

## NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno–naučnog veća Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, održanoj 19.06.2014. godine, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata diplomiranog farmaceuta Jovane Kovačević (rođeno Divljaković), asistenta na Katedri za farmakologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komisija u sastavu:

1. Dr Miroslav Savić, vanredni profesor, mentor, predsednik komisije, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
2. Dr Nenad Ugrešić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
3. Dr Dubravko Bokonjić, redovni profesor, Univerzitet odbrane u Beogradu, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije,

pregledala je priloženu disertaciju pod naslovom:

**„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“**

i Nastavno–naučnom veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu podnosi sledeći

## IZVEŠTAJ

### A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom: „**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**“ sadrži sedam poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Na početku rada priložen je Rezime na srpskom i engleskom jeziku (Abstract), a na kraju rada kratka biografija kandidata.

Tekst disertacije je napisan na 125 strana, 136 sa sadržajem i sažecima na srpskom i engleskom. Disertacija sadrži 27 slika i 5 tabela u Rezultatima. Pregled literature sadrži 152 navoda.

**UVOD** se sastoji iz pet delova napisanih na 26 strana, od kojih svaki sadrži informacije koje su od značaja za predmet proučavanja ove doktorske disertacije. U prvom delu Uvoda, kandidatkinja se osvrnula na istorijske aspekte otkrića i primene benzodiazepina. U navedenom poglavlju kandidatkinja navodi literaturne podatke o potencijalu benzodiazepina za razvojem fenomena tolerancije i zavisnosti nakon dugotrajne primene. U drugom delu Uvoda, kandidatkinja opisuje mehanizam dejstva benzodiazepina počevši od strukture GABA<sub>A</sub> receptora. Nakon uvođenja pojmova ortosternog i alosternog veznog mesta, kandidatkinja ukazuje na farmakološki značaj alosternih modulatora GABA<sub>A</sub> receptora. U nastavku navedenog poglavlja posebno su obrađeni ligandi benzodiazepinskog veznog mesta, i to pozitivni, negativni i neutralni modulatori GABA<sub>A</sub> receptora. U trećem delu Uvoda, opisan je pristup povezivanju farmakoloških efekata benzodiazepina i aktivacije određenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora. Ukratko su opisani pristupi istraživanjima efekata liganada benzodiazepinskog veznog mesta primenom genetski modifikovanih životinja i farmakološki pristup. Kandidatkinja se osvrnula na značaj dostignuća postignut primenom navedenih pristupa. U četvrtom, za sprovedeno istraživanje najbliže vezanom delu Uvoda, kandidatkinja je sumirala literaturne podatke o fenomenima koji se razvijaju nakon ponavljane primene benzodiazepina: tolerancije, zavisnosti i adikcije. U okviru svakog od navedenih fenomena, kandidatkinja se posebno bavila definisanjem navedenog fenomena, pretpostavljenim mehanizmima koji dovode do razvoja fenomena i uloge aktivacije određenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju navedenih farmakoloških efekata nakon ponavljane primene. U petom poglavlju Uvoda, kandidatkinja je istakla značaj daljih istraživanja na polju tolerancije i zavisnosti, povezujući prethodno navedene činjenice i ograničenja prethodnih istraživanja, i ukazala na tekuće pravce u istraživanjima.

Osnovni **CILJ ISTRAŽIVANJA** bio je da se ispita uticaj režima primene diazepama na razvoj fenomena tolerancije i fizičke zavisnosti, praćeno 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 poglavlju **MATERIJAL I METODE** na 17 strana date su osnovne informacije o eksperimentalnim uslovima i životinjama, supstancama koje su korišćene u istraživanju (diazepam, flumazenil, 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) i  $\beta$ CCt ( $\beta$  karbolin-3-karboksilat-t-butil estar)) i aparatima koji su korišćeni u eksperimentalnom radu. U nastavku poglavlja opisani su testovi i modeli korišćeni za procenu motorne aktivnosti (test spontane lokomotorne aktivnosti), anksioznosti (uzdignuti plus lavirint), mišićnog tonusa (test jačine stiska) i osetljivosti prema konvulzivnim napadima (intravenski pentilentetrazolski test). Takođe je opisana metoda određivanja koncentracije liganada u plazmi i mozgu. U narednom delu navedenog poglavlja opisani su primenjeni eksperimentalni protokoli ponavljane primene tretmana sa tabelarnim prikazima tretmana. U poslednjem delu ovog poglavlja detaljno su opisane statističke metode (jedno- i dvo-faktorske ANOVA-e sa ponavljanjem ili bez njega) korišćene za obradu rezultata sprovedenih eksperimenata. U svim eksperimentima, razlike na nivou  $p < 0,05$  uzimane su kao statistički značajne, dok su razlike  $0,1 > p > 0,05$  smatrane trendom. Ukoliko su uticaji faktora bili statistički značajni, *post hoc* poređenja vršena su primenom Tukey ili Student Newman Keuls testova. Statistička analiza je sprovedena komercijalnim statističkim softverima SigmaPlot 11.0 ili ANY-maze. Sve predložene i korišćene metode su odgovarajuće i u skladu su sa savremenim zahtevima naučnoistraživačkog rada u relevantnoj oblasti. Takođe, sve korišćene metode su omogućile dobijanje rezultata na osnovu kojih je moguće doneti adekvatne naučne zaključke.

**REZULTATI** su prikazani na 36 stranice teksta, uključujući 27 slika i 5 tabelarnih prikaza, sa detaljnom statističkom obradom ispitivanih parametara za svaki od eksperimenata.

**DISKUSIJA** (26 strana) je podeljena na šest odeljaka. Kroz kompletnu diskusiju dobijenih rezultata, kandidatkinja je na sveobuhvatan i razumljiv način iznela svoje zaključke i hipoteze, koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije, a u svetlu rezultata drugih istraživačkih grupa iz istog ili srodnih naučnih polja.

U poglavlju **ZAKLJUČCI** navedena su najznačajnija zapažanja i zaključci, koji su u skladu sa dobijenim rezultatima i ciljevima istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 152 reference citirane harvardskim stilom.

## **B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

Uticaj svakodnevnog rukovanja životinjama u cilju primene odgovarajućeg tretmana na ponašanje nakon primene rastvarača ili akutne primene diazepamima u dozi 2 mg/kg ispitan je poređenjem grupa kojima je navedeni tretman primenjen jednokratno sa grupama koje su navedeni tretman primile nakon 14 dana primene rastvarača. Primenjena dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da se ponašanje životinja nije razlikovalo u testovima za procenu motorne aktivnosti, nivoa anksioznosti i jačine stiska. U daljem toku istraživanja za procenu

razvoja tolerancije sve životinje su prošle identičnu proceduru, tako da su i kontrolne životinje primale tretman rastvaračem svakodnevno.

Eksperimenti sprovedeni sa ciljem ispitivanja uticaja doze diazepama korišćene tokom ponavljano tretmana na razvoj tolerancije na praćene farmakološke efekte pokazali su da su razvoj tolerancije na sedativno i anksiolitičko dejstvo dozno-zavisni fenomeni. Naime, analiza rezultata je pokazala da se tolerancija na sedativno dejstvo 2 mg/kg diazepama razvija nakon ponavljane primene iste ili veće doze diazepama tokom 14 dana, jednom dnevno, izraženo kroz izostanak razlika u ukupnom pređenom putu između grupa ponavljano tretiranih diazepamom u dozi 2 mg/kg ili 10 mg/kg i kontrolne grupe tretirane rastvaračem. S druge strane, tolerancija na anksiolitičko dejstvo 2 mg/kg diazepama se razvija jedino nakon ponavljane primene veće doze diazepama, dok ponavljana primena iste doze dovodi do potenciranja anksiolitičkog efekta. Dalji eksperimenti su pokazali da se nakon ponavljane primene diazepama u dozi 2 mg/kg ili 5 mg/kg dva puta dnevno slabljenje sedativnog dejstva diazepama razvija već nakon tri dana. Zapaženi fenomen slabljenja sedativnog efekta u testu spontane lokomotorne aktivnosti odražava se kroz statistički značajno povećanje ukupnog pređenog puta i pređenog puta u perifernoj zoni u odnosu na akutnu primenu diazepama u odgovarajućoj dozi, uz istovremeno značajno smanjenje pređenog puta u odnosu na kontrolne grupe. Analiza rezultata po 5-minutnim intervalima pokazala je da se oslabljeni sedativni efekat diazepama nakon ponavljane primene obično javlja kroz odloženi nastup dejstva, ili kraće trajanje efekta.

Eksperimenti sprovedeni sa ciljem ispitivanja uloge aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu na razvoj tolerancije na sedativno dejstvo diazepama pokazali su da ponavljana blokada navedenog podtipa receptora olakšava razvoj tolerancije na praćeni efekat nakon 7 dana ponavljane primene. Zapaženi efekat izražen je kroz statistički značajno povećanje ukupnog pređenog puta i pređenog puta u perifernoj zoni u odnosu na grupu ponavljano tretiranu diazepamom. Dodatno je pokazano da blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu tokom tri dana ne utiče na razvoj tolerancije. U okviru ovog eksperimenta određene su koncentracije diazepama i  $\alpha_1$ - selektivnog neutralnog modulatora  $\beta$ CCt-a u krvi i mozgu. Analiza dobijenih rezultata je pokazala da su koncentracije  $\beta$ CCt-a u krvi i mozgu izmerene neposredno nakon testiranja, a 16 sati nakon poslednje primene, najmanje 50 puta niže od koncentracija diazepama primenjenog pre testiranja, na osnovu čega se ne očekuje da je prisustvo neutralnog modulatora moglo da utiče na dalje tumačenje dobijenih rezultata bihevioralnog testiranja.

Nasuprot, ponavljana blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu delimično je otežala razvoj tolerancije na sedativno dejstvo, izraženo kroz izostanak povećanog pređenog puta u centralnoj zoni u odnosu na akutnu primenu diazepama (5 mg/kg) koji je zapažen nakon ponavljane primene diazepama u dozi 5 mg/kg u toku 7 dana. Analiza pređenog puta po 5-minutnim intervalima je pokazala da istovremena primena XLi093, selektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu, uz diazepam, dovodi do bržeg nastupa sedativnog dejstva u odnosu na ponavljano primenu samog diazepama (za prvih 5 minuta praćenja:  $p = 0,004$ ). Kao i u slučaju blokade GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, ponavljana blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu tokom 3 dana nije uticala na razvoj tolerancije na sedativno dejstvo diazepama.

Eksperimenti sprovedeni sa ciljem da se ispita uticaj doze, dužine primene i vremena nakon prekida tretmana na ispoljavanje povećanog nivoa anksioznosti kao znaka fizičke zavisnosti pokazali su da se povećan nivo anksioznosti u uzdignutom plus lavirintu može detektovati 24 h nakon prekida ponavljane primene diazepama 2 mg/kg u toku 7 ili 14 dana, dva puta dnevno. Zapaženi efekat je izražen kroz značajno smanjenje procenta vremena provedenog u otvorenim kracima, procenta ulazaka u otvorene krake i vremena provedenog u distalnim delovima otvorenih kraka nakon 14 dana ponavljane primene tretmana.

Obustave primene diazepama u dozi 2 mg/kg jednom dnevno u toku 21 dana, dovela je do povećanog nivoa anksioznosti 24 h nakon obustave tretmana, bez obzira da li je pre testiranja u uzdignutom plus lavirintu primenjen rastvarač ili nije. Akutna primena neselektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora flumazenila, nesposredno pre testiranja, uspela je da otkloni povećan nivo anksioznosti uzrokovan obustavom primene diazepama i dovela do efekta nalik anksiolitičkom dejstvu diazepama. Efekat flumazenila zapaža se kroz značajno povećanje procenta vremena provedenog u otvorenim kracima i procenta ulazaka u otvorene krake u poređenju sa grupom kojoj je obustavljen diazepam, uz istovremeni izostanak razlika u odnosu na grupu kojoj je akutno primenjen diazepam u dozi 2 mg/kg.

Uloga GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u ispoljavanju povećanog nivoa anksioznosti ispitana je primenom  $\beta$ CCt-a neposredno pre testiranja u uzdignutom plus lavirintu. Blokada navedenog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora uspela je da spreči odgovor nalik anksigenom, i zapaženi efekat je pokazao određenu doznu-zavisnost. Naime, dok je primena  $\beta$ CCt-a u sve tri doze: 1,25 mg/kg, 5 mg/kg ili 20 mg/kg uspela da značajno poveća procenat vremena provedenog u otvorenim kracima, jedino je primena dve veće doze uspela da poveća procenat ulazaka u otvorene krake.

Dugotrajnom blokadom GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu, primenom  $\beta$ CCt-a, ispitana je uloga navedenog podtipa receptora u mehanizmima odgovornim za razvoj fizičke zavisnosti, praćeno kroz povećan nivo anksioznosti i povećanu osetljivost prema konvulzivnim napadima. Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da produžena blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu tokom 21 dana može olakšati razvoj fizičke zavisnosti, praćeno kroz sniženje praga konvulzivne aktivnosti u odnosu na samu obustavu diazepama. S druge strane, produžena blokada istog podtipa receptora tokom 28 dana pokazala je sposobnost da prevenira povećanu osetljivost prema konvulzivnim napadima izazvanim pentilentetrazolom, detektovano nakon obustave ponavljane primene diazepama. Dugotrajni izostanak aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu nije uticao na razvoj povećanog nivoa anksioznosti, praćeno u uzdignutom plus lavirintu nakon 14, 21 ili 28 dana ponavljane primene tretmana.

### **C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE**

Prethodna istraživanja su pokazala da svakodnevno rukovanje životinjama može promeniti eksplorativnu aktivnost i nivo anksioznosti životinje (Schmitt i Hiemke, 1998a; Costa i sar., 2012) i dodatno uticati na farmakološki odgovor primenjenog tretmana (Hogg, 1996). Stoga je na početku ove disertacije ispitan uticaj rukovanja na ponašanje životinja u testovima za procenu motorne aktivnosti, nivoa anksioznosti i mišićne snage. Rezultati eksperimenta su

pokazali 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 nije se razlikovao između grupa kojima je prethodno rukovano u odnosu na grupu kojoj je tretman primenjen jednokratno.

U skladu sa prethodno publikovanim rezultatima koji ukazuju da se tolerancija na sedativno dejstvo diazepama razvija nakon 3 dana ponavljane primene tretmana (File i Fernandes, 1994), rezultati ove disertacije su potvrdili oslabljeni sedativni efekat detektovan nakon 3 dana. Oslabljeno sedativno dejstvo diazepama u skladu je sa prethodno opisanim fenomenom parcijalne tolerancije koji se može pronaći u rezultatima studije Vlainić i Peričić (2009). Dodatni doprinos ove disertacije je u tome što su rezultati pokazali da se oslabljeni sedativni efekat, razvijen u određenom obimu nakon 3 dana, ne povećava daljim produžetkom terapije ni do 14 dana. Rezultati ove disertacije su pokazali da ukoliko je doza diazepama koja se koristi tokom ponavljane primene ista kao i doza koja se primeni pre procene motorne aktivnosti, izostaju uticaji režima i dužine primene na razvoj tolerancije na sedativno dejstvo.

Razvoj tolerancije na anksiolitičko dejstvo benzodiazepina i dalje predstavlja predmet debate (Hutchinson i sar., 1996). U 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). Dobijeni rezultati 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.

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 (Matsubara i Matsushita, 1982). Prikazani rezultati pokazuju da ponavljana primena diazepama, nezavisno od korišćene doze, dovodi do gubitka efekta mišićne relaksacije nakon primene 2 mg/kg 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). Otuda je u ovoj disertaciji upotrebljen 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. Prethodna studija sprovedena na genetski modifikovanim miševima ukazala je na značajnu ulogu GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  i  $\alpha_5$  podjedinicu u razvoju tolerancije na sedativno dejstvo benzodiazepina (van Rijnsoever i sar., 2004). Stoga se rezultati ove disertacije, koji pokazuju da izostanak aktivacije  $\alpha_1$  podtipa GABA<sub>A</sub> receptora olakšava razvoj tolerancije na praćeni sedativni efekat, mogu smatrati suprotnim prethodnom nalazu na genetski modifikovanim životinjama. Ipak, važno je imati u vidu da studija na genetski modifikovanim miševima nije mogla na adekvatan način da ispita ulogu navedenog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora u razvoju fenomena tolerancije na sedativno dejstvo diazepama, s obzirom da je akutni sedativni efekat

izostao kod mutiranih životinja. Dodatno, izmerene koncentracije diazepama i  $\beta$ CCt-a neposredno nakon testiranja ukazuju da 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, što bi moglo da utiče na dalje tumačenje rezultata.

S druge strane, rezultati eksperimenta nakon ponavljane primene Xli093,  $\alpha_5$  selektivnog neutralnog modulatora GABA<sub>A</sub> receptora, uz diazepam, upućuju 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).

U pogledu na razvoj fizičke zavisnosti, rezultati ove disertacije pokazuju da se povećan nivo anksioznosti 24 h po obustavi diazepama može detektovati nakon ponavljane primene 2 mg/kg jednom dnevno, *i.p.* putem u toku 21 dana, što je u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima (File i Andrews, 1991). Povećana osetljivost prema konvulzivnim napadima se takođe detektuje nakon 21 dana ponavljane primene tretmana. Posmatrani zajedno, rezultati iz disertacije potvrđuju sugestiju o bezbednosti intermitentne primene nižih doza diazepama u periodu od jedne do dve sedmice (Ashton, 1994).

Prethodne studije su pokazale da primena flumazenila 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 oksazepam tokom nekoliko dana po obustavi prethodne primene benzodiazepina (Gerra i sar., 2002, Hood i sar., 2009). Rezultati ove disertacije su u skladu sa nalazima da akutna primena flumazenila nakon obustave ponavljane primene diazepama može da otkloni povećan nivo anksioznosti kod životinja (File i Hitchott, 1990). Zapaženi efekat flumazenila prikazan u disertaciji bio je sličan akutnom efektu diazepama, što je u skladu sa zaključkom koji su izneli File i Hitchott (1990), da uticaj flumazenila na anksioznost zavisi od nivoa anksioznosti životinje.

U ovoj disertaciji ispitano je 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. Po prvi put je primenom neutralnog modulatora pokazano da blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu može da otkloni povećan nivo anksioznosti uzrokovan prekidom ponavljane primene diazepama i dovede do efekta komparabilnog primeni neselektivnog neutralnog modulatora flumazenila.

U pogledu na ulogu aktivacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u razvoju fenomena fizičke zavisnosti, prethodna istraživanja su ukazala na značaj ovog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora u promenama ponašanja koje su povezane 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 je u ovoj disertaciji, primenom farmakološkog pristupa produžene blokade GABA<sub>A</sub> receptora

koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu  $\beta$ CCt-om, uz diazepam, ispitana uloga ovog podtipa receptora u razvoju fizičke zavisnosti, praćeno 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. U navedenom eksperimentu, promene u nivou anksioznosti zabeležene su tek nakon 28 dana ponavljane primene. Prikazani rezultati upućuju da produžena blokada  $GABA_A$  receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu nije dovoljna da spreči razvoj povećanog nivoa anksioznosti tokom obustave diazepam, što ukazuje na značajnu ulogu aktivacije ostalih, ne-  $\alpha_1$  podtipova  $GABA_A$  receptora, u razvoju povećanog nivoa anksioznosti. Rezultati pentilentetrazolskog testa nakon 21 dana ponavljane primene pokazuju da obustava ponavljane primene diazepam uz  $\beta$ CCt dodatno povećava osetljivost prema konvulzivnim napadima nakon obustave tretmana, što sugeriše da aktivacija  $GABA_A$  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 suprotni onima nakon 28 dana ponavljane primene, kada je antagonizam efekata posredovanih  $GABA_A$  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. Posmatrano u svetlu publikovanih rezultata, različito učešće  $GABA_A$  receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u mehanizmima koji dovode do razvoja fizičke zavisnosti na benzodiazepine može se povezati sa prethodno publikovanim rezultatima sa zolpidemom, dominantno  $\alpha_1$ -selektivnim pozitivnim alosternim modulatorom  $GABA_A$  receptora. Naime, studije koje su ispitivale povećanu osetljivost prema konvulzivnim 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); s druge strane, rezultati studije sprovedene na primatima nakon dugotrajne primene zolpidema (u toku 78 dana) pokazali su da je sindrom obustave komparabilan onom uzrokovanom obustavom klasičnih benzodiazepina (Weerts i sar., 1998).

## LITERATURA

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

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.

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

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lader MH, Morton SV. A pilot study of the effects of flumazenil on symptoms persisting after benzodiazepine withdrawal. *J Psychopharmacol* 1992; 6: 357-63.
- Matsubara K, Matsushita A. Changes in ambulatory activities and muscle relaxation in rats after repeated doses of diazepam. *Psychopharmacology* 1982; 77: 279-83.
- 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.
- 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.

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.

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.

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.

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 pentylentetrazole-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.

#### **D. OBJAVLJENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE**

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u vidu tri rada u časopisima koji su na SCI listi ( kategorija M22).

#### **RADOVI U ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA**

1. Kovačević J, Timić T, Tiruveedhula VV, Batinić B, Namjoshi OA, Milić M, Joksimović S, Cook JM, Savić MM. Duration of treatment and activation of  $\alpha$ 1-containing GABAA receptors variably affect the level of anxiety and seizure susceptibility after diazepam withdrawal in rats. *Brain Res Bull* 2014; 104: 1-6. (M22)
2. Divljaković J, Milić M, Namjoshi OA, Tiruveedhula VV, Timić T, Cook JM, Savić MM.  $\beta$ CCCT, an antagonist selective for  $\alpha$ (1)GABA(A) receptors, reverses diazepam withdrawal-induced anxiety in rats. *Brain Res Bull* 2013; 91: 1-7. (M22)
3. Divljaković J, Milić M, Timić T, Savić MM. Tolerance liability of diazepam is dependent on the dose used for protracted treatment. *Pharmacol Rep* 2012; 64: 1116-25. (M22)

## E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Ova studija je utvrdila da dugotrajna primena diazepama može dovesti do razvoja farmakoloških efekata tolerancije i fizičke zavisnosti, koja se manifestuje sindromom obustave po prekidu ponavljanoog tretmana, i pokazala ulogu GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  i  $\alpha_5$  podjedinicu u razvoju praćenih fenomena.

Kandidatkinja je u disertaciji na sveobuhvatan način izučavala uticaj različitih faktora na razvoj tolerancije i fizičke zavisnosti, počevši od uticaja svakodnevnog rukovanja i primene rastvarača, a zatim je nakon validacije primenjenog protokola izučavala uticaje režima primene diazepama na praćene fenomene. Doprinos ovog dela disertacije ogleda se u nalazima da se tolerancija na sedativno dejstvo razvija nakon 3 dana ponavljane primene diazepama, i da se stepen tolerancije ne produbljuje sa daljim nastavkom tretmana. U pogledu na razvoj fizičke zavisnosti, kandidatkinja je pokazala značaj istovremenog praćenja više od jednog znaka ili simptoma, tako što je na istoj grupi životinja procenjen prag konvulzivne aktivnosti nakon procene nivoa anksioznosti. Rezultati ukazuju na potencijal razvoja fizičke zavisnosti nakon 21 dana ponavljane primene diazepama, praćeno kroz povećanje nivoa anksioznosti i povećanu osetljivost prema konvulzivnim napadima.

U ovoj disertaciji ispitana je i uloga GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  i  $\alpha_5$  podjedinicu u razvoju tolerancije na sedativno dejstvo diazepama i fizičke zavisnosti. Selektivnom blokadom određenih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora primenom selektivnih neutralnih modulatora  $\beta$ CCt i Xli093, kao do sada jedinstvenim pristupom istraživanju efekata benzodiazepina nakon dugotrajne primene, pokazano je da selektivna blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu u određenoj meri olakšava razvoj tolerancije na sedativno dejstvo, dok selektivna blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu odlaže razvoj tolerancije na praćeni efekat. U pogledu razvoja fizičke zavisnosti, uloga GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu prevashodno je pokazana kroz sposobnost  $\beta$ CCt-a da otkloni povećan nivo anksioznosti nakon prekida primene tretmana. S druge strane, produžena blokada ovog podtipa receptora nije uticala na promene u nivou anksioznosti izazvane prekidom primene diazepama. Dodatno, kandidatkinja je pokazala da mehanizmi koji se nalaze u osnovi fenomena fizičke zavisnosti zavise od simptoma ili znaka koji se prati i dužine ponavljane primene. Tako je u pentilentetrazolskom testu pokazano da produžena blokada GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_1$  podjedinicu može olakšati razvoj fizičke zavisnosti nakon 21 dana ponavljane primene, dok je u istom eksperimentu pokazano da blokada navedenog podtipa GABA<sub>A</sub> receptora može da prevenira povećanu osetljivost prema konvulzivnim napadima nakon obustave tretmana posle 28 dana.

## F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom „**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**“, kandidata diplomiranog farmaceuta Jovane Kovačević, po svom sadržaju i formi, dobro napisanom opštem, uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, zadovoljavajuće osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima ispunjava sve kriterijume adekvatno napisanog naučnog dela.

Komisija, stoga, sa zadovoljstvom predlaže Nastavno–naučnom veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu da prihvati pozitivan izveštaj o izrađenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom „**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**“ i kandidatu diplomiranom farmaceutu Jovani Kovačević odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

KOMISIJA:

BEOGRAD, 26.08.2014.

---

Dr Miroslav Savić, vanredni profesor,  
mentor i predsednik komisije  
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

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

---

Prof. dr Dubravko Bokonjić, redovni profesor  
Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije