,65	9,26±0,52	0,71	0,407	0,51	0,480	0,07	0,781
Ukupan broj ulazaka u krake	12,88±0,95	11,43±0,43	11,50±0,85	10,88±0,72	1,75	0,197	1,52	0,228	0,28	0,604
Ulasci u zatvorene krake	7,50±0,63	7,57±0,57	7,17±0,60	7,25±0,80	0,01	0,910	0,23	0,633	0,01	0,933

### 2.1.2. Ispitivanje uticaja akutne primene flumazenila na ispoljavanje anksioznosti u UPL nakon obustave tretmana (EKSPERIMENT 2.1)

Primenom jednofaktorskih analizi varijansi ispitan je uticaj obustave ponavljane primene 2 mg/kg diazepama, primene 10 mg/kg flumazenila nakon obustave diazepama i akutne primene diazepama na ponašanje životinje u UPL (**Slika 26**). Primenjena analiza je pokazala značajan uticaj tretmana na procenat vremena provedenog u otvorenim kracima ( $F_{(2,18)} = 13,335$ ,  $p < 0,001$ ) i procenat ulazaka u otvorene krake ( $F_{(2,18)} = 6,383$ ,  $p = 0,008$ ). *Post hoc* SNK test je pokazao da su akutna primena diazepama 2 mg/kg nakon ponavljane

primene rastvarača i primena flumazenila nakon obustave diazepama doveli do značajnog povećanja procenta vremena provedenog u otvorenim kracima ( $p = 0,003$  za OD +FLU 10 grupu i  $p < 0,001$  za AD grupu) i procenta ulazaka u otvorene krake ( $p = 0,028$  za OD +FLU 10 grupu i  $p = 0,007$  za AD grupu) u poređenju sa grupom kojoj je obustavljen diazepam, što je prikazano na **Slici 26, grafici a) i b)**. Uticaj tretmana na vreme provedeno u distalnim delovima otvorenih kraka bio je skoro značajan ( $F_{(2,18)} = 3,469$ ,  $p = 0,053$ ), a *post hoc* test je pokazao da su životinje iz AD grupe provele značajno više vremena u distalnim delovima otvorenih kraka u poređenju sa OD grupom ( $p = 0,018$ , **Slika 26, grafik c)**). U pogledu na parametar vreme provedeno u ponašanju povezanim sa procenom rizika, jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj tretmana ( $F_{(2,18)} = 12,483$ ,  $p < 0,001$ ). *Post hoc* analiza je potvrdila da primena flumazenila nakon obustave diazepama, kao i akutna primena diazepama dovode do značajnog sniženja vremena provedenog u proceni rizika u poređenju sa obustavom diazepama ( $p = 0,012$  za OD + FLU 10 grupu i  $p < 0,001$  za AD grupu). Dodatno je pokazano da su životinje iz OD + FLU 10 grupe provele značajno više vremena u ponašanju povezanim sa procenom rizika u odnosu na životinje iz AD grupe ( $p = 0,042$ ) (prikazano na **Slici 26, grafik d)**). U pogledu na parametre motorne aktivnosti jednofaktorske analize varijansi nisu pokazale značajan uticaj tretmana na ukupni pređeni put ( $F_{(2,18)} = 0,032$ ,  $p = 0,729$ ) i broj ulazaka u sve krake ( $F_{(2,18)} = 0,156$ ,  $p = 0,857$ ) (**Slika 26, grafik b**). Međutim, pokazan je značajan uticaj tretmana na broj ulazaka u zatvorene krake lavirinta ( $F_{(2,18)} = 4,838$ ,  $p = 0,021$ ). *Post hoc* testom je pokazano da je akutna primena diazepama 2 mg/kg dovela do značajnog smanjenja ulazaka u zatvorene krake lavirinta u poređenju sa grupom kojoj je obustavljen diazepam  $p = 0,018$  (na **Slici 26, grafiku b**, vidi se kroz razliku između ukupnog broja ulazaka u sve krake (visina stubića) i ulazaka u otvorene krake (šrafirani deo stubića)).

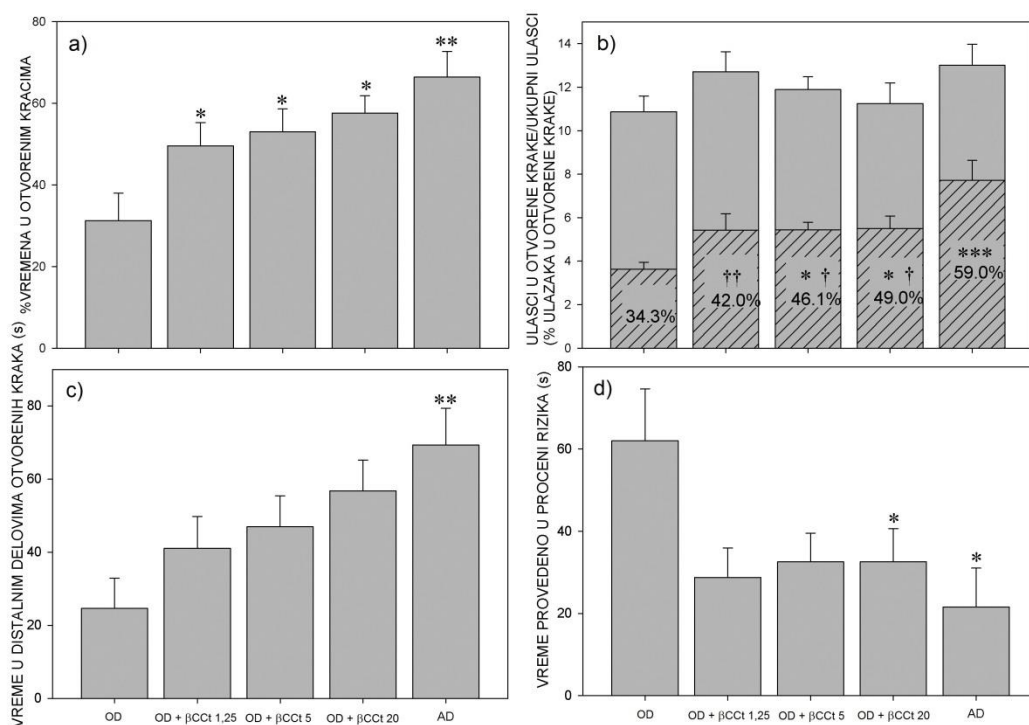


**Slika 26:** Efekti obustave diazepama (OD), primene flumazenila u dozi 10 mg/kg nakon obustave diazepama (OD + FLU 10) i akutne primene diazepama (AD) na parametre UPL. Grafik b) prikazuje procenat ulazaka u otvorene krake lavirinta, izražen kao odnos broja ulazaka u otvorene krake (šrafirani stubići) i ukupan broj ulazaka u sve krake (ukupni stubići). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa OD grupom; †  $p < 0,05$  u poređenju sa AD grupom. Broj životinja po grupi bio je 7.

### 2.1.3. Ispitivanje uticaja akutne primene rastućih doza $\beta$ CCt-a na ispoljavanje anksioznosti u UPL nakon obustave tretmana (EKSPERIMENT 2.2)

Primenom jednofaktorskih analiza varijansi ispitan je uticaj obustave ponavljane primene diazepama 2 mg/kg, primene  $\beta$ CCt-a u jednoj od tri doze: 1,25 mg/kg, 5 mg/kg ili 20 mg/kg nakon obustave diazepama i akutne primene diazepama 2 mg/kg na ponašanje pacova u UPL (Slika 27). Jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj tretmana na parametar procenat vremena u otvorenim kracima ( $F_{(4,34)} = 5,010$ ,  $p = 0,003$ ), a *post hoc* test je

potvrdio da primene bilo koje od tri doze  $\beta$ CCt-a nakon obustave diazepama, kao i akutna primena diazepama, dovode do procentualno značajno više vremena provedenog na otvorenim kracima u odnosu na obustavu diazepama ( $p = 0,032$  za OD +  $\beta$ CCt 1,25,  $p = 0,031$  za OD +  $\beta$ CCt 5,  $p = 0,014$  za OD +  $\beta$ CCt 20 i  $p = 0,001$  za AD grupu u poređenju sa OD grupom) (**Slika 27, grafik a**). Jednofaktorskom analizom varijanse pokazan je značajan uticaj tretmana na parametar procenat ulazaka u otvorene krake ( $F_{(4,34)} = 6,880$ ,  $p < 0,001$ ). *Post hoc* test je pokazao da primena  $\beta$ CCt-a u dozi 5 ili 20 mg/kg nakon obustave diazepama i akutna primena diazepama 2 mg/kg dovode do značajnog povećanja procenta ulazaka u otvorene krake u poređenju sa grupom kojoj je obustavljen diazepam ( $p = 0,049$  za OD +  $\beta$ CCt 5,  $p = 0,021$  za OD +  $\beta$ CCt 20 i  $p < 0,001$  za AD grupu, u poređenju sa OD grupom). Istovremeno, SNK test je pokazao da je procenat ulazaka u otvorene krake značajno manji za grupe koje su nakon obustave diazepama primile  $\beta$ CCt u poređenju sa akutnom primenom diazepama,  $p$  vrednosti su  $p = 0,007$  za OD +  $\beta$ CCt 1,25;  $p = 0,03$  za OD +  $\beta$ CCt 5; i  $p = 0,046$  za OD +  $\beta$ CCt 20 u poređenju sa AD grupom (**Slika 27, grafik b**). Pokazan je značajan uticaj tretmana i na parametar vreme provedeno u distalnim delovima otvorenih kraka ( $F_{(4,34)} = 3,531$ ,  $p = 0,016$ ), a *post hoc* testom je pokazano da je akutna primena diazepama dovela do značajnog povećanja vremena provedenog u distalnim delovima otvorenih kraka u poređenju sa životinjama kojima je primena diazepama obustavljena ( $p = 0,009$ ) (**Slika 27, grafik c**). U pogledu na parametar vreme provedeno u ponašanju povezanim sa procenom rizika, jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj tretmana na praćeni parametar ( $F_{(4,34)} = 2,881$ ,  $p = 0,037$ ). Skraćenje vremena provedenog u proceni rizika bilo je blizu statističke značajnosti za grupe OD +  $\beta$ CCt 1,25 i OD +  $\beta$ CCt 5 u poređenju sa grupom OD ( $p = 0,067$  i  $p = 0,072$ , redom), dok je za grupe OD +  $\beta$ CCt 20 i AD dostiglo statističke značajnosti u poređenju sa vrednostima OD grupe ( $p = 0,028$  i  $p = 0,029$ , redom) (**Slika 27, grafik d**). Primenom jednofaktorskih analiza varijansi nije pokazan značajan uticaj tretmana na parametre povezane sa motornom aktivnošću: ukupni pređeni put ( $F_{(4,34)} = 0,757$ ,  $p = 0,561$ ), ukupan broj ulazaka u krake ( $F_{(4,34)} = 1,184$ ,  $p = 0,335$ ) i broj ulazaka u zatvorene krake ( $F_{(4,34)} = 2,024$ ,  $p = 0,113$ ).



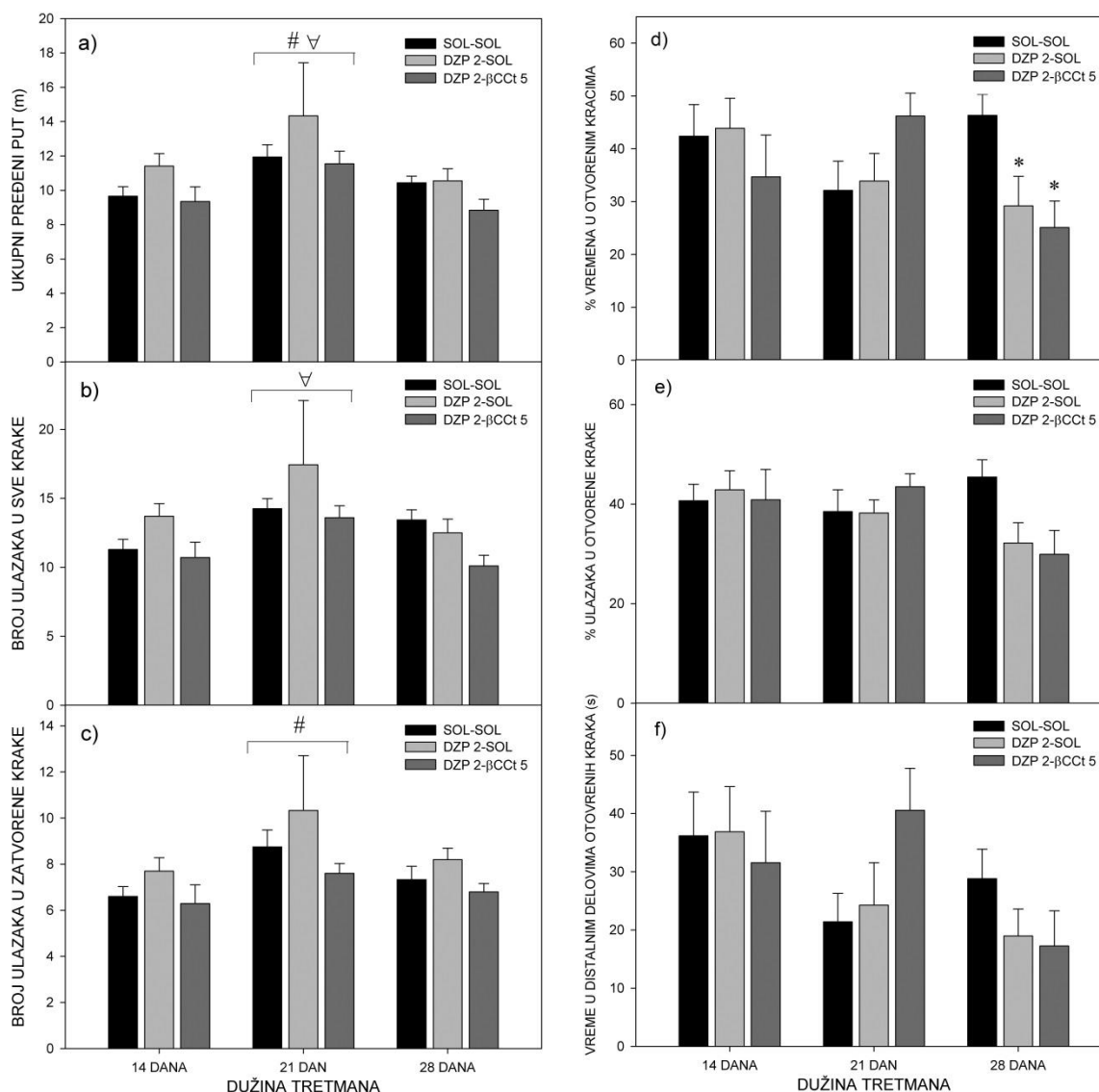
**Slika 27:** Efekti obustave diazepama (OD), primene  $\beta$ CCt-a u jednoj od tri doze: 1.25 mg/kg, 5 mg/kg ili 20 mg/kg nakon obustave diazepama (OD +  $\beta$ CCt 1,25/5/20) i akutne primene diazepama (AD) na parametre UPL. Grafik b) prikazuje procenat ulazaka u otvorene krake lavirinta, izražen kao odnos broja ulazaka u otvorene krake (šrafirani stubići) i ukupan broj ulazaka u sve krake (ukupna visina stubića). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa OD grupom; †  $p < 0,05$ , ††  $p < 0,01$  u poređenju sa AD grupom. Broj životinja po grupi bio je 8, 7, 9, 8 i 7 za grupe OD, OD +  $\beta$ CCt 1,25, OD +  $\beta$ CCt 5, OD +  $\beta$ CCt 20 i AD, redom.

### EKSPERIMENT 2.3

Kao što je prikazano na **Slici 28**, grafici od a) do c), dvofaktorske analize varijansi su pokazale značajan uticaj dužine ponavljane primene na parametre motorne aktivnosti u testu UPL: ukupni pređeni put ( $F_{(2,74)} = 4,593$ ,  $p = 0,013$ ), ukupan broj ulazaka u sve krake ( $F_{(2,74)} = 3,267$ ,  $p = 0,044$ ) i broj ulazaka u zatvorene krake lavirinta ( $F_{(2,74)} = 3,697$ ,  $p = 0,030$ ). S druge strane, analiza nije pokazala značajan uticaj faktora tretman ili interakcije između faktora na praćene parametre motorne aktivnosti (ukupni pređeni put: tretman  $F_{(2,74)} = 2,636$ ,  $p = 0,078$ , interakcija  $F_{(4,74)} = 0,259$ ,  $p = 0,903$ ; ukupan broj ulazaka u sve krake:

tretman  $F_{(2,74)} = 2,401$ ,  $p = 0,098$  i interakcija  $F_{(4,74)} = 0,438$ ,  $p = 0,781$ ; broj ulazaka u zatvorene krake: tretman ( $F_{(2,74)} = 3,081$ ,  $p = 0,052$  i interakcija  $F_{(4,74)} = 0,178$ ,  $p = 0,949$ ). Primenom *post hoc* SNK testa pokazano je da obustava tretmana nakon 21 dana ponavljane primene dovodi do značajnog povećanja ukupnog pređenog puta u odnosu na životinje kojima je tretman obustavljen nakon 14 ili 28 dana primene ( $p = 0,015$  i  $p = 0,020$ , redom). Broj ulazaka u sve krake lavirinta bio je značajno veći kod životinja kojima je primena tretmana obustavljena nakon 21 dana u odnosu na životinje kojima je tretman obustavljen nakon 28 dana primene,  $p = 0,031$  (**Slika 28, grafik b**), dok je broj ulazaka u zatvorene krake lavirinta bio veći za grupe kojima je tretman obustavljen nakon 21 dana u poređenju sa grupama kojima je tretman obustavljen nakon 14 dana ponavljane primene,  $p = 0,028$  (**Slika 28, grafik c**).

Dvofaktorske analize varijansi nisu pokazale značajan uticaj faktora tretman ili dužina tretmana na parametre anksioznosti u UPL: procenat vremena provedenog u otvorenim kracima (tretman  $F_{(2,74)} = 0,758$ ,  $p = 0,472$ ), dužina tretmana  $F_{(2,74)} = 1,169$ ,  $p = 0,316$ ), procenat ulazaka u otvorene krake lavirinta (tretman  $F_{(2,74)} = 0,843$ ,  $p = 0,435$  i dužina tretmana  $F_{(2,74)} = 1,698$ ,  $p = 0,190$ ) i vreme provedeno u distalnim delovima otvorenih kraka (tretman  $F_{(2,74)} = 0,167$ ,  $p = 0,846$  i dužina tretmana  $F_{(2,74)} = 2,904$ ,  $p = 0,061$ ) (**Slika 28, grafici od d) do f**). Značajna interakcija između faktora pokazana je za parametar procenat vremena u otvorenim kracima ( $F_{(4,74)} = 3,130$ ,  $p = 0,020$ ), dok za preostala dva parametra anksioznosti interakcija nije bila značajna (procenat ulazaka u otvorene krake lavirinta  $F_{(4,74)} = 2,231$ ,  $p = 0,074$  i vreme provedeno u distalnim delovima otvorenih kraka  $F_{(4,74)} = 1,615$ ,  $p = 0,179$ ). U pogledu na parametar procenat vremena provedenog u otvorenim kracima, *post hoc* test nije detektovao razlike između različitih tretmana nakon obustave posle 14 dana i 21 dana ponavljane primene. Nakon obustave tretmana posle 28 dana, *post hoc* testom je pokazano da su pacovi iz grupa DZP 2-SOL i DZP 2- $\beta$ CCt 5 procentualno proveli značajno manje vremena na otvorenim kracima u odnosu na SOL-SOL grupu posle 28 dana ( $p = 0,027$  i  $p = 0,018$ , redom).

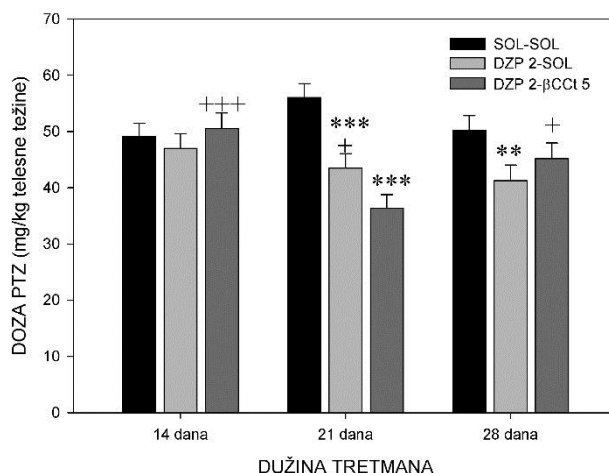


**Slika 28:** Uticaj obustave ponavljane primene rastvarača (SOL-SOL), diazepama 2 mg/kg (DZP 2-SOL) i diazepama 2 mg/kg i βCCt-a 5 mg/kg (DZP 2-βCCt 5), u toku 14, 21 i 28 dana, na parametre motorne aktivnosti (grafici a, b i c) i parametre anksioznosti (grafici d, e i f) u testu UPL. #  $p < 0,05$  u poređenju sa grupama nakon 21 dana, ∇  $p < 0,05$  u poređenju sa grupama nakon 28 dana. Broj životinja po grupama bio je između 7 i 10.

Analiza rezultata PTZ testa primenom dvofaktorske ANOVA-e pokazala je značajan uticaj faktora tretman ( $F_{(2,63)} = 12,014$ ,  $p < 0,001$ ) i interakcije između faktora ( $F_{(4,63)} = 5,918$ ,  $p < 0,001$ ), a nije pokazala značajan uticaj faktora dužina tretmana ( $F_{(2,63)} = 2,583$ ,  $p = 0,084$ )



(Slika 29). *Post hoc* analizom nisu pokazane razlike između različitih grupa tretmana nakon obustave posle 14 dana primene. SNK test je pokazao da obustava tretmana nakon 21 dana ponavljane primene dovodi do značajnog sniženja konvulzivnog praga kod životinja iz grupa DZP 2-SOL i DZP 2-βCCt 5 u poređenju sa životinjama iz SOL-SOL grupe ( $p < 0,001$  za obe grupe). Dodatno, sniženje doze PTZ potrebne za izazivanje konvulzija nakon obustave tretmana posle 21 dana bilo je značajnije za grupu DZP 2-βCCt 5 u poređenju sa grupom DZP 2-SOL ( $p = 0,040$ ). U skladu sa *post hoc* testom, obustava tretmana nakon 28 dana ponavljane primene dovela je do značajnog sniženja konvulzivnog praga kod životinja iz grupe DZP 2-SOL u poređenju sa dozom potrebnom za izazivanje napada kod životinja iz SOL-SOL grupe ( $p = 0,007$ ). Obustava primene tretmana diazepamom i βCCt-om nakon 14 i 28 dana dovela je do značajnog sniženja konvulzivnog praga u poređenju sa obustavom istog tretmana nakon 21 dana ponavljane primene ( $p < 0,001$  i  $p = 0,015$  za grupe DZP 2-βCCt 5 nakon 14 i 28 dana u poređenju sa grupom DZP 2-βCCt 5 nakon 21 dana).



**Slika 29:** Uticaj obustave tretmana rastvaračem (SOL-SOL), diazepamom 2 mg/kg (DZP 2-SOL) ili diazepamom 2 mg/kg i βCCt-om 5 mg/kg (DZP 2-βCCt 5) na dozu PTZ potrebnu za izazivanje konvulzivnih napada kod pacova. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  u poređenju sa SOL-SOL grupom iste dužine tretmana, +  $p < 0,05$ , +++  $p < 0,001$  u poređenju sa DZP 2-βCCt 5 nakon 21 dana. Broj životinja po grupi bio je između 7 i 10.

## 5. DISKUSIJA

Benzodiazepini spadaju među najpropisivanije psihotropne lekove u poslednjih pola veka (Lader, 2011). Zahvaljujući širokom spektru dejstva, primenjuju se u terapiji anksioznih poremećaja, poremećaja spavanja, u terapiji statusa epileptikusa, kao miorelaksansi, za uvođenje i održavanje anestezije, ali i u nizu drugih empirijskih indikacija (Bateson, 2002; Rudolph i Möhler, 2004; Dell'oso i Lader, 2013). Diazepam i drugi standardni benzodiazepini farmakološke efekte ostvaruju pozitivnom modulacijom četiri podtipa GABA<sub>A</sub> receptora, koji uz  $\gamma 2$  podjedinicu sadrže i jednu od sledećih  $\alpha$  podjedinica:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ili  $\alpha_5$  (Rudolph i Möhler, 2006). Uprkos njihovoj izuzetnoj akutnoj efikasnosti i brzom nastupu dejstva, primenu benzodiazepina opterećuje niz neželjenih efekata, među kojima se izdvajaju sedacija, oštećenje memorije i ataksija (Baldwin i sar., 2013). Dodatno, dugotrajna primena benzodiazepina može dovesti do razvoja tolerancije i fizičke zavisnosti (Owen i Tyrer, 1983; Lader, 2011). Potencijal benzodiazepina za razvojem tolerancije i zavisnosti u mnogim zemljama je doveo do preporuke za kratkotrajnu primenu ovih lekova u periodu od 2 do 4 sedmice (Lader, 2011). Ipak, procene pokazuju da učestalost dugotrajne primene benzodiazepina u opštoj populaciji iznosi između 2 i 7,5%, dok među populacijom koja primenjuje benzodiazepine, procenat ljudi koji dugotrajno uzimaju ove lekove dostiže vrednosti između 25 i 76% (Fang i sar., 2009).

Tolerancija, oslabljen odgovor organizma na lek nakon ponavljane primene, razvija se na određene efekte benzodiazepina brže i izraženije nego na ostale efekte. Pokazano je da se tolerancija relativno brzo razvija na sedativno dejstvo, hipnotički efekat i antikonvulzivno dejstvo (Hutchinson i sar., 1996). S druge strane, kliničke studije ukazuju na činjenicu da se tolerancija na anksiolitičko dejstvo i oštećenje kognitivnih sposobnosti verovatno ne razvija u manifestnom obimu (Vinkers i Olivier, 2012). Teškoće prilikom pokušaja prekida dugotrajne terapije pripisuju se razvoju fenomena fizičke zavisnosti i želji da se izbegne ispoljavanje sindroma obustave, kao najznačajnije manifestacije zavisnosti. Primena benzodiazepina u periodu između 4 i 6 sedmica dovodi do razvoja fizičke zavisnosti kod 15

do 30% pacijenata, stoga su predloženi režimi postepene obustave terapije u cilju suzbijanja ovih neželjenih efekata (Dell'oso i Lader, 2013).

Istraživanja u prethodnim decenijama u velikoj meri su dovela do razumevanja mehanizama odgovornih za ispoljavanje akutnih efekata benzodiazepina. Danas je poznato da aktivacija određenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora, ili njihovih kombinacija, dovodi do specifičnih bihevioralnih efekata nakon akutne primene (Rudolph i Knoflach, 2011). Farmakološke studije i studije na genetski modifikovanim miševima su pokazale da je aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu odgovorna za ispoljavanje sedativnog efekta, anterogradne amnezije, ataksije i delimično za ispoljavanje antikonvulzivnog dejstva (Rudolph i sar., 1999; McKernan i sar., 2000). S druge strane, aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_2$  i/ili  $\alpha_3$  podjedinicu dominantno doprinosi anksiolitičkom dejstvu i u velikoj meri miorelaksantnom dejstvu (Low i sar., 2000; Crestani i sar., 2001). Aktivacija jedinog podtipa ekstrasinaptičkih receptora preko kojih benzodiazepini mogu da ostvare svoje efekte, GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu, prevashodno učestvuje u modulaciji efekata kao što su anterogradna amnezija, miorelaksacija i sedativno dejstvo (Crestani i sar., 2001; Crestani i sar., 2002).

U poređenju sa istraživanjima akutnih efekata benzodiazepina, značajno manji broj studija se bavio istraživanjem uloge različitih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju fenomena nakon ponavljane primene, kao što su tolerancija i zavisnost. Upotrebom genetski modifikovanih miševa, jedna ranija studija je implicirala da je istovremena aktivacija receptora koji sadrže  $\alpha_1$  i  $\alpha_5$  podjedinice neophodna za razvoj tolerancije na sedativno dejstvo (Van Rijnsoever i sar., 2004). Dodatno, skorija studija sugerise da je za razvoj adiktivnog potencijala neophodna aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu (Tan i sar., 2010). S druge strane, rezultati studija u kojima su primenjivani ligandi koji poseduju selektivan afinitet i/ili efikasnost za određene podtipove GABA<sub>A</sub> receptora ukazuju da su različiti mehanizmi odgovorni za razvoj tolerancije na određene efekte benzodiazepina. Tako je pokazano da aktivacija receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu nije neophodna za razvoj tolerancije na antikonvulzivno dejstvo (Auta i sar., 2008). U pogledu na razvoj fenomena zavisnosti, sugerisano je da aktivacija receptora koji sadrže  $\alpha_1$

podjedinicu može biti dovoljna, ali da nije neophodna za razvoj praćenog fenomena (Mirza i Nielsen, 2006; Ator i sar., 2010).

Uvidom u literaturu koja se bavi fenomenima koji se razvijaju nakon ponavljane primene benzodiazepina uočava se nekonzistentnost između rezultata studija. Uočene razlike mogu biti posledica dinamičnosti neuro-adaptivnih promena koje nastaju nakon dugotrajne primene, kao i učesća različitih sistema ili različitih moždanih regija u ovim promenama (Pratt i sar., 1998). Dodatno, važno je imati u vidu da razvoj farmakoloških efekata nakon ponavljane primene benzodiazepina, tolerancije i fizičke zavisnosti, nije uniforman proces i da verovatno uključuje učešće brojnih adaptivnih mehanizama (Vinkers i Olivier, 2012).

Ipak, sa farmakološkog stanovišta, a u skladu sa idejom o sintezi „idealnog liganda benzodiazapinskog veznog mesta“, očekuje se da buduća istraživanja pruže odgovor na pitanje da li je moguće sintezom selektivnih liganada za pojedine podtipove GABA<sub>A</sub> receptora izbeći razvoj neželjenih efekata povezanih sa akutnom i dugotrajnom primenom, uz istovremeno zadržavanje efikasnosti nakon ponavljane primene.

### **5.1 UTICAJ RUKOVANJA I SVAKODNEVNE PRIMENE RASTVARAČA NA EFEKTE DIAZEPAMA NAKON PONA VLJANE PRIMENE**

Ispitivanja bihevioralnih efekata kod životinja nakon ponavljane primene određenog tretmana otežana su brojnim spoljašnjim faktorima koji mogu promeniti odgovor životinje u datoj proceduri i značajno uticati na ishod eksperimenta. Pre svega, pokazano je da svakodnevno rukovanje životinjama može promeniti eksplorativnu aktivnost i nivo anksioznosti životinje (Schmitt i Hiemke, 1998a; Costa i sar., 2012). Osim toga, prethodna manipulacija životinjama može modifikovati i farmakološki odgovor primenjenog tretmana i u odsustvu promena bazalnog ponašanja (Hogg, 1996). Stoga smo na početku naših eksperimenata ispitali uticaj svakodnevnog rukovanja životinjama povezanog sa primenom tretmana na ponašanje pacova u sprovedenim bihevioralnim testovima. Analiza je urađena tako što smo efekte rastvarača i diazepama primenjenih pre samog testiranja uporedili

između grupa kojima je ovaj tretman primenjen jednokratno u odnosu na efekte za grupe koje su navedeni tretman primile nakon 14 dana primene rastvarača. Rezultati našeg eksperimenta (EKSPERIMENT 1.1) pokazali su da *i.p.* primena rastvarača i svakodnevno rukovanje životinjama nisu uticali na bazalnu motornu aktivnost, nivo anksioznosti i jačinu stiska. Takođe, bihevioralni odgovor diazepama (2 mg/kg) u sva tri primenjena testa (SLA, UPL, GS) nije se razlikovao između grupa kojima je prethodno rukovano u odnosu na grupu kojoj je tretman primenjen jednokratno. Akutna primena diazepama u dozi 2 mg/kg izazivala je sedativno i anksiolitičko dejstvo i relaksaciju skeletnih mišića.

Eksperimentalna procedura u EKSPERIMENTU 1.1 je podrazumevala konsekutivno sprovođenje bihevioralnih testova počevši od najmanje invazivnog testa (SLA test) ka invazivnijim testovima (UPL test i na kraju test JS). Primenom baterije bihevioralnih testova u značajnoj meri se redukuje broj potrebnih subjekata, i na ovaj način može se povećati osetljivost procedure na efekte tretmana u poređenju sa nezavisnim sprovođenjem eksperimenata (Schmitt i Hiemke, 1998b). Rezultati prezentovanog eksperimenta pokazuju da prethodno izlaganje SLA testu nije uticalo na dalje ponašanje životinja u UPL testu i testu JS. Do ovog zaključka se dolazi kada se efekti iz UPL testa i testa JS uporede sa publikovanim rezultatima dobijenim u istoj laboratoriji na eksperimentalno naivnim životinjama (Savić i sar., 2010; Milić i sar., 2012).

### **5.2 UTICAJ DOZE I DUŽINE TRETMANA NA EFEKTE DIAZEPAMA I RAZVOJ TOLERANCIJE NAKON PONAVLJANE PRIMENE**

Kao što je prethodno pomenuto, razvoj tolerancije, odnosno slabljenja odgovora na lek nakon ponavljane primene, predstavlja adaptivni odgovor organizma na produženo izlaganje organizma leku (Löscher i Schmidt, 2006). Rezultati SLA testa iz EKSPERIMENTA 1.1 ukazuju da ponavljana, *i.p.* primena diazepama, jednom dnevno, u dozi 2 mg/kg ili 10 mg/kg u toku 14 dana, dovodi do razvoja tolerancije na sedativno dejstvo 2 mg/kg diazepama. Slabljenje sedativnog efekta izraženo je kroz izostanak značajnog smanjenja ukupnog pređenog puta u SLA testu. Ipak, blag sedativni efekat je

prisutan i nakon ponavljane primene ovih doza diazepama, što se vidi kroz umereno smanjenje pređenog puta u perifernoj zoni. Međutim, zabeleženo sedativno dejstvo za ove dve grupe nakon primene diazepama 2 mg/kg je čak slabije izraženo nego sedativni efekat nakon primene diazepama u dozi 1,25 mg/kg (Savić i sar., 2008). S druge strane, iako su prethodne studije sugerisale da se tolerancija na sedativno dejstvo benzodiazepina razvija nakon nekoliko dana ponavljane primene i da je nezavisna od koncentracija leka koje se postižu u mozgu (Fernandes i sar., 1996; Fernandes i sar., 1999), rezultati EKSPERIMENTA 1.1 pokazuju da ponavljana primena najniže doze diazepama (0,5 mg/kg) dovodi do produbljivanja sedativnog efekta diazepama primenjenog u dozi 2 mg/kg pre testiranja. Potenciranje sedativnog dejstva se ogleda kroz izraženije smanjenje ukupnog pređenog puta i pređenog puta u perifernoj zoni, kao i kroz statistički značajno smanjenje pređenog puta u centralnoj zoni, koje nije prisutno nakon akutne primene iste doze ovog benzodiazepina. Dakle, dobijeni nalaz sugeriše da sedativni efekat diazepam može biti potenciran ukoliko je doza koja se primenjuje tokom ponavljane primene niža od doze koja se primeni pre samog testiranja. Ovakav efekat, koji je suprotan fenomenu tolerancije, naziva se senzitivizacija.

Razvoj tolerancije na anksiolitičko dejstvo benzodiazepina i dalje predstavlja predmet debate (Hutchinson i sar., 1996). Istraživanja na životinjama pokazuju da je razvoj tolerancije na anksiolitičko dejstvo benzodiazepina zavisano od primenjene doze, dužine i puta primene, ali i bihevioralnog testa ili modela koji se koristi (Fernandes i sar., 1999). Istovremeno, u dostupnoj literaturi postoje dokazi o izostanku razvoja tolerancije na anksiolitičko dejstvo, pa i o potencijaciji ovog efekta nakon ponavljane primene benzodiazepina (Stock i sar., 2000; Khan i Haleem, 2008). Naši rezultati testa UPL (EKSPERIMENT 1.1) pokazuju da je osetljivost na anksiolitičko dejstvo sačuvana nakon ponavljane primene srednje doze diazepama (2 mg/kg), dok se anksiolitički efekat gubi nakon ponavljane primene niže (0,5 mg/kg) i više (10 mg/kg) doze diazepama.

Poznato je da procenu nivoa anksioznosti kod životinja u testu UPL mogu ometati sporedni uticaji tretmana ili primenjene procedure na motornu aktivnost (Dawson i Tricklebank, 1995). U EKSPERIMENTU 1.1 smanjenje motorne aktivnosti nakon ponavljane primene najniže doze diazepama primećeno je prvo u SLA testu, a naknadno i kroz uticaj diazepama

na parametar motorne aktivnosti u tesu UPL, odnosno smanjenje broja ulazaka u zatvorene krake lavirinta. Dakle, pretpostavljamo da je anksiolitički efekat u testu UPL za grupu ponavljano tretiranu diazepamom u dozi 0,5 mg/kg maskiran izraženim sedativnim efektom. S druge strane, smanjenje broja ulazaka u zatvorene krake lavirinta zabeleženo za grupu koja je ponavljano tretirana diazepamom u dozi 2 mg/kg pre ukazuje na posledicu dezinhibicije aktivnosti na otvorenim kracima. Ovakav zaključak se nameće usled izostanka značajnog uticaja primenjenog tretmana na motornu aktivnost životinja iz ove grupe u prethodno sprovedenom testu SLA. Smanjenje vremena provedenog u centralnoj zoni aparature doprinosi utisku da ponavljana primena srednje doze diazepama poboljšava, ili ojačava, anksiolitički efekat diazepama primenjenog u dozi 2 mg/kg. Potencijacija anksiolitičkog efekta primećena za grupu ponavljano tretiranu srednjom dozom diazepama u skladu je sa nalazom senzitivizacije anksiolitičkog dejstva u testu odabira delova prostora usled razlike u osvetljenju („light-dark box“), zabeležene nakon dve nedelje ponavljane primene diazepama u istoj dozi (Khan i Haleem, 2008). Ponavljana primena najviše doze diazepama u sadašnjem eksperimentu (10 mg/kg) nije dovela do anksiolitičkog efekta nakon primene 2 mg/kg diazepama, uprkos činjenici da je motorna aktivnost procenjena u SLA testu i kroz motorne parametre u UPL testu bila na kontrolnom nivou. Stoga se može zaključiti da jedino ponavljana primena visoke doze diazepama dovodi do razvoja fenomena nalik toleranciji na anksiolitički efekat umerene doze diazepama.

Prethodne studije koje su ispitivale razvoj tolerancije na miorelaksantno dejstvo diazepama pokazale su da se tolerancije razvija nakon 7 dana *i.p.* primene diazepama u dozama 2,5 mg/kg do 10 mg/kg, ali da ni nakon 10 dana *i.v.* primene diazepama u dozi 10 mg/kg nema pojave tolerancije na praćeni efekat (Matsubara i Matsushita, 1982; Mele i sar., 1984). Prezentovani rezultati EKSPERIMENTA 1.1 pokazuju da ponavljana primena diazepama dovodi do gubitka efekta mišićne relaksacije nakon primene 2 mg/kg diazepama, nezavisno od doze korišćene tokom ponavljane primene. Međutim, jačina stiska životinja nakon primene 2 mg/kg diazepama kod grupa koje su primale ponavljani tretman diazepamom nije se, u apsolutnom smislu, značajno razlikovala od akutne primene diazepama, nezavisno

od doze diazepama koja je korišćena u toku ponavljanoog tretmana. Ovaj nalaz ukazuje na nastanak parcijalne tolerancije.

S obzirom na rezultate EKSPERIMENTA 1.1, želeli smo dalje da ispitamo uticaj režima primene diazepama, naime primenjene doze, učestalosti primene i dužine ponavljane primene na razvoj tolerancije na sedativno dejstvo. Stoga je u EKSPERIMENTU 1.2 diazepam u dozi 2 mg/kg primenjivan pacovima dva puta dnevno. Efekti razvoja tolerancije praćeni su nakon 7 i 14 dana primene navedenog režima. Za razliku od EKSPERIMENTA 1.2, u EKSPERIMENTIMA 1.3 i 1.4 primenjivana je doza diazepama 5 mg/kg. U cilju dalje procene dužine ponavljane primene na razvoj tolerancije na sedativni efekat u EKSPERIMENTU 1.5 efekti diazepama 5 mg/kg praćeni su nakon 3 i 7 dana ponavljane primene iste doze diazepama, dva puta dnevno. U EKSPERIMENTIMA 1.3, 1.4 i 1.5 pre početka ponavljane primene urađeno je bazalno testiranje u SLA u cilju isključivanja mogućnosti da su zapažene razlike posledica razlika u bazalnoj motornoj aktivnosti pacova.

Rezultati SLA testa iz EKSPERIMENTA 1.2 i EKSPERIMENTA 1.3, nakon 7 dana ponavljane primene, pokazuju da je sedativno dejstvo diazepama primenjenog pre testiranja u dozama 2 mg/kg ili 5 mg/kg prisutno nakon ponavljane primene rastvarača ili diazepama. Međutim, zapaženi sedativni efekat za grupu ponavljano tretiranu diazepamom slabije je izražen od sedativnog efekta nakon akutne primene diazepama u istoj dozi. Kada se posmatraju rezultati EKSPERIMENTA 1.2 nakon 14 dana ponavljane primene, može se uočiti isti obrazac parcijalne tolerancije kao i nakon 7 dana. Dakle, sedativni efekat je bio prisutan i nakon 14 dana ponavljane primene diazepama u dozi 2 mg/kg, ali je slabije izražen nego nakon akutne primene diazepama.

U skladu sa nalazima File i Fernandes iz 1994, kada je pokazano da se tolerancija na sedativno dejstvo razvija nakon samo 3 dana ponavljane primene diazepama, rezultati EKSPERIMENTA 1.5 potvrđuju da se isti stepen tolerancije zabeležen u EKSPERIMENTU 1.2 nakon 7 i 14 dana i EKSPERIMENTU 1.3 nakon 7 dana, beleži već nakon 3 dana ponavljane primene diazepama. Dobijeni nalaz o razvoju parcijalne tolerancije na sedativni efekat može se uporediti sa rezultatima studije Vlainić i Peričić (2009), u kojoj se



zaključuje da je nakon 10 dana ponavljane primene diazepama ili zolpidema došlo do razvoja tolerancije na sedativno dejstvo, zahvaljujući razlikama u odnosu na akutnu primenu navedenih liganada. Međutim, kada se rezultati navedene studije uporede sa vrednostima za kontrolnu grupu, uočava se da se radi o razvoju delimične tolerancije.

Važno je napomenuti da se razvoj tolerancije u odnosu na akutnu primenu diazepama u EKSPERIMENTIMA 1.2, 1.3 i 1.5 uočava kroz značajno veći ukupni pređeni put i pređeni put u perifernoj zoni za grupe kojima je ponavljano primenjivan diazepam u odnosu na grupe kojima je diazepam akutno primenjen pre testiranja. Izostanak razlika za parametar pređeni put u centralnoj zoni ukazuje na manju osetljivost ovog parametra prema promenama motorne aktivnosti. Dakle, posmatrano sa statističkog stanovišta, izostavljenje kontrolne grupe iz analize rezultata EKSPERIMENTA 1.4 moglo je da favorizuje detektovanje razlika i u ovom, manje osetljivom, praćenom parametru, što se i zapaža u pogledu na rezultate navedenog eksperimenta nakon 7 dana.

Međutim u odnosu na rezultate EKSPERIMENTA 1.3 i 1.4 nakon 14 dana primene tretmana, kao i EKSPERIMENTA 1.5 nakon 7 dana ponavljane primene tretmana, uočava se izostanak razlika u sedativnom efektu između grupe kojoj je diazepam primenjivan samo pre testiranja u odnosu na ponavljaju primenu diazepama. Ovaj nalaz nije u skladu sa prethodno opisanom parcijalnom tolerancijom koja je registrovana u EKSPERIMENTU 1.2 nakon 14 dana ponavljane primene. Uzrok neslaganja verovatno je posledica činjenice da je sedativni efekat za grupu kojoj je diazepam primenjen samo pre testiranja slabije izražen nakon 14 dana nego nakon 7 dana, odnosno slabije izražen nakon 7 dana nego nakon 3 dana u EKSPERIMENTU 1.5. Iako nije u potpunosti jasno šta je uzrok slabljenja efekta diazepama, treba razmotriti činjenicu da su životinje iz EKSPERIMENTA 1.3, 1.4 i 1.5 bile podvrgnute bazalnom testiranju pre započinjenja samog eksperimenta, kao i dodatnom testiranju pod dejstvom diazepama nakon 7, odnosno 3 dana. Prethodno izlaganje aparaturi pod dejstvom diazepama moglo je da indukuje razvoj bihevioralne tolerancije, posebnog tipa naučene tolerancije (Löscher i Schmidt, 2006).

U cilju sveobuhvatnije procene sedativnog dejstva u toku SLA testa urađena je analiza pređenog puta po 5-minutnim intervalima. Ova analiza je pokazala da ponavljana primena diazepama 2 mg/kg u toku 7 i 14 dana dovodi do diskretnijeg sedativnog efekta u toku prvih 20 min testa u odnosu na akutnu primenu diazepama, dok sedativno dejstvo u potpunosti izostaje u poslednjih 10 min testa. Kraće trajanje sedativnog dejstva diazepama, koje podrazumeva kasniji nastup, ili brže slabljenje efekta, zapaža se i nakon ponavljane primene veće doze diazepama (5 mg/kg) nakon 3 dana, odnosno nakon 7 dana. Ovakva slika najviše podseća na posledicu snižene okupiranosti GABA<sub>A</sub> receptora usled ubrzanog metabolizma diazepama. Međutim, dostupni dokazi studija na životinjama i ljudima jasno ukazuju da se promene u metabolizmu diazepama ne dešavaju tokom ponavljane primene, čime se isključuje mogućnost farmakokinetičke tolerancije na zapaženi efekat (Greenblatt i Shader, 1986; Fernandes i sar., 1996). Stoga se zaključuje da se u osnovi zapaženog fenomena prevashodno nalaze određene plastične promene u CNS-u koje vode sniženoj osetljivosti GABA<sub>A</sub> receptore na benzodiazepine (Hutchinson i sar., 1996).

Posmatrani skupa, prikazani rezultati navode na zaključak da se tolerancija razvila u određenoj meri već nakon 3 dana ponavljane primene, a sa daljim nastavkom terapije stepen tolerancije na sedativni efekat se nije produbio. Kada se rezultati ovih eksperimenata uporede sa rezultatima prethodnog eksperimenta (EKSPERIMENT 1.1), uočava se da je fenomen parcijalne tolerancije na sedativni efekat nakon ponavljane primene diazepama prisutan nezavisno od učestalosti primene diazepama i doze diazepama, ukoliko se prilikom testiranja koristi ista doza kao tokom ponavljane primene. Dodatno, dobijeni rezultati ukazuju na značaj uzimanja u obzir fenomena bihejvioralne tolerancije prilikom ispitivanja efekata diazepama.

### **5.3 ULOGA MODULACIJE NA GABA<sub>A</sub> RECEPTORIMA KOJI SADRŽE $\alpha_1$ I $\alpha_5$ PODJEDINICU I DUŽINE PONAVLJANE PRIMENE TRETMANA U RAZVOJU TOLERANCIJE NA SEDATIVNO DEJSTVO DIAZEPAMA**

Prethodne studije koje su imale za cilj da ispituju ulogu aktivacije različitih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju tolerancije na bihevioralne efekte benzodiazepina prevashodno su koristile selektivne pozitivne alosterne modulatore ili genetski modifikovane životinje (Vinkers i Olivier, 2012). Međutim, oba navedena pristupa ne omogućavaju ispitivanje uloge podtipa GABA<sub>A</sub> receptora čija je kontinuirana aktivacija tokom ponavljane primene neophodna za ispoljavanje bihevioralnog fenomena kao što je tolerancija. U odnosu na akutno sedativno dejstvo izazvano benzodiazepinima, prethodne studije su pokazale neophodnost aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu za ispoljavanje ovog efekta (Rudolph i sar., 1999; McKernan i sar., 2000), kao i modulatornu ulogu GABA<sub>A</sub> receptora koji poseduju  $\alpha_5$  podjedinicu u ispoljavanju ovog efekta (Savić i sar., 2008; Savić i sar., 2009). Stoga izostanak aktivacije podtipa GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, bilo usled primene liganada koji ne poseduju afinitet i/ili efikasnost za ove receptore ili genetske modifikacije ovog podtipa receptora ( $\alpha_1$ [H101R] *knock in* miševi), ne pruža direktan odgovor na pitanje uloge aktivacije navedenog podtipa receptora u razvoju tolerancije na sedativno dejstvo, prevashodno zbog toga što praćeni bihevioralni efekat izostaje od početka.

Otuda, u EKSPERIMENTIMA 1.3, 1.4 i 1.5 upotrebljen je za sada jedinstveni pristup ispitivanjima uloge različitih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju tolerancije na sedativno dejstvo diazepama. Ovaj pristup je podrazumevao ponavljaju selektivnu blokadu GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  ili  $\alpha_5$  podjedinicu primenom selektivnih neutralnih alosternih modulatora GABA<sub>A</sub> receptora –  $\beta$ CCt-a ili XLi093 uz diazepam. Kao prednost navedenog pristupa, blokada željenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora vremenski je ograničena primenom neutralnih alosternih modulatora, odnosno izostanak njihove primene pred testiranje omogućava da se neometano prati sedativno dejstvo diazepama nakon ponavljane blokade ovih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora. Kao mogući nedostatak navedenog pristupa, važno je napomenuti da je selektivnost liganada relativna, odnosno da se gubi sa primenom

visokih doza (Smith i Rudolph, 2012) i da farmakokinetičke karakteristike liganda mogu dovesti do nedovoljne ili do produžene okupacije receptora. Stoga je neophodno prvo razmotriti dozu selektivnog neutralnog modulatora pre početka samih eksperimenata.

U odnosu na rezultate dobijene primenom  $\beta$ CCt-om pokazano je da doza od 30 mg/kg kod miševa prevashodno dovodi do smanjenja vezivanja radio-obebeženog flumazenila u regijama u kojima su dominantno zastupljeni GABA<sub>A</sub> receptori koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu (Griebel i sar., 1999). Međutim, ova doza  $\beta$ CCt-a istiskuje radio-obebeženi flumazenil i iz regija u kojima su prisutni receptori koji sadrže  $\alpha_2$  podjedinicu, što može biti odgovorno za suzbijanje anksiolitičkog dejstva diazepama zabeleženo u testu izbora između svetla i tame i antagonizam dejstva nalik anksiolitičkom dobijenog sa hlordiazepoksidom u testu UPL na miševima (Griebel i sar., 1999; Belzung i sar., 2000). Pokazano da akutna primena  $\beta$ CCt-a u dozi od 5 mg/kg antagonizuje sedativno dejstvo diazepama primenjenog u dozi 5 mg/kg na pacovima (Savić i sar., 2009). Stoga smo u našim eksperimentima za ispitivanje tolerancije na sedativno dejstvo diazepama koristili dozu  $\beta$ CCt-a od 5 mg/kg, za koju se očekuje da prevashodno blokira GABA<sub>A</sub> receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu.

U odnosu na afinitete XLi093 za različite podtipove GABA<sub>A</sub> receptora, *in vitro* studija je pokazala približno 60 puta veći afinitet za receptore koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu u odnosu na ostale podtipove GABA<sub>A</sub> receptora; sa aspekta efikasnosti, XLi093 primenjen u koncentraciji 1  $\mu$ M uspeo je značajno da smanji odgovor diazepama posredovan receptorima koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu (Li i sar., 2003). Ovako izražena selektivnost zapažena je i u *in vivo* eksperimentima. U eksperimentima nakon akutne primene benzodiazepina korišćena doza XLi093 iznosila je 10 mg/kg i 20 mg/kg, a ispitivanje uticaja modulacije receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu na ispoljavanje sedativnog, amnezijskog, miorelaksantnog dejstva i oštećenja motorne koordinacije nakon akutne primene nije pokazalo značajne razlike u efektima koji se postižu sa ove dve doze XLi093 (Savić i sar., 2009, Milić i sar., 2012). Stoga su u prikazanim eksperimentima korišćene doze XLi093 od 5 mg/kg ili 10 mg/kg.

Rezultati EKSPERIMENTA 1.3 ukazuju da je sedativni efekat diazepama primenjenog u dozi 5 mg/kg nakon 7 dana ponavljane primene 5 mg/kg  $\beta$ CCt-a uz 5 mg/kg diazepama prisutan, ali značajno slabije izražen u poređenju sa akutnom primenom diazepama u odgovarajućoj dozi. Ispoljavanje značajno slabijeg sedativnog efekta predstavlja prethodno objašnjen fenomen parcijalne tolerancije koji se javlja i nakon ponavljane primene samog diazepama (File i Hitchcott, 1990). Dodatno, produžena blokada  $GABA_A$  receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu je olakšala nastanak tolerancije na sedativno dejstvo, što se vidi kroz značajno veći ukupni put i pređeni put u perifernoj zoni u poređenju sa ponavljanom primenom samog diazepama. Još jedan dokaz o olakšanom razvoju tolerancije usled blokade receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu vidi se i kroz značajno povećanje pređenog puta u centralnoj zoni u odnosu na akutnu primenu diazepama, što nije prisutno nakon ponavljane primene diazepama.

Analiza pređenog puta po 5-minutnim intervalima pokazala je da, kao i u slučaju ponavljane primene diazepama u toku 7 dana, efekat koji se zapaža kroz promene u ukupnom pređenom putu jeste posledica kraćeg ispoljavanja dejstva diazepama za grupu koja je ponavljano tretirana diazepamom uz  $\beta$ CCt u odnosu na akutnu i ponavljaju primenu diazepama. Preciznije, povećanje pređenog puta za grupu kojoj je tokom 7 dana primenjivan diazepam uz  $\beta$ CCt u odnosu na akutnu primenu diazepama ili ponavljaju primenu samog diazepama jeste posledica značajno većeg pređenog puta u toku poslednjih 5 minuta testa.

S druge strane, rezultati EKSPERIMENTA 1.4 pokazuju da produžena blokada  $GABA_A$  receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu može u određenoj meri da ublaži razvoj tolerancije na sedativno dejstvo diazepama. Naime, kada se pogledaju rezultati navedenog eksperimenta nakon 7 dana ponavljane primene XLi093 u dozi 5 mg/kg uz diazepam, uočava se izostanak razlika u pređenom putu u centralnoj zoni u odnosu na akutnu primenu diazepama. Prethodno je opisano da ponavljana primene diazepama dovodi do značajnog povećanja pređenog puta u centralnoj zoni u ovom eksperimentu. Otežan nastanak tolerancije usled blokade  $GABA_A$  receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu može da se potvrdi i kroz analizu pređenog puta po 5-minutnim intervalima. Preciznije, primenjena analiza je

pokazala da u toku prvih 5 minuta testa grupa koja je ponavljano tretirana diazepamom uz XLi093 prelazi distancu komparabilnu sa grupom akutno tretiranom diazepamom, i značajno kraći put od grupe kojoj je diazepam ponavljano primenjivan.

Nalaz da izostanak aktivacije  $\alpha_1$  podtipa GABA<sub>A</sub> receptora olakšava razvoj tolerancije na praćeni sedativni efekat mogao bi se smatrati suprotnim prethodnom nalazu na genetski modifikovanim životinjama koji je sugerisao neophodnost aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu za razvoj tolerancije na sedativno dejstvo benzodiazepina (van Rijnsoever i sar., 2004). Ipak, potrebno je naglasiti da je sedativni efekat diazepamom primenjenog  $\alpha_1$ [H101R] miševima u potpunosti izostao nakon akutne i ponavljane primene ovog liganda, pa se na osnovu bihejvioralnih rezultata nije moglo tvrditi da li bi se tolerancija razvila na efekat koji nije ni ispoljen. Ovaj metodološki problem autori navedene studije pokušali su da prevaziđu tvrdnjom da je detektovana nishodna regulacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu u dentatnom girusu molekularni supstrat za razvoj tolerancije na sedativno dejstvo diazepamom. S obzirom da nishodna regulacija navedenog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora nije detektovana kod  $\alpha_1$ [H101R] mutiranih miševa, autori su zaključili da se ni bihejvioralna tolerancija nije razvila. Ipak, važno je zaključiti da uloga GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu nije mogla biti direktno ispitana na modelu genetski modifikovanih životinja.

S obzirom da bi blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u našoj studiji mogla da spreči ispoljavanje sedativnog efekta, što bi posledično moglo da dovede do lažnog nalaza, nakon obavljenog testiranja u SLA određene su koncentracije diazepamom i  $\beta$ CCt-a u plazmi i mozgu pacova. Rezultati analitike diazepamom nakon 14 dana ponavljane primene pokazuju da koncentracije diazepamom u mozgu i plazmi koje su izmerene približno 50 min nakon poslednje primene dostižu mikromolarne vrednosti. Iako koncentracije aktivnih metabolita diazepamom (desmetildiazepamom, oksazepamom i temazepamom) nisu praćene u prikazanoj studiji, treba napomenuti da prethodna istraživanja sprovedena na pacovima nisu pokazala značajno duže poluvreme eliminacije za aktivne metabolite u odnosu na sam diazepam (Friedman i sar., 1986). U skladu sa prethodno sugerisanim dugim dejstvom  $\beta$ CCt-a (Zhang i sar., 1995; June i sar., 2003), detektovane koncentracije  $\beta$ CCt-a u mozgu

izmerene 16 sati nakon poslednje primene iznosile su približno 55 nmol/kg. Dakle, u toku praćenja aktivnosti u SLA testu, prisutna koncentracija  $\beta$ CCt-a nije mogla da spreči vezivanje diazepama, prisutnog u koncentraciji od približno 3  $\mu$ mol/kg, za GABA<sub>A</sub> receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu. Dodatno, u skladu sa prethodno publikovanim nalazima (Löscher, 2007), ne očekuje se da je primenjeni režim ponavljane primene doveo da nakupljanja bilo diazepama ili njegovih aktivnih metabolita u mozgu što bi moglo da utiče na interpretaciju dobijenih rezultata.

S druge strane, rezultati EKSPERIMENTA 1.4 upućuju na zaključak da blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu otežava razvoj tolerancije i u određenoj meri su u skladu sa prethodno diskutovanim studijom sprovedenom na genetski modifikovanim miševima (van Rijnsoever i sar., 2004). Ipak, dok naši rezultati ukazuju da aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu doprinosi razvoju tolerancije na sedativno dejstvo, rezultati studije Van Rijnsoever i saradnika pre ukazuju na neophodnost aktivacije ovog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora u *ispoljavanju* praćenog fenomena. Prilikom poređenja nalaza ove dve studije, treba imati u vidu razlike između farmakološkog pristupa i pristupa istraživanjima na genetski modifikovanim životinjama, koje mogu biti uzrok ovih diskretnih razlika po pitanju uloge GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu.

Dobijeni nalazi mogu se posmatrati u svetlu prethodno publikovanih rezultata razvoja tolerancije nakon ponavljane primene zolpidema, liganda sa relativnom selektivnošću za GABA<sub>A</sub> receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u odnosu na receptore koji sadrže  $\alpha_2$  ili  $\alpha_3$  podjedinicu, dok je afinitet zolpidema za receptore sa  $\alpha_5$  podjedinicom minoran (Sanna i sar., 2002). Određeni broj studija sa zolpidemom ukazuje da ponavljana primena ovog liganda ne dovodi do razvoja tolerancije na sedativno dejstvo nakon ponavljane primene (Perrault i sar., 1992, Elliot i White, 2000). Najčešće se izostanak razvoja tolerancije povezuje sa izostankom aktivnosti liganda na receptorima koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu, što delimično može biti povezano sa rezultatima EKSPERIMENTA 1.4. Ipak, s druge strane, „protektivna uloga“ aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, zabeležena u EKSPERIMENTU 1.3, može takođe biti razlog smanjene sklonosti zolpidema ka razvoju tolerancije. Međutim, kada se zolpidem uzima kao primer, važno je istaći i

nekonzistentnost nalaza. Naime, u jednom broju novijih studija zabeleženo je da se tolerancija na motorne efekte zolpidema razvija u istoj meri kao na efekte klasičnih benzodiazepina, poput diazepama (Vlainić i Peričić, 2009; Wright i sar., 2014). Ovi rezultati ukazuju da interakcija između različitih faktora, poput primenjivane doze ili vremena testiranja nakon primene tretmana, može dovesti do promena u praćenim bihevioralnim efektima, verovatno usled različitog udela aktivacije brojnih sistema unutar CNS-a.

U prilog ovome, rezultati EKSPERIMENTA 1.5, koji su prethodno pokazali da se tolerancija na sedativni efekat diazepama razvija već nakon 3 dana ponavljane primene tretmana, ukazuju da produžena blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  ili  $\alpha_5$  podjedinicu ne utiče na razvoj tolerancije u ovoj vremenskoj tački. Posmatran u svetlu rezultata EKSPERIMENTA 1.3 i 1.4, ovaj nalaz pokazuje da su za razvoj tolerancije odgovorni različiti adaptivni mehanizmi, a da za početak razvoja ovi mehanizmi nisu neizostavno vezani za aktivaciju GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  ili  $\alpha_5$  podjedinicu.

Kao što je prethodno pomenuto, analiza rezultata nakon 14 dana ponavljane primene iz EKSPERIMENTA 1.3, kao i nakon 7 dana iz EKSPERIMENTA 1.5, otežana je izostankom razlika u sedativnom dejstvu između grupe koja je diazepam u dozi 5 mg/kg primala samo pre testiranja u poređenju sa grupom ponavljano tretiranom diazepamom. Ipak, u odnosu na ove rezultate može se zaključiti da produžena primena diazepama i  $\beta$ CCt-a nije dalje uticala na razvoj tolerancije. S druge strane, ponavljana primena XLi093 uz diazepam u toku 14 dana, suprotno nalazima nakon 7 dana, olakšala je razvoj tolerancije na sedativni efekat. Ovaj nalaz se dodatno potvrđuje kroz značajno veći ukupni pređeni put prisutan tokom testiranja u SLA testu u poređenju sa akutnim diazepamom, dok razlike između grupe ponavljano tretirane diazepamom i akutne primene diazepama izostaju. Važno je još jednom istaći da su rezultati dobijeni uz ponovno testiranje u SLA testu pod dejstvom diazepama, kao što je slučaj u EKSPERIMENTIMA 1.3 i 1.4 nakon 14 dana, odnosno u EKSPERIMENTU 1.5 nakon 7 dana, opterećeni adaptivnim bihevioralnim odgovorom na ponovno testiranje, i stoga se sa aspekta razvoja farmakodinamičke tolerancije ne mogu jednoznačno tumačiti.



#### **5.4 UTICAJ DOZE, DUŽINE TRETMANA I PERIODA NAKON OBUSTAVE PONAVLJANE PRIMENE DIAZEPAMA NA RAZVOJ I ISPOLJAVANJE FIZIČKE ZAVISNOSTI**

Fizička zavisnost na benzodiazepine se na životinjama najčešće prati kroz ispoljavanje karakterističnih simptoma i znaka nakon obustave (Licata i Rowlett, 2008). Povećanje nivoa anksioznosti nakon prekida ponavljane primene benzodiazepina, ili drugih psihotropnih sredstava, predstavlja najčešću bihejvioralnu promenu koja se može uočiti u toku sindroma obustave i odražava negativno emocionalno stanje (Koob i Volkow, 2010). Primenom UPL, dobro validiranog i najčešće korišćenog modela anksioznosti kod glodara (File i Hitchcott, 1990), moguće je osim promena u nivou anksioznosti pratiti i promene motorne aktivnosti kroz parametre povezane sa aktivnošću. Ova mogućnost u određenim okolnostima može predstavljati dodatnu korist UPL, jer jedan od simptoma obustave benzodiazepina može biti i hiperaktivnost, odnosno stanje suprotno sedaciji do koje dovode benzodiazepini (O'Brien, 2005). Ipak, kao što je prethodno objašnjeno (u EKSPERIMENTU 1.1), promene u motornoj aktivnosti životinje mogu u značajnoj meri uticati na praćene parametre anksioznosti, pa je sugerisano (Dawson i Tricklebank, 1995) da se promene u nivou anksioznosti kod glodara u UPL mogu pouzdano pratiti jedino u odsustvu promena u motornoj aktivnosti. Dodatno, želeli smo da ispitamo da li se ispoljavanje povećanog nivoa anksioznosti kod pacova nakon obustave diazepama javlja uporedo sa ispoljavanjem veoma opasnog znaka fizičke zavisnosti, povećane osetljivosti prema konvulzivnim napadima. Stoga smo nakon praćenja nivoa anksioznosti u EKSPERIMENTU 2.3 kod životinja pratili osetljivost prema konvulzivnim napadima izazvanim PTZ.

U skladu sa prethodno publikovanim rezultatima (File i Andrews, 1991) rezultati naših eksperimenata pokazuju da se povećan nivo anksioznosti po obustavi diazepama nakon ponavljane primene 2 mg/kg jednom dnevno, *i.p.* putem u toku 21 dana, može detektovati u UPL 24 h nakon poslednje primene leka, kada izostanu promene u motornoj aktivnosti. U EKSPERIMENTIMA 2.1 i 2.2 povećan nivo anksioznosti zabeležen je kroz značajno niži

procenat vremena provedenog na otvorenim kracima za grupe kojima je obustavljen diazepam, u odsustvu značajnih promena motorne aktivnosti. U cilju dalje validacije primenjenog eksperimentalnog dizajna ispitan je i uticaj primene rastvarača neposredno pre testiranja na ponašanje životinje. Suprotno prethodnim nalazima da administracija rastvarača može kod životinje da indukuje akutnu stresnu reakciju, praćenu kroz povećanje telesne temperature i povećanu frekvencu rada srca, i da time značajno utiče na rezultate ispitivanja nivoa anksioznosti (Dilsaver i Majchrzak, 1990; Meijer i sar., 2006), sličan odgovor nije zabeležen kod kontrolnih životinja niti kod životinja kojima je obustavljena primena diazepamom u EKSPERIMENTU 2.2. Zapravo, kada se rezultati EKSPERIMENTA 2.2 za kontrolnu grupu i grupu kojoj je obustavljen diazepam uporede sa rezultatima iz EKSPERIMENTA 2.1, u kome su životinje, osim što nisu primile rastvarač pre testiranja, prošle kroz identičnu proceduru kao životinje iz prethodno pomenutog eksperimenta, značajne razlike u praćenim parametrima nisu utvrđene.

Međutim, u EKSPERIMENTU 2.3 nije zabeležen povećan nivo anksioznosti nakon 14 ili 21 dana ponavljane primene diazepamom, uprkos korišćenju protokola kao u prethodno opisanim eksperimentima. Povećan nivo anksioznosti je u navedenom eksperimentu zabeležen tek po obustavi primene nakon 28 dana. Izostanak povećanog nivoa anksioznosti nakon 14 dana ukazuje da *i.p.* primena relativno niske doze diazepamom jednom dnevno nije dovoljna da konzistentno dovede do razvoja fizičke zavisnosti. Izostanak povećane osetljivosti prema PTZ potkrepljuje navedenu tvrdnju. Može se reći da, posmatrani zajedno, rezultati nakon 14 dana potvrđuju sugestiju o bezbednosti intermitentne primene niskih doza diazepamom u periodu od jedne do dve sedmice (Ashton, 1994).

Povećanje motorne aktivnosti registrovano je za sve grupe tretirane diazepamom tokom 21 dana u poređenju sa rezultatima za grupe nakon 14 i 28 dana, što ukazuje na razvoj adaptivnog bihevioralnog odgovora na svakodnevno rukovanje i primenjenu proceduru (Schmitt and Hiemke, 1998a; Costa et al., 2012). Ovakav adaptivni odgovor nije primećen u EKSPERIMENTIMA 2.1 i 2.2, pa stoga pretpostavljamo da je ovo posledica određenih razlika u eksperimentima, kao što su istovremena primena dve injekcije umesto jedne. Kao što je prethodno pomenuto, praćenje nivoa anksioznosti u UPL je otežano ukoliko se javi

promene motorne aktivnosti (Dawson i Tricklebank, 1995), pa smatramo da je hiperlokomotorni odgovor barem delimično odgovoran za razlike u rezultatima između navedenih eksperimenata. Posmatrano dalje, trend povećanja motorne aktivnosti nakon 21 dana bio je izraženiji za grupu kojoj je obustavljen diazepam u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovakav nalaz može da ukaže na blagi bihevioralni odgovor na obustavu diazepama, kao što je to prethodno zabeleženo u studiji sa lorazepamom (Elliot i White, 2000). Dodatno, pretpostavku o blagom sindromu obustave, koji je teško bilo detektovati u UPL, potkrepljuje činjenica da je kod ovih životinja zabeležena povećana osetljivost prema konvulzivnim napadima. Obustava diazepama nakon 28 dana ponavljane primene dovela je kako do anksioznog odgovora neometanog promenama motorne aktivnosti, tako i do povećane osetljivosti prema konvulzivnim napadima.

S druge strane, rezultati EKSPERIMENTA 1.2 pokazuju da se povećan nivo anksioznosti beleži 24 h po prestanku ponavljane primene diazepama koja je trajala 7 ili 14 dana ukoliko se učestalost primene diazepama poveća sa jednom dnevno na dva puta dnevno. Nalaz o značajno povećanom nivou anksioznosti nakon 14 dana u skladu je sa prethodno publikovanim nalazom, kada je primena istog režima dovela do značajnog povećanja nivoa anksioznosti već nakon 12 h po prekidu primene (dos Santos i sar.,2010). Nalaz o razvoju fizičke zavisnosti već nakon 7 dana ponavljane primene diazepama odgovara rezultatima dobijenim nakon 7 dana kontinuirane primene lorazepama (Elliot i White, 2000). Potrebno je prokomentarisati i to da su u navedenom eksperimentu kontrolne životinje provele iznenađujuće visok procenat vremena na otvorenim kracima, i napravile visok procenat broja ulazaka u otvorene krake, približno 50% za oba parametra, što može da ukaže na razvoj adaptivnog bihevioralnog odgovora kod ovih životinja. Iako je sa statističkog aspekta ovakav nalaz za kontrolne životinje mogao da olakša detekciju anksioznog odgovora kod grupa kojima je diazepam obustavljen, uključivanje kontrolne grupe koja je prošla kroz identičnu proceduru kao i ostale grupe bilo je neophodno za donošenje zaključka o razvoju povećanog nivoa anksioznosti nakon obustave diazepama.

Uticaj ponavljane primene veće doze diazepama i dužeg vremenskog intervala nakon obustave diazepama ispitan je nakon sprovedenog SLA testa u EKSPERIMENTIMA 1.4 i

1.5. Rezultati ovih eksperimenata pokazuju da ponavljana primena diazepama 5 mg/kg dva puta dnevno ne dovodi do povećanog nivoa anksioznosti nakon 48 h po prestanku ponavljane primene leka u toku 7 i 14 dana. Moguća objašnjenja ovakvog nalaza su da se fizička zavisnost nije razvila, ili da je vremenski interval bio preran ili prekas za detektovanje stanja nalik anksioznosti. Prvo objašnjenje čini se malo verovatnim, s obzirom na činjenicu da se verovatnoća za razvoj fizičke zavisnosti povećava sa primenom većih doza (Ator i Griffiths, 2003), a rezultati prethodnih eksperimenata su pokazali da primena niže doze diazepama dovodi do razvoja fizičke zavisnosti. S druge strane, imajući u vidu brz metabolizam diazepama nakon *i.p.* primene (Friedman i sar., 1986), kao i činjenicu da smo sa nižom dozom detektovali povećan nivo anksioznosti nakon 24 h, pretpostavljamo da 48 h nije preuranjena vremenska tačka za ispoljavanje povećane anksioznosti. Ipak, kako su Izzo i saradnici (2001) povećanu anksioznost detektovali tek 96 h po obustavi primene diazepama u režimu rastućih doza (do 20 mg/kg) tri puta dnevno *i.g.*, može se pretpostaviti da vremenska tačka 48 h nakon prekida ponavljane primene nije bila optimalna za ispitivanje nivoa anksioznosti nakon primene diazepama u dozi 5 mg/kg dva puta dnevno.

U skladu sa prethodnim sugestijama prikazani rezultati zbirno upućuju da razvoj fizičke zavisnosti na diazepam zavisi kako od faktora kao što su doza leka koja se primenjuje, put primene i dužina ponavljane primene, simptom ili znak koji se prati, tako i od njihove međusobne interakcije. Različit uticaj navedenih faktora može biti uzrok divergentnosti nalaza o mehanizmima razvoja fenomena fizičke zavisnosti. Dodatno, sa aspekta istraživanja praćenog fenomena na eksperimentalnim životinjama, posebno se ističe i nepredvidljivi, a uobičajeno neadekvatno ispitan, uticaj rukovanja tokom ponavljane primene na ponašanje životinja.

U cilju boljeg razumevanja mehanizama koji se nalaze u osnovi fenomena fizičke zavisnosti dalja ispitivanja su sprovedena 24 h nakon primene diazepama u dozi 2 mg/kg, jednom dnevnom.

### **5.5 ULOGA GABA<sub>A</sub> RECEPTORA KOJI SADRŽE $\alpha_1$ PODJEDINICU NA ISPOLJAVANJE POVEĆANOG NIVOVA ANKSIOZNOSTI NAKON OBUSTAVE PONAVLJANE PRIMENE DIAZEPAMA**

Prethodno je opisano da se u osnovi fenomena fizičke zavisnosti nalaze neuroadaptivne promene u CNS-u koje se mogu detektovati i nakon prekida primene benzodiazepina (Zeng i Tietz, 1999). Bliske međusobne veze glutamatergičkih, GABA-ergičkih i dopaminergičkih neurona u ključnim moždanim regijama uključenim u razvoj zavisnosti ukazuju na mogući značaj neuroadaptivnih promena u navedenim sistemima u razvoju ovog fenomena. Navedena pretpostavka potkrepljena je nalazima da pozitivna modulacija GABA<sub>A</sub> receptora pri primeni jedne doze benzodiazepina dovodi do nastanka dugotrajne sinaptičke plastičnosti na dopaminergičkim neuronima u zoni ventralnog tegmentuma, i to praćeno kroz ojačanu glutamatergičku transmisiju na ovim neuronima (Heikkinen i sar., 2008; Tan i sar., 2010). Ojačana glutamatergička neurotransmisija na nivou hipokampusa pokazana je i nakon obustave benzodiazepina (Van Sickle i sar., 2004). Pretpostavljeni uzrok adaptivnih promena na nivou glutamatergičke i dopaminergičke transmisije jeste inhibicija GABA-ergičkih interneurona usled aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu. Međutim, predloženi uzrok adaptivnih promena, akutna inhibicija GABA-ergičkih interneurona, ne uzima u obzir značajne biohemijske i elektrofiziološke promene koje se razvijaju na nivou GABA-ergičke neurotransmisije nakon dugotrajne pozitivne modulacije usled primene benzodiazepina (Zeng i Tietz, 1999).

Imajući u vidu brzinu i neposrednost mehanizma dejstva benzodiazepina, čini se da bi promene na nivou GABA-ergičkog sistema mogle predstavljati jednu od početnih karika u lancu daljih adaptivnih promena koje se razvijaju. Dodatno, sa aspekta razvoja novih liganada benzodiazepinskog veznog mesta, potreba za daljim razumevanjem uloge aktivacije određenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora potkrepljuje dalja istraživanja na nivou GABA-ergičke neurotransmisije.

Prethodne studije su pokazale da povremena primena flumazenila u toku ponavljane primene diazepama, kao i primena nakon obustave tretmana može da ublaži simptome

fizičke zavisnosti kod životinja (Gallager i sar., 1986; File i Hitchott, 1990). Efikasnost flumazenila u terapiji sindroma obustave pokazana je i kod ljudi kada se flumazenil primenjuje pacijentima koji pate od sindroma obustave (Lader i Morton, 1992; Saxon i sar., 1997), kao i kada se primenjuje zajedno sa opadajućim dozama oksazepama tokom nekoliko dana po obustavi prethodne primene benzodiazepina (Gerra i sar., 2002, Hood i sar., 2009). S druge strane, postoje dokazi da primena ovog tradicionalno smatranog neutralnog modulatora može da precipitira sindrom obustave kako kod životinja, tako i kod ljudi (Mintzer i sar., 1999; Kaminski i sar., 2003).

Rezultati EKSPERIMENTA 2.1 su u skladu sa prethodnim nalazima (File i Hitchott, 1990) koji su pokazali da akutna primena flumazenila nakon obustave ponavljane primene diazepama može da otkloni povećan nivo anksioznosti kod životinja. U navedenom eksperimentu, primena flumazenila pre testiranja u UPL rezultovala je značajnim povećanjem procenta vremena provedenog na otvorenim kracima i procenta broja ulazaka u otvorene krake i dodatno smanjila vreme provedeno u proceni rizika u poređenju sa grupom kojoj je obustavljen diazepama. Zapaženi efekat flumazenila bio je sličan akutnom efektu diazepama, što je u skladu sa zaključkom koji su doneli File i Hitchott (1990) da uticaj flumazenila na anksioznost zavisi od nivoa anksioznosti životinje. Naime, ovi autori su sugerisali da primena flumazenila dovodi do efekta nalik anksiolitičkom kada se lek primeni životinjama kod kojih se razvila tolerancija na anksiolitičko dejstvo i koje bi po obustavi primenjivanog benzodiazepina ispoljile povećan nivo anksioznosti. U suprotnom, flumazenil može povećati nivo anksioznosti, odnosno precipitirati sindrom obustave. Iako tolerancija na anksiolitičko dejstvo nije praćena u prikazanom eksperimentu, povećan nivo anksioznosti detektovan po obustavi ponavljane primene može se smatrati prediktivnim za razvoj tolerancije na praćeni efekat.

Imajući u vidu podatke o adaptivnim promenama na nivou GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu nakon dugotrajne primene diazepama *in vitro* i *in vivo* (Pesold i sar., 1997; Follesa i sar., Biggio i sar., 2003), kao i prethodno pomenute nalaze o značajnoj ulozi ovog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora u regulisanju sinaptičke transmisije u ključnim regijama mozga, želeli smo da ispitamo učešće GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u procesima

koji se nalaze u osnovi ispoljavanja povećanog nivoa anksioznosti nakon obustave diazepama. Shodno ovom cilju, u EKSPERIMENTU 2.2 nakon obustave ponavljane primene diazepama životinjama je primenjen  $\beta$ CCt, neutralni alosterni modulator koji pokazuje 20 puta veću selektivnost za receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u odnosu na receptore koji sadrže  $\alpha_2$  ili  $\alpha_3$  podjedinicu (Cox i sar., 1995). Doze  $\beta$ CCt-a koje su primenjene bile su u opsegu doza do 20 mg/kg. Na osnovu rezultata UPL sprovedenog na pacovima, u kojem primena  $\beta$ CCt-a nije uspela da spreči anksiolitičko dejstvo hlordiazepoksida (Carroll i sar., 2001), može se očekivati da primenjene doze dovode do selektivne blokade  $GABA_A$  receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu.

Rezultati EKSPERIMENTA 2.2 pokazuju da akutna primena  $\beta$ CCt-a, 24 h nakon poslednje primene diazepama, dovodi do značajnog ublažavanja anksioznosti uzrokovane obustavom primene diazepama. Uticaj  $\beta$ CCt-a na parametre anksioznosti u UPL-u bio je delimično zavisn od primenjene doze. Naime, dok je akutna primena  $\beta$ CCt-a u bilo kojoj od tri doze (1,25; 5 ili 20 mg/kg) dovela do značajnog povećanja procenta vremena provedenog na otvorenim kracima u poređenju sa grupom kojoj je obustavljen diazepam, jedino je primena dve veće doze značajno povećala procenat ulazaka u otvorene krake u odnosu na grupu kojoj je obustavljen diazepam. Dozno-zavisni efekat  $\beta$ CCt-a uočava se i pri analizi parametra „vreme provedeno u proceni rizika“, pri čemu je samo najviša doza  $\beta$ CCt-a dovela do skraćanja vremena provedenog u ovoj vrsti ponašanja. Dakle, uticaj akutne primene  $\beta$ CCt-a po obustavi diazepama bio je komparabilan, iako ne identičan, uticaju primene neselektivnog neutralnog modulatora flumazenila (EKSPERIMENT 2.1). S druge strane, uočava se da je efekat nalik anksiolitičkom, postignut nakon akutne primene diazepama u EKSPERIMENTIMA 2.1 i 2.2, bio delimično izraženiji u poređenju sa efektom nakon akutne primene neutralnih modulatora.

Analizirani zajedno, rezultati EKSPERIMENTATA 2.1 i 2.2 ukazuju da 24 h nakon obustave diazepama  $GABA_A$  receptori u mozgu postaju osetljivi na modulaciju posredovanu neutralnim modulatorima  $\beta$ CCt-om ili flumazenilom na način da dovode do efekta nalik akutnoj primeni diazepama eksperimentalno naivnim životinjama. Uzrok zapaženog bihevioralnog odgovora može se pronaći u detektovanoj smanjenoj ekspresiji  $GABA_A$

receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u određenim regijama mozga (Impagnatiello i sar., 1996), kao i u prethodno pokazanoj sposobnosti flumazenila da u kratkom vremenskom periodu otkloni funkcionalne i biohemijske promene na nivou GABA<sub>A</sub> receptora i uspostavi novo ravnotežno stanje u aktivaciji ovih receptora (Gonsalves i Gallagher, 1985; Tietz i sar., 1996). U skladu sa ovim predloženim mehanizmom dejstva flumazenila nakon ponavljane primene benzodiazepina, rezultati EKSPERIMENTA 2.2 ukazuju da je afinitet flumazenila za GABA<sub>A</sub> receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu prevashodno odgovoran za opisani efekat.

### **5.6 ULOGA GABA<sub>A</sub> RECEPTORA KOJI SADRŽE $\alpha_1$ PODJEDINICU U MEHANIZMIMA ODGOVORNIM ZA RAZVOJ FIZIČKE ZAVISNOSTI**

U pogledu na ulogu aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u razvoju fenomena fizičke zavisnosti, prethodna istraživanja su pokazala značajnu ulogu ovog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora u promenama ponašanja koja su povezana sa inicijacijom razvoja fizičke zavisnosti nakon primene samo jedne doze klasičnih benzodiazepina (Fischer i sar., 2013). S druge strane, Mirza i Nielsen (2006) su sugerisali da aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu može imati ključnu ulogu u razvoju fizičke zavisnosti nakon ponavljane primene liganada, praćeno kroz povećanu osetljivost prema konvulzivnim napadima. Stoga smo u EKSPERIMENTU 2.3 primenom prethodno opisanog farmakološkog pristupa (produžene blokade GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu istovremenom primenom  $\alpha_1$ -selektivnog neutralnog modulatora  $\beta$ CCt-a uz diazepam), ispitali ulogu ovog podtipa receptora u razvoju fizičke zavisnosti, praćene u različitim vremenskim tačkama (nakon 14, 21 i 28 dana ponavljane primene), i to kroz ispoljavanje povećanog nivoa anksioznosti i povećane osetljivosti prema konvulzivnim napadima.

Kao što je prethodno opisano, rezultati EKSPERIMENTA 2.3 nakon 14 dana pokazuju da ponavljana primena diazepama 2 mg/kg nije dovela do razvoja fizičke zavisnosti, praćeno kroz promene u UPL i PTZ testu. Stoga je važno pomenuti da se vrednosti praćenih



parametara u testu UPL i PTZ testu za grupu kojoj je obustavljena ponavljana primena diazepama uz  $\beta$ CCt nakon 14 dana bili u opsegu vrednosti za kontrolnu grupu, kao i grupu kojoj je obustavljen diazepam nakon 14 dana, sugerišući na ovaj način izostanak eventualnih rezidualnih koncentracija liganada. Takođe, važno je napomenuti da su rezultati određivanja koncentracija liganada u plazmi i mozgu u EKSPERIMENTU 1.3 prethodno sugerisali da se i nakon intenzivnijeg režima primene (dva puta dnevno vs. jednom dnevno, diazepam u dozi 5 mg/kg vs. 2 mg/kg), ne očekuje značajnije zadržavanje  $\beta$ CCt-a i diazepama u mozgu nakon 24 h.

U navedenom eksperimentu, promene u nivou anksioznosti zabeležene su tek nakon 28 dana ponavljane primene. Efekat obustave ponavljane primene  $\beta$ CCt-a uz diazepam nakon 28 dana bio je komparabilan efektu obustave samog diazepama, što se vidi kroz značajno niži procenat vremena provedenog u otvorenim kracima za obe grupe, i izostanak razlika u praćenim efektima između ove dve grupe. Presentovani rezultati upućuju da produžena blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu nije dovoljna da spreči razvoj povećanog nivoa anksioznosti tokom obustave diazepama, što ukazuje na značajnu ulogu aktivacije ostalih, ne-  $\alpha_1$  podtipova GABA<sub>A</sub> receptora, u razvoju povećanog nivoa anksioznosti.

Rezultati PTZ testa nakon 21 dana ponavljane primene pokazuju da obustava ponavljane primene diazepama uz  $\beta$ CCt dodatno povećava osetljivost prema konvulzivnim napadima nakon obustave tretmana, sugerišući da aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu može imati "protektivnu ulogu" u nastanku povećane osetljivosti prema konvulzivnim napadima po obustavi tretmana. S druge strane, nalazi nakon 21 dana su u suprotnosti sa rezultatima nakon 28 dana ponavljane primene, kada je antagonizam efekata posredovanih GABA<sub>A</sub> receptorima koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, postignut istovremenom primenom  $\beta$ CCt-a uz diazepam, pokazao sposobnost da prevenira povećanu osetljivost prema konvulzivnim napadima 24 h nakon obustave tretmana.

Zapažene razlike u efektima obustave nakon 21 i 28 dana ponavljane primene tretmana, kao i razlike u nalazima iz UPL i PTZ testa međusobno, mogu biti posledica adaptivnih

promena u različitim neuroanatomskim kolima unutar CNS-a, kao što su sugerisali Pratt i saradnici (1998). Posmatrano dalje, različito učešće GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u mehanizmima koji dovode do razvoja fizičke zavisnosti na benzodiazepine moguće je pretpostaviti i iz suprotnih nalaza prethodno dobijenih sa zolpidemom, dominantno  $\alpha_1$ -selektivnim pozitivnim alosternim modulatorom GABA<sub>A</sub> receptora. Naime, prethodne studije koje su ispitivale povećanu osetljivost prema konvuzivnim napadima nakon obustave tretmana pokazale su smanjenu osetljivost zolpidema prema razvoju fizičke zavisnosti u poređenju sa klasičnim benzodiazepinima nakon 5 do 10 dana ponavljane primene kod miševa (Perrault i sar., 1992; Elliot i White, 2000; Mirza i Nielsen, 2006). Stoga, ovi nalazi ukazuju na ulogu aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , ili  $\alpha_5$  podjedinicu u razvoju fizičke zavisnosti, ili čak na "protektivnu ulogu" aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u ovom procesu. Ovakav zaključak je u skladu sa prezentovanim nalazima iz UPL nakon 28 dana ponavljane primene, odnosno u drugom slučaju sa nalazima PTZ testa nakon 21 dana ponavljane primene. S druge strane, rezultati studije sprovedene na primatima nakon dugotrajne primene zolpidema (u toku 78 dana) pokazuju da je sindrom obustave uzrokovan obustavom zolpidema komparabilan onom uzrokovanom obustavom klasičnih benzodiazepina (Weerts i sar., 1998). Ovaj nalaz potkrepljuje alternativnu pretpostavku da je aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu neophodna za razvoj fenomena nakon obustave ponavljane primene benzodiazepina. Nalazi iz PTZ testa nakon 28 dana podržavaju navedenu pretpostavku, sa važnom napomenom da je ta pretpostavka održiva nakon dugotrajne primene tretmana, ali ne i nakon tretmana kraćeg trajanja.

Posmatrani skupa, dobijeni rezultati sugerišu da antagonizam na nivou GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu nije dovoljan za konzistentnu prevenciju razvoja fizičke zavisnosti. Stoga, podržavaju prethodne sugestije da bi ligandi pošteđeni aktivnosti na receptorima koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu uz istovremeno redukovanu aktivnost na receptorima koji sadrže  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , ili  $\alpha_5$  podjedinicu mogli predstavljati potencijalne kandidate pogodne za dugotrajnu primenu sa smanjenim potencijalom izazivanja fizičke zavisnosti (Mirza i Nielsen, 2006; Ator i sar., 2010). Kada se imaju u vidu i rezultati

EKSPERIMENATA 2.1 i 2.2 treba napomenuti da bi moguća prednost ovih liganda bila posedovanje afiniteta za receptore koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, uz neutralnu efikasnost na ovom podtipu GABA<sub>A</sub> receptora. Naravno, ostaje pitanje indikacijskog područja za ovakve potencijalne “idealne ligande benzodiazepinsko veznog mesta”, s obzirom na izostanak aktivnosti na GABA<sub>A</sub> receptorima koji poseduju  $\alpha_1$  podjedinicu i smanjenu aktivnost na ostalim podtipovima GABA<sub>A</sub> receptora. Prema trenutnim podacima o ulozi podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u posredovanju efekata benzodiazepina, može se pretpostaviti da bi potencijal za izazivanje anksiolitičkog, miorelaksantnog i verovatno hipnotičkog, antikonvulzivnog i analgezijskog efekta bio zadržan (Savić i sar., 2004; Knabl i sar., 2008; Savić i sar., 2009; Milić i sar., 2012). Takođe, može se očekivati da bi ovi ligandi posedovali snižen potencijal izazivanja sedativnog efekta, kognitivnih oštećenja, oštećenja motorne koordinacije i eventualno adicije (Rudolph i sar., 1999; Tan i sar., 2010; Milić i sar., 2012).

## 6. ZAKLJUČAK

Dugotrajna primena benzodiazepina može dovesti do razvoja farmakoloških efekata tolerancije, odnosno slabljenja odgovora na lek, i fizičke zavisnosti, koja se manifestuje sindromom obustave po prekidu ponavljanog tretmana. Na osnovu sprovedenog istraživanja na pacovima mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Uticaj svakodnevnog rukovanja životinjama u cilju primene ponavljanog tretmana može da promeni bihevioralni odgovor pacova u sprovedenim procedurama usled razvoja adaptivnih promena ponašanja. Stoga je, prilikom sprovođenja istraživanja koja podrazumevaju svakodnevno, ponavljano rukovanje životinjama, neophodna procena potencijalnog uticaja same primenjene procedure na ponašanje životinja.

2. Promene u sedativnom i anksiolitičkom dejstvu diazepama nakon ponavljane primene jesu dozno-zavisni fenomeni i mogu se odraziti kroz ispoljavanje izraženijeg efekta nakon dugotrajne primene (senzitizacija efekta) ili slabljenje efekta nakon ponavljane primene (tolerancija). Ponavljana primena diazepama dovodi do gubitka miorelaksantnog dejstva, nezavisno od doze diazepama koja se koristi.

3. Slabljenje sedativnog efekta određene doze diazepama, ispitanog nakon ponavljane *i.p.* primene iste ili veće doze diazepama jednom ili dva puta dnevno, zapaža se u testu SLA već nakon tri dana ponavljane primene. Opisani fenomen prisustva oslabljenog efekta objašnjava se terminom parcijalne tolerancije.

4. Izostanak aktivnosti diazepama na GABA<sub>A</sub> receptorima koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, usled ponavljane primene  $\alpha_1$ -selektivnog neutralnog modulatora  $\beta$ CCt-a uz diazepam, olakšao je nastanak tolerancije na sedativno dejstvo diazepama nakon sedam dana ponavljane primene.

5. Produžena blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu, postignuta ponavljanom primenom  $\alpha_5$ -selektivnog neutralnog modulatora XLi093 uz diazepam, u

određenoj meri je ublažila razvoj tolerancije na sedativno dejstvo diazepama nakon sedam dana ponavljane primene.

6. Izostanak uticaja blokade GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  ili  $\alpha_5$  podjedinicu na efekte diazepama nakon tri dana ponavljane primene upućuju da su drugi adaptivni mehanizmi odgovorni za započinjanje razvoja tolerancije na sedativno dejstvo.

7. Razvoj fizičke zavisnosti na diazepam zavisi od faktora kao što su doza leka koja se primenjuje, put primene i dužina ponavljane primene, simptom ili znak koji se prati, kao i od njihove međusobne interakcije. Stanje nalik anksioznosti može se detektovati 24 h po poslednjoj primeni sedmodnevnog tretmana režimom dva puta dnevno, dok se nakon dvadeset jednog dana ponavljane primene diazepama jednom dnevno razvijaju povećan nivo anksioznosti i povećana osetljivost prema konvulzivnim napadima.

8. Sposobnost flumazenila, kao i  $\alpha_1$  selektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora –  $\beta$ CCt-a, da 24 h nakon poslednje primene diazepama akutno otklone anksioznost uzrokovanu obustavom ponavljane primene tretmana ukazuje da GABA<sub>A</sub> receptori u mozgu nakon obustave diazepama postaju osetljivi na modulaciju posredovanu neutralnim modulatorima na način da dovode do efekta nalik akutnoj primeni diazepama eksperimentalno naivnim životinjama.

9. Dugotrajni izostanak aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu ne utiče na razvoj povećanog nivoa anksioznosti nakon obustave ponavljane primene diazepama, što ukazuje na značajnu ulogu aktivacije ostalih, ne-  $\alpha_1$  podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju ovog simptoma zavisnosti.

10. Uloga aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u razvoju povećane osetljivosti prema konvulzivnim napadima nakon obustave ponavljane primene diazepama zavisi od dužine tretmana. Naime, produžena blokada ovog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora može olakšati razvoj fizičke zavisnosti nakon 21 dana ponavljane primene, dok je blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu pokazala sposobnost da prevenira povećanu osetljivost prema konvulzivnim napadima nakon obustave tretmana posle 28 dana.

Posmatrani skupa, rezultati istraživanja ukazuju da razvoj fenomena tolerancije na sedativno dejstvo i fizičke zavisnosti nakon ponavljane primene benzodiazepina nije vezan isključivo za najzastupljeniji podtip GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu. Stoga se može zaključiti da antagonizam na nivou GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu nije dovoljan za konzistentnu prevenciju razvoja tolerancije i fizičke zavisnosti, ali i da akutna blokada ovog podtipa receptora može sprečiti ispoljavanje povećanog nivoa anksioznosti, kao najčešće manifestacije fizičke zavisnosti. Dobijeni rezultati posredno upućuju da bi sinteza liganada koji poseduju afinitet ali ne i aktivnost na GABA<sub>A</sub> receptorima koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, udruženo sa smanjenom aktivnošću na drugim podtipovima GABA<sub>A</sub> receptora, mogla dovesti do razvoja kandidata sa suženim profilom neželjenih efekata pogodnih za dugotrajnu terapijsku primenu.

## 7. SPISAK LITERATURE

Ali NJ, Olsen RW. Chronic benzodiazepine treatment of cells expressing recombinant GABA(A) receptors uncouples allosteric binding: studies on possible mechanisms. *J Neurochem* 2001; 79: 1100-8.

Allison C, Pratt JA. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 171-95.

Aranko K, Mattila MJ, Seppälä T. Development of tolerance and cross-tolerance to the psychomotor actions of lorazepam and diazepam in man. *Br J Clin Pharmacol* 1983; 15: 545-52.

Ashton H. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. *Drugs* 1994; 48: 25-40.

Ashton H. The diagnosis and management of benzodiazepine dependence. *Curr Opin Psychiatry* 2005; 18: 249-55.

Atack JR, Wafford KA, Tye SJ, Cook SM, Sohal B, Pike A, et al. TPA023 [7-(1,1-dimethylethyl)-6-(2-ethyl-2H-1,2,4-triazol-3-ylmethoxy)-3-(2-fluorophenyl)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazine], an agonist selective for alpha2- and alpha3-containing GABAA receptors, is a nonsedating anxiolytic in rodents and primates. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 410-22.

Ator NA, Atack JR, Hargreaves RJ, Burns HD, Dawson GR. Reducing abuse liability of GABAA/benzodiazepine ligands via selective partial agonist efficacy at alpha1 and alpha2/3 subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332: 4-16.

Ator NA, Griffiths RR. Principles of drug abuse liability assessment in laboratory animals. *Drug Alcohol Depend* 2003; 70: S55-72.

Auta J, Impagnatiello F, Kadriu B, Guidotti A, Costa E. Imidazenil: a low efficacy agonist at alpha1- but high efficacy at alpha5-GABAA receptors fail to show anticonvulsant cross tolerance to diazepam or zolpidem. *Neuropharmacology* 2008; 55: 148-53.

Baldwin DS, Aitchison K, Bateson A, Curran HV, Davies S, Leonard B, et al. Benzodiazepines: risks and benefits. A reconsideration. *J Psychopharmacol* 2013; 27: 967-71.

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

Bateson AN. Basic pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 5-21.

Belzung C, Le Guisquet AM, Griebel G. Beta-CCT, a selective BZ-omega1 receptor antagonist, blocks the anti-anxiety but not the amnesic action of chlordiazepoxide in mice. *Behav Pharmacol* 2000; 11: 125-31.

Biggio G, Dazzi L, Biggio F, Mancuso L, Talani G, Busonero F, et al. Molecular mechanisms of tolerance to and withdrawal of GABA(A) receptor modulators. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13: 411-23.

Brodie MJ. Status epilepticus in adults. *Lancet* 1990; 336: 551-2.

Camí J, Farré M. Drug addiction. *N Engl J Med* 2003; 349: 975-86.

Carroll M, Woods IIJE, Seyoum RA, June HL. The role of the GABA A1 subunit in mediating the sedative and anxiolytic properties of benzodiazepines. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 2001; 25: 12A.

Christopoulos A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 198-210.



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

Costa E, Guidotti A, Mao CC, Suria A. New concepts on the mechanism of action of benzodiazepines. *Life Sci* 1975; 17: 167-85.

Costa E, Guidotti A. Benzodiazepines on trial: a research strategy for their rehabilitation. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17: 192-200.

Costa R, Tamascia ML, Nogueira MD, Casarini DE, Marcondes FK. Handling of adolescent rats improves learning and memory and decreases anxiety. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012; 51: 548-53.

Cox E, Hagen T, McKernan R, Cook JM, Bz1 receptor subtype specific ligands: synthesis and biological properties of  $\beta$ CCt, a Bz1 receptor subtype specific antagonist. *Medicinal Chemistry Research* 1995; 5: 710-8.

Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, et al. Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8980-5.

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

Das P, Lilly SM, Zerda R, Gunning WT 3rd, Alvarez FJ, Tietz EI. Increased AMPA receptor GluR1 subunit incorporation in rat hippocampal CA1 synapses during benzodiazepine withdrawal. *J Comp Neurol* 2008; 511: 832-46.

Dawson GR, Maubach KA, Collinson N, Cobain M, Everitt BJ, MacLeod AM, et al. An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABAA receptors enhances cognition. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1335-45.

Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 33-6.

Dell'osso B, Lader M. Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal. *Eur Psychiatry* 2013; 28: 7-20.

Dilsaver SC, Majchrzak MJ. Effects of placebo (saline) injections on core temperature in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1990; 14: 417-22.

dos Santos L, de Andrade TG, Graeff FG. Social separation and diazepam withdrawal increase anxiety in the elevated plus-maze and serotonin turnover in the median raphe and hippocampus. *J Psychopharmacol* 2010; 24: 725-31.

Elliot EE, White JM. Precipitated and spontaneous withdrawal following administration of lorazepam but not zolpidem. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66: 361-9.

Fahey JM, Grassi JM, Reddi JM, Greenblatt DJ. Acute zolpidem administration produces pharmacodynamic and receptor occupancy changes at similar doses. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 83: 21-7.

Fang SY, Chen CY, Chang IS, Wu EC, Chang CM, Lin KM. Predictors of the incidence and discontinuation of long-term use of benzodiazepines: a population-based study. *Drug Alcohol Depend* 2009; 104: 140-6.

Fernandes C, Arnot MI, Irvine EE, Bateson AN, Martin IL, File SE. The effect of treatment regimen on the development of tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam. *Psychopharmacology* 1999; 145: 251-9.

Fernandes C, File SE, Berry D. Evidence against oppositional and pharmacokinetic mechanisms of tolerance to diazepam's sedative effects. *Brain Res* 1996; 734: 236-42.

File SE. Rapid development of tolerance to the sedative effects of lorazepam and triazolam in rats. *Psychopharmacology* 1981; 73: 240-5.

File SE. Tolerance to the anti-pentylentetrazole effects of diazepam in the mouse. *Psychopharmacology* 1983; 79: 284-6.

File SE. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology* 1990; 100: 281-2.

File SE, Andrews N. Low but not high doses of buspirone reduce the anxiogenic effects of diazepam withdrawal. *Psychopharmacology* 1991; 105: 578-82.

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

File SE, Hitchcott PK. A theory of benzodiazepine dependence that can explain whether flumazenil will enhance or reverse the phenomena. *Psychopharmacology* 1990; 101: 525-32.

Fischer BD, Teixeira LP, van Linn ML, Namjoshi OA, Cook JM, Rowlett JK. Role of gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor subtypes in acute benzodiazepine physical dependence-like effects: evidence from squirrel monkeys responding under a schedule of food presentation. *Psychopharmacology* 2013; 227: 347-54.

Follesa P, Cagetti E, Mancuso L, Biggio F, Manca A, Maciocco E, et al. Increase in expression of the GABA(A) receptor alpha(4) subunit gene induced by withdrawal of, but not by long-term treatment with, benzodiazepine full or partial agonists. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 92: 138-48.

Fradley RL, Guscott MR, Bull S, Hallett DJ, Goodacre SC, Wafford KA, et al. Differential contribution of GABA(A) receptor subtypes to the anticonvulsant efficacy of benzodiazepine site ligands. *J Psychopharmacol* 2007; 21: 384-91.

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

Gallager DW, Heninger K, Heninger G. Periodic benzodiazepine antagonist administration prevents benzodiazepine withdrawal symptoms in primates. *Eur J Pharmacol* 1986; 132: 31-8.

Gerra G, Zaimovic A, Giusti F, Moi G, Brewer C. Intravenous flumazenil versus oxazepam tapering in the treatment of benzodiazepine withdrawal: a randomized, placebo-controlled study. *Addict Biol* 2002; 7: 385-95.

Gonsalves SF, Gallager DW. Spontaneous and RO 15-1788-induced reversal of subsensitivity to GABA following chronic benzodiazepines. *Eur J Pharmacol* 1985; 110: 163-70.

Greenblatt DJ, Shader RI. Long-term administration of benzodiazepines: pharmacokinetic versus pharmacodynamic tolerance. *Psychopharmacol Bull* 1986; 22: 416-23.

Griebel G, Perrault G, Letang V, Granger P, Avenet P, Schoemaker H, et al. New evidence that the pharmacological effects of benzodiazepine receptor ligands can be associated with activities at different BZ (omega) receptor subtypes. *Psychopharmacology* 1999; 146: 205-13.

Griebel G, Perrault G, Simiand J, Cohen C, Granger P, Depoortere H, et al. SL651498, a GABAA receptor agonist with subtype-selective efficacy, as a potential treatment for generalized anxiety disorder and muscle spasms. *CNS Drug Rev* 2003; 9: 3-20.

Griffiths RR, Weerts EM. Benzodiazepine self-administration in humans and laboratory animals--implications for problems of long-term use and abuse. *Psychopharmacology* 1997; 134: 1-37.

Heikkinen AE, Möykkynen TP, Korpi ER. Long-lasting modulation of glutamatergic transmission in VTA dopamine neurons after a single dose of benzodiazepine agonists. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34: 290-8.

Hogg RC, Buisson B, Bertrand D. Allosteric modulation of ligand-gated ion channels. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1267-76.

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

Hollister LE, Bennett JL, Kimbell I Jr, Savage C, Overall JE. Diazepam in newly admitted schizophrenics. *Dis Nerv Syst* 1963; 24: 746-50.

Hollister LE, Motzenbecker FP, Degan RO. Withdrawal reactions from chlordiazepoxide ("Librium"). *Psychopharmacologia* 1961; 2: 63-8.

Hood S, O'Neil G, Hulse G. The role of flumazenil in the treatment of benzodiazepine dependence: physiological and psychological profiles. *J Psychopharmacol* 2009; 23: 401-9.

Huang RQ, Dillon GH. Functional characterization of GABA(A) receptors in neonatal hypothalamic brain slice. *J Neurophysiol* 2002; 88: 1655-63.

Huang Q, He X, Ma C, Liu R, Yu S, Dayer CA, et al. 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.

Hunkeler W, Möhler H, Pieri L, Polc P, Bonetti EP, Cumin R, et al. Selective antagonists of benzodiazepines. *Nature* 1981; 290: 514-6.

Hutchinson MA, Smith PF, Darlington CL. The behavioural and neuronal effects of the chronic administration of benzodiazepine anxiolytic and hypnotic drugs. *Prog Neurobiol* 1996; 49: 73-97.

Impagnatiello F, Pesold C, Longone P, Caruncho H, Fritschy JM, Costa E, et al. Modifications of gamma-aminobutyric acidA receptor subunit expression in rat neocortex during tolerance to diazepam. *Mol Pharmacol* 1996; 49: 822-31.

Izzo E, Auta J, Impagnatiello F, Pesold C, Guidotti A, Costa E. Glutamic acid decarboxylase and glutamate receptor changes during tolerance and dependence to benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 3483-8.

Jacob TC, Michels G, Silayeva L, Haydon J, Succol F, Moss SJ. Benzodiazepine treatment induces subtype-specific changes in GABA(A) receptor trafficking and decreases synaptic inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 18595-600.

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

June HL, Foster KL, McKay PF, Seyoum R, Woods JE, Harvey SC, et al. The reinforcing properties of alcohol are mediated by GABA(A1) receptors in the ventral pallidum. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 2124-37.

Kaminski BJ, Sannerud CA, Weerts EM, Lamb RJ, Griffiths RR. Physical dependence in baboons chronically treated with low and high doses of diazepam. *Behav Pharmacol* 2003; 14: 331-42.

Khan A, Haleem DJ. Responsiveness of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in repeatedly diazepam-injected rats: a behavioral and neurochemical study. *Pharmacol Rep* 2008; 60: 716-24.

Knabl J, Witschi R, Hösl K, Reinold H, Zeilhofer UB, Ahmadi S, et al. Reversal of pathological pain through specific spinal GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Nature* 2008; 451: 330-4.

Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of addiction. *Neuron* 1998; 21: 467-76.

Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 217-38.

Lader M. Benzodiazepines revisited-will we ever learn? *Addiction* 2011; 106: 2086-109.

Lader MH, Morton SV. A pilot study of the effects of flumazenil on symptoms persisting after benzodiazepine withdrawal. *J Psychopharmacol* 1992; 6: 357-63.

Li X, Cao H, Zhang C, Furtmueller R, Fuchs K, Huck S, et al. Synthesis, in vitro affinity, and efficacy of a bis 8-ethynyl-4H-imidazo[1,5a]-[1,4]benzodiazepine analogue, the first bivalent alpha5 subtype selective BzR/GABA(A) antagonist. *J Med Chem* 2003; 46: 5567-70.

Licata SC, Rowlett JK. Abuse and dependence liability of benzodiazepine-type drugs: GABA(A) receptor modulation and beyond. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 74-89.

Löscher W. The pharmacokinetics of antiepileptic drugs in rats: consequences for maintaining effective drug levels during prolonged drug administration in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 2007, 48: 1245-58.

Löscher W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *Eur J Pharmacol* 2009; 610: 1-11.

Löscher W, Schmidt D. Experimental and clinical evidence for loss of effect (tolerance) during prolonged treatment with antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2006; 47: 1253-84.

Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 2000; 290: 131-4.

Lukas SE, Griffiths RR. Precipitated diazepam withdrawal in baboons: effects of dose and duration of diazepam exposure. *Eur J Pharmacol* 1984; 100: 163-71.

Lüscher B, Keller CA. Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* 2004; 102: 195-221.

Lüscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 2011; 69: 650-63.

Matsubara K, Matsushita A. Changes in ambulatory activities and muscle relaxation in rats after repeated doses of diazepam. *Psychopharmacology* 1982; 77: 279-83.

Maurissen JP, Marable BR, Andrus AK, Stebbins KE. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicol Teratol* 2003; 25: 543-53.

McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, et al. Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice. *Lab Anim* 2006; 40: 382-91.

McNamara RK, Skelton RW. Tolerance develops to the spatial learning deficit produced by diazepam in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 56: 383-9.

Mele L, Sagratella S, Massotti M. Chronic administration of diazepam to rats causes changes in EEG patterns and in coupling between GABA receptors and benzodiazepine binding sites in vitro. *Brain Res* 1984; 323: 93-102.

Milić M, Divljaković J, Rallapalli S, van Linn ML, Timić T, Cook JM, et al. The role of  $\alpha 1$  and  $\alpha 5$  subunit-containing GABAA receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rats. *Behav Pharmacol* 2012; 23: 191-7.

Miller NS, Gold MS. Benzodiazepines: tolerance, dependence, abuse, and addiction. *J Psychoactive Drugs* 1990; 22: 23-33.

Mintzer MZ, Griffiths RR. Flumazenil-precipitated withdrawal in healthy volunteers following repeated diazepam exposure. *Psychopharmacology* 2005; 178: 259-67.

Mintzer MZ, Stoller KB, Griffiths RR. A controlled study of flumazenil-precipitated withdrawal in chronic low-dose benzodiazepine users. *Psychopharmacology* 1999; 147: 200-9.

Mirza NR, Nielsen EØ. Do subtype-selective gamma-aminobutyric acid A receptor modulators have a reduced propensity to induce physical dependence in mice? *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1378-85.

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

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

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

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



Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, et al. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha subtype. *Nat Neurosci* 2000; 3: 587-92.

Nielsen M, Hansen EH, Gøtzsche PC. What is the difference between dependence and withdrawal reactions? A comparison of benzodiazepines and selective serotonin re-uptake inhibitors. *Addiction* 2012; 107: 900-8.

O'Brien CP. Benzodiazepine use, abuse, and dependence. *J Clin Psychiatry* 2005; 66: 28-33.

Ogris W, Pörtl A, Hauer B, Ernst M, Oberto A, Wulff P, et al. Affinity of various benzodiazepine site ligands in mice with a point mutation in the GABA(A) receptor gamma2 subunit. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1621-9.

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

Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 715-27.

Owen RT, Tyrer P. Benzodiazepine dependence. A review of the evidence. *Drugs* 1983; 25: 385-98.

Perrault G, Morel E, Sanger DJ, Zivkovic B. Lack of tolerance and physical dependence upon repeated treatment with the novel hypnotic zolpidem. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 298-303.

Pesold C, Caruncho HJ, Impagnatiello F, Berg MJ, Fritschy JM, Guidotti A, et al. Tolerance to diazepam and changes in GABA(A) receptor subunit expression in rat neocortical areas. *Neuroscience* 1997; 79: 477-87.

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

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

Pratt JA, Brett RR, Laurie DJ. Benzodiazepine dependence: from neural circuits to gene expression. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 59: 925-34.

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.

Rodgers RJ, Johnson NJ. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52: 297-303.

Rosenberg HC. Differential expression of benzodiazepine anticonvulsant cross-tolerance according to time following flurazepam or diazepam treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 51: 363-8.

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

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

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. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 475-98.

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

Sanna E, Busonero F, Talani G, Carta M, Massa F, Peis M, et al. Comparison of the effects of zaleplon, zolpidem, and triazolam at various GABA(A) receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 2002; 451: 103-10.

Savić MM, Huang S, Furtmüller R, Clayton T, Huck S, Obradović DI, et al. Are GABAA receptors containing alpha5 subunits contributing to the sedative properties of benzodiazepine site agonists? *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 332-9.

Savić MM, Majumder S, Huang S, Edwankar RV, Furtmüller R, Joksimović S, et al. 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, et al. 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, Ugresić ND, Cook JM, Yin W, Bokonjić DR. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the elevated plus-maze: differential antagonism by flumazenil and beta-CCt. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 79: 279-90.

Saxon L, Hjemdahl P, Hiltunen AJ, Borg S. Effects of flumazenil in the treatment of benzodiazepine withdrawal--a double-blind pilot study. *Psychopharmacology* 1997; 131: 153-60.

Schmitt U, Hiemke C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacol Biochem Behav* 1998a; 59: 807-11.

Schmitt U, Hiemke C. Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998b; 22: 1197-215.

Schneider P, Ho YJ, Spanagel R, Pawlak CR. A novel elevated plus-maze procedure to avoid the one-trial tolerance problem. *Front Behav Neurosci* 2011; 5: 43.

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

Smith PF, Darlington CL. Rapid tolerance to the depressive effects of diazepam on guinea pig motor control using divided doses. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 48: 535-8.

Smith KS, Rudolph U. Anxiety and depression: mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABA(A) receptor subtypes. *Neuropharmacology* 2012; 62: 54-62.

Stephens DN. A glutamatergic hypothesis of drug dependence: extrapolations from benzodiazepine receptor ligands. *Behav Pharmacol* 1995; 6: 425-46.

Stock H, Foradori C, Ford K, Wilson MA. A lack of tolerance to the anxiolytic effects of diazepam on the plus-maze: comparison of male and female rats. *Psychopharmacology* 2000; 147: 362-70.

Study RE, Barker JL. Diazepam and (–)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 7180-4.

Szara SI. Benzodiazepines: a review of research results, 1980. Introduction. *NIDA Res Monogr* 1980; 33: 1-3.

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

Tan KR, Rudolph U, Lüscher C. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci* 2011; 34: 188-97.

Tehrani MH, Barnes EM Jr. Agonist-dependent internalization of gamma-aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors in chick cortical neurons. *J Neurochem* 1991; 57: 1307-12.

Tehrani MH, Barnes EM Jr. Identification of GABAA/benzodiazepine receptors on clathrin-coated vesicles from rat brain. *J Neurochem* 1993; 60: 1755-61.

Tietz EI, Zeng XJ, Chen S, Lilly SM, Rosenberg HC, Kometiani P. Antagonist-induced reversal of functional and structural measures of hippocampal benzodiazepine tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 932-42.

Tretter V, Moss SJ. GABA(A) Receptor Dynamics and Constructing GABAergic Synapses. *Front Mol Neurosci* 2008; 1: 7.

Uusi-Oukari M, Korpi ER. Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 97-135.

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

Van Sickle BJ, Tietz EI. Selective enhancement of AMPA receptor-mediated function in hippocampal CA1 neurons from chronic benzodiazepine-treated rats. *Neuropharmacology* 2002; 43: 11-27.

Van Sickle BJ, Xiang K, Tietz EI. Transient plasticity of hippocampal CA1 neuron glutamate receptors contributes to benzodiazepine withdrawal-anxiety. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1994-2006.

Vinkers CH, Olivier B. Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA(A) Receptor Modulators? *Adv Pharmacol Sci* 2012; doi: 10.1155/2012/416864.

Vlainić J, Perićić D. Effects of acute and repeated zolpidem treatment on pentylenetetrazole-induced seizure threshold and on locomotor activity: comparison with diazepam. *Neuropharmacology* 2009; 56: 1124-30.

Weerts EM, Ator NA, Grech DM, Griffiths RR. Zolpidem physical dependence assessed across increasing doses under a once-daily dosing regimen in baboons. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 41-53.

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

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

Wright BT, Gluszek CF, Heldt SA. The effects of repeated zolpidem treatment on tolerance, withdrawal-like symptoms, and GABAA receptor mRNAs profile expression in mice: Comparison with diazepam. *Psychopharmacology* 2014 Feb 15. [Epub ahead of print]

Zeng XJ, Tietz EI. Benzodiazepine tolerance at GABAergic synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Synapse* 1999; 31: 263-77.

Zhang W, Koehler KF, Zhang P, Cook JM. Development of a comprehensive pharmacophore model for the benzodiazepine receptor. *Drug Des Discov* 1995; 12: 193-248.

## BIOGRAFIJA

Jovana Kovačević (rođena Divljaković) rođena je 31. oktobra 1984. u Čačku. Osnovnu i srednju školu završila je u Čačku, kao nosilac Vukove diplome. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 2003/04. godine. U toku studija bila je dobitnik stipendija Opštine grada Čačka i Ministarstva prosvete Republike Srbije. U septembru 2008. godine diplomirala je sa prosečnom ocenom 9,10.

Školske godine 2008/09. upisala je doktorske-akademske studije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu, modul farmakologija. Od januara 2009. zaposlena je u zvanju istraživač pripravnik na projektu koji finansira Ministarstvo nauke, Republike Srbije.

U martu 2011. godine izabrana je u zvanje asistenta na Katedri za farmakologiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Aktivno učestvuje u pripremi i izvođenju nastave na dodiplomskim i specijalističkim studijama iz predmeta farmakologija i farmakoterapija. Od strane studenata, ocenjivana je najvišim ocenama (iznad 4,90) za kvalitet praktične nastave. Koautor je poglavlja u udžbeniku Farmakoterapija za farmaceute.

Kao student poslediplomskih studija Jovana Kovačević se bavila naučno-istraživačkim radom u okviru kojeg je bila angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. projekta OI 175 076) do septembra 2013. godine.

Od septembra 2013. godine naučno-istraživački rad nastavlja kao istraživač u okviru Evropskog projekta Marie Sklodowska-Curie na institutu Center for Neurogenomics and Cognitive research, Vrije Universiteit u Amsterdamu, Holandija.