

## UNIVERZITET U BEOGRADU – FARMACEUTSKI FAKULTET

### NASTAVNO–NAUČNOM VEĆU

#### KOMISIJI ZA DOKTORSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno–naučnog veća Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, održanoj 11.06. 2015. godine, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Tamare Timić Stameniće, zaposlene kao istraživač saradnik na projektu „Bihejvioralni efekti ponavljane primene novosintetisanih supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA<sub>A</sub> receptora: poređenje sa standardnim psihofarmakološkim lekovima“ (projekat br. 175076).

Komisija u sastavu:

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

pregledala je priloženu disertaciju pod naslovom:

**„Uticaj modulacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu na poremećaje ponašanja pacova izazvane primenom dizocilpina, skopolamina i amfetamina”**

i Nastavno–naučnom veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu podnosi sledeći

# IZVEŠTAJ

## A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom: „**Uticaj modulacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu na poremećaje ponašanja pacova izazvane primenom dizocilpina, skopolamina i amfetamina**”, 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.

Disertacija je napisana na 176 strana, a sadrži 74 slike (11 u Uvodu, 61 u Rezultatima i 2 u Diskusiji) i 43 tabele (2 u Uvodu, 1 u Materijalima i metodama i 40 u Rezultatima). Pregled literature sadrži 260 navoda.

**UVOD** se sastoji iz tri dela napisana na 28 strana, od kojih svaki sadrži informacije koje su od značaja za predmet proučavanja ove doktorske disertacije. U prvom delu uvoda kandidat je naveo ključne informacije o  $\gamma$ -aminobuternoj kiselini (GABA), najvažnijem inhibitornom neurotransmiteru, lokalizaciji različitih GABA<sub>A</sub> receptora i farmakološkom značaju njihove modulacije. Posebno je opisana uloga GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu (u daljem tekstu,  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora), pre svega u kognitivnim procesima shodno specifičnoj lokalizaciji datog podtipa receptora. U drugom delu Uvoda opisuju se dobro validirani animalni modeli farmakološki indukovano g deficita koji su korišćeni za ispitivanje selektivnih modulatora  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora. Treće poglavlje je posvećeno efektima agonista i inverznih agonista na BDZ mestu vezivanja  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora u različitim pretkliničkim, kao i kliničkim istraživanjima. U ovom poglavlju posebna je pažnja posvećena rezultatima skorijih studija koje su ispitivale ulogu pozitivne i negativne modulacije ovih receptora u poremećajima povezanim sa shizofrenijom (Gill i sar., 2011; Redrobe i sar., 2012; Gill i Grace, 2014) i Daunovim sindromom (Martínez-Cué i sar., 2014). U poslednjem delu Uvoda dat je pregled novosintetisanih supstanci koje su po afinitetu i efikasnosti selektivne za  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptore. Posebno su prikazani *in vitro* profili – afiniteti i efikasnosti na

rekombinantno dobijenim GABA<sub>A</sub> receptorima – supstanci sintetisanih u laboratoriji prof. Cook-a (University of Wisconsin—Milwaukee, SAD), čija bihevioralna aktivnost predstavlja predmet istraživanja ove disertacije.

Osnovni **CILJ ISTRAŽIVANJA** bio je da se, kroz bihevioralnu karakterizaciju supstanci sa dokazanom *in vitro* selektivnošću za  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptore, istraži uticaj modulacije ove populacije receptora na promene ponašanja oglednih pacova *Wistar* soja izazvane trima standardnim farmakološkim agensima: amfetaminom, skopolaminom i dizocilpinom (MK-801). U cilju utvrđivanja u kojoj meri pojedini modulatori prolaze krvno–moždanu barijeru, određivane su ukupne i procenjivane slobodne koncentracije u plazmi i moždanom tkivu pacova. Povezivanjem podataka procenjenih slobodnih koncentracija u mozgu nakon primene različitih doza testiranih modulatora sa elektrofiziološkom efikasnošću, ispitanom u saradničkoj laboratoriji u Centru za istraživanje mozga na Medicinskom univerzitetu u Beču, Austrija, težilo se procenjivanju selektivnosti za GABA<sub>A</sub> receptore sa različitim podjedinicama koja se postiže u *in vivo* uslovima.

U okviru poglavlja **MATERIJAL I METODE** (13 strana) date su osnovne informacije o ispitivanim supstancama: amfetaminu, skopolaminu, MK-801, diazepamu, haloperidolu, neselektivnom inverznom agonisti GABA<sub>A</sub> receptora (DMCM), kao i inverznom agonisti (PWZ-029) i agonistima BDZ mesta vezivanja  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora (MP-III-022, MP-III-004, SH-053-2'F-R-CH3, SH-I-75 i SH-I-047). Sva bihevioralna ispitivanja, kao i određivanje koncentracije izabranih supstanci u plazmi i moždanom tkivu, sprovedena su na zdravim albino pacovima *Wistar* soja, muškog pola, starosti 8–10 nedelja, telesne mase 200–250 g, odgajanim na farmi Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Detaljno su opisane metode korišćene za određivanje koncentracije izabranih supstanci u plazmi i moždanom tkivu pacova, kao i metodologija *in vitro* određivanja slobodnih frakcija. U posebnom delu su opisani korišćeni bihevioralni testovi: test lokomotorne aktivnosti (praćenje spontanog kretanja i efekta na farmakološki izazvanu hiperaktivnost), test prepoznavanja novog objekta (NORT; prati uticaj na vizuelnu diskriminaciju poznatog i novog objekta, kao vid deklarativne memorije), Morisov vodeni lavirint (procena sposobnosti prostornog učenja) i procedura socijalne diskriminacije. Navedeni su eksperimenti i doze ispitivanih pozitivnih i negativnog

modulatora GABA<sub>A</sub> receptora, kao i doze standardnih predstavnika antipsihotika (haloperidol) i anksiolitika (diazepam). U okviru ovog poglavlja opisani su pristupi obrade dobijenih podataka iz različitih testova i statistika korišćena za analizu podataka dobijenih praćenjem bihevioralnih parametara. U svim eksperimentima, razlike na nivou  $p < 0,05$  uzimane su kao statistički značajne, dok su razlike  $0,1 > p > 0,05$  smatrane trendom. *Post hoc* poređenja vršena su Student–Newman–Keuls testom (SNK). Analize su sprovedene komercijalnim statističkim softverima Sigma Plot 11.0 i Sigma Plot 12.0. Sve predložene i korišćene metode su odgovarajuće i u skladu su sa savremenim zahtevima naučnoistraživačkog rada u relevantnoj oblasti. Animalni modeli korišćeni u disertaciji su dobro validirani i sa zadovoljavajućom translacijskom validnošću.

**REZULTATI** su prikazani na 81 stranici teksta, uključujući 61 sliku i 40 tabela, sa detaljnom statističkom obradom ispitivanih parametara za svaki od *in vitro* i bihevioralnih eksperimenata.

**DISKUSIJA** (25 strana) je podeljena na šest odeljaka, pri čemu je u poslednjem data opšta diskusija, a u prvih pet razmatrani su efekti dobijeni u pojedinim bihevioralnim testovima i u *in vitro* karakterizaciji supstanci. Kroz kompletnu diskusiju dobijenih rezultata, kandidat je na sveobuhvatan, razumljiv i izbalansiran način izneo svoje zaključke i hipoteze, koje 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. Na kraju ovog poglavlja dat je i kratak opis **ZNAČAJA REZULTATA**.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 260 referenci citiranih harvardskim stilom.

## **B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

Pri proceni *in vitro* profila ispitivanih supstanci utvrđeno je da svi testirani modulatori GABA<sub>A</sub> receptora prolaze krvno-moždanu barijeru. Farmakokinetički parametri, izračunate slobodne frakcije i metabolička stabilnost pokazali su prisutnost liganada u moždanom tkivu

nakon *i.p.* primene svih bihevioralno testiranih doza. Dobijena je i adekvatna selektivnost pri određenom opsegu doza za modulaciju  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora za agoniste i inverznog agonistu BDZ mesta vezivanja  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora.

U testovima farmakološki izazvane hiperaktivnosti preventivne efekte su ostvarivali antipsihotik haloperidol (0,25 mg/kg) i diazepam (5 mg/kg), ali u dozama koje ispoljavaju izražen sedativni potencijal. Negativnom modulacijom se mogao delimično suzbiti samo hiperlokomotorni efekat, ne i efekat povećanja vremena koje ogleđna životinja provodi u aktivnosti, dok je pozitivna modulacija  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora bila bez preventivnog dejstva na indukovane promene.

Ispitana je hipoteza postavljena u disertaciji da pozitivnom i negativnom modulacijom  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora može da se utiče na kognitivne deficite povezane sa shizofrenijom. Korišćeni inverzni agonist BDZ mesta vezivanja  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora PWZ-029 bihevioralno je već okarakterisan (Savić i sar., 2008). U disertaciji je po prvi put ispitan uticaj PWZ-029 u NORT-u na zdravim životinjama, i potvrđen je prokognitivni efekat testiranih doza. Testiran u doznom opsegu pri kome se postižu selektivni efekti preko  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora, PWZ-029 je ostvario preventivne efekte kod poremećaja deklarativne (NORT) i prostorne memorije (Morisov vodeni lavirint) izazvane sa MK-801. Ovi efekti su zapaženi sa dozom od 5 mg/kg u NORT-u i 2 mg/kg u vodenom lavirintu, pri čemu je u testu prostorne memorije ostvaren parcijalan uticaj. U skopolaminom-indukovanom poremećaju kognitivnih sposobnosti PWZ-029 je ostvario efekat pri dozi od 2 mg/kg. S druge strane, nije imao uticaja na socijalno prepoznavanje oštećeno delovanjem antagoniste NMDA receptora MK-801.

Sa pozitivnim modulatorima  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora, ispitanim u modelima kojima se izazivaju promene u smislu hiperaktivacije, koje se povezuju sa pozitivnim simptomima viđenim u shizofreniji, nisu dobijeni prevenirajući efekti. Slično, ispitivanje uticaja pozitivne modulacije u testovima kognitivne disfunkcije u vodenom lavirintu nije dalo rezultate koji bi ukazivali na mogućnost preveniranja kognitivnih aspekata oštećenja izazvanih korišćenim farmakološkim agensima.

## C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Povezivanjem procenjenih slobodnih koncentracija liganada u moždanom tkivu i elektrofizioloških nalaza na rekombinantnim receptorima dobijenim u saradničkoj laboratoriji na Medicinskom univerzitetu u Beču procenjena je selektivnost modulacije pojedinih podtipova GABA<sub>A</sub> receptora. Selektivnosti supstanci doprinosi i njihov afinitet za određene GABA<sub>A</sub> receptore, što se dodatno mora uzeti u obzir pri povezivanju bihejvioralnih efekata sa pojedinim podtipovima receptora. Dosadašnji rezultati dobijeni sa negativnim modulatorima  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora pokazali su da se potencijalno terapijski prokognitivni efekat kod životinja, kao i ljudi može dobiti pri okupiranosti populacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora u obimu između 25 i 75% (Atack, 2010). Iako nije utvrđeno koja od selektivnosti, po afinitetu ili efikasnosti, ima veću ulogu u tumačenju bihejvioralnih efekata, teži se sintezi liganada koji će po *in vitro* profilu ispoljiti oba tipa selektivnosti (Buettelmann i sar., 2009).

U eksperimentima sa amfetaminom indukovanom hiperaktivnošću preventivni efekat je ostvaren sa haloperidolom, što je u skladu sa literaturnim podacima na glodarima (Stanhope i sar., 2001). Poslednjih godina u supstance sa potencijalnim antipsihotičkim efektom, koje zahtevaju dalja istraživanja, ubrajaju se i one selektivne za  $\alpha_5$  podjedinicu GABA<sub>A</sub> receptora. Ispitivan je uticaj negativnog (RO4938581) i pozitivnog modulatora  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora (QH-II-066) na amfetaminom-izmenjeno ponašanje u testu lokomotorne aktivnosti (Redrobe i sar., 2012). Interesantno je da su, prema literaturnom navodu, oba vida modulacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora smanjila hiperaktivnost, bez uticaja na bazalni nivo kretanja. Rezultati ove studije sa pozitivnim modulatorom (QH-II-066) u skladu su sa efektima pozitivne modulacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora (SH-053-2'F-R-CH3) u preveniranju amfetaminom indukovane hiperaktivnosti u MAM neurorazvojnog modela shizofrenije kod pacova (Gill i sar., 2011). Iako iznenađujuće, ovim istraživanjima je pokazano da oba vida modulacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora, pozitivne i negativne, mogu imati povoljan efekat, u smislu suzbijanja pozitivnih simptoma shizofrenije. Shodno ovim rezultatima, u eksperimentima prikazanim u disertaciji ispitivani su efekti jednog negativnog modulatora (PWZ-029) i nekoliko selektivnih pozitivnih modulatora (MP-III-022, MP-III-004, SH-I-047, SH-053-2'F-R-CH3 i SH-I-75) na hiperaktivnost izazvanu amfetaminom. Rezultati dobijeni sa PWZ-029, u ispitivanom rasponu

doza, nisu otkrili potencijalan povoljan uticaj negativne modulacije. Imajući na umu sedativni potencijal haloperidola, kao i hipoaktivnost koju mogu da izazovu više doze negativnih modulatora  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora (Savić i sar., 2008), može se zaključiti da je inherentni potencijal tipičnih antipsihotika da preveniraju efekte amfetamina superioran u poređenju sa negativnim modulatorima  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora (Sun i sar., 2009). Rezultati dobijeni sa pozitivnim modulatorima takođe upućuju na nemogućnost reverzije hiperaktivnosti izazvane amfetaminom.

Protektivni uticaj diazepama je viđen i kod ženki pacova, koje ispoljavaju veću osetljivost na hiperlokomotorne efekte MK-801, ali je doza diazepama koja je uspela da izvrši reverziju stereotipnog ponašanja i hiperlokomocije bila toliko velika (5 mg/kg) da je uticala na refleks uspravljanja (Andiné i sar., 1999), što pokazuje neselektivnost uticaja na ponašanje. U eksperimentima prikazanim u disertaciji diazepam je samo u najvećoj testiranoj dozi (5 mg/kg) delimično prevenirao hiperlokomociju izazvanu sa MK-801 (0,2 mg/kg). Pozitivni i negativni modulatori  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora nisu do sada ispitivani u modelima MK-801-indukovane hiperaktivnosti. U disertaciji predočeni rezultati su pokazali da se pri većim ispitivanim dozama negativnog modulatora ispoljava parcijalno smanjenje hiperlokomocije, bez efekta na vreme provedeno u aktivnosti. Slično nalazima sa MK-801, eksperiment sa skopolaminom-indukovanom hiperaktivnošću ukazao je, praćenjem pređenog puta, na parcijalno protektivni efekat negativnog modulatora PWZ-029, ali ne i pozitivnog modulatora  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora SH-I-75.

Negativni modulatori  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora su u nizu bihevioralnih testova dobro okarakterisani kao potencijalno prokognitivne supstance (Ballard i sar., 2009; Atack, 2010; Soto i sar., 2013). PWZ-029 je sada po prvi put ispitan u NORT-u kao testu deklarativne memorije. Praćenjem parametara prepoznavanja novog objekta (vremena provedena u istraživanju poznatog i novog objekta i diskriminacioni indeks), jasno je uočen prokognitivni potencijal PWZ-029. Dobijeni rezultat nadopunjuje nalaze da pri sistemskoj i centralnoj (peririnalni korteks) primeni benzodiazepini ostvaruju oštećujući efekat u NORT-u, i potvrđuje ulogu GABA-ergičkog sistema u regulaciji ovakvog vida učenja (Wan i sar., 2004; Bertaina-Anglade i sar., 2006). U pomenutim studijama korišćeni su neselektivni agonisti

BDZ mesta vezivanja, te rezultat iz disertacije po prvi put pokazuje da se pozitivan efekat može ostvariti sistemskom primenom inverznog agoniste BDZ mesta vezivanja selektivnog za  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptore kod zdravih pacova, što upućuje na bitnu ulogu koju ova populacija GABA<sub>A</sub> receptora ima u ovakvom tipu memorijskih procesa. Dodatno je pokazan protektivni efekat PWZ-029 na oštećenja u NORT-u sa antagonistom NMDA receptora (MK-801) i antagonistom muskarinskih receptora (skopolamin). Rezultati dobijeni u fenciklidinom indukovanom modelu hipofunkcije NMDA receptora konzistentni su sa onima iz disertacije; subhronična primena fenciklidina je smanjivala sposobnost diskriminacije, dok je negativna modulacija  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora postignuta primenom RO4938581 dozno-zavisno prevenirala promene u kognitivnim procesima (Redrobe i sar., 2012). Uticaj pozitivne modulacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora na efekte u NORT-u nije ispitan, jer je u studiji sa QH-II-066, umereno selektivnim agonistom BDZ mesta vezivanja na  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptorima, nađeno značajno smanjenje sposobnosti diskriminacije objekata u odnosu na kontrolne životinje (Redrobe i sar., 2012).

Po prvi put, uloga negativne i pozitivne modulacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora ispitivana je praćenjem uticaja liganada na smanjenje sposobnosti učenja izazvano MK-801 u vodenom lavirintu. Preventivni efekat, iako delimičan, ostvaren je sa inverznim agonistom BDZ mesta vezivanja  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora PWZ-029. Kod smanjenja prostorne memorije indukovano primenom skopolamina, takav uticaj negativne modulacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora nije viđen. U protokolu sličnom onom korišćenom u disertaciji pokazano je da inverzni agonist i antagonist BDZ mesta vezivanja GABA<sub>A</sub> receptora, S8510 odnosno CGS8216, preveniraju skopolaminom indukovano smanjenje kognicije u Morisovom vodenom lavirintu (Kawasaki i sar., 1996), ali i da predstavnik neselektivnih inverznih agonista BDZ mesta vezivanja GABA<sub>A</sub> receptora, FG7142, koji je pokazivao prokognitivni potencijal kod zdravih životinja (Cole i Hillmann, 1994), nije uspeo da umanjí kognitivni deficit izazvan skopolaminom u vodenom lavirintu (Kawasaki i sar., 1996). Zbirno, ovi nalazi upućuju na kompleksnost izazivanja deficita u Morisovom vodenom lavirintu primenom skopolamina, kao i tešku predvidljivost uticaja različitih liganada koji modulišu GABA-ergičku transmisiju.



Pokazano je da antagonisti NMDA receptora smanjuju kognitivne aspekte vezane za socijalno prepoznavanje (Zou i sar., 2008; Brigman i sar., 2009; Moy i sar., 2013). Uticaj modulacije GABA-ergičkog sistema na aspekte socijabilnosti i socijalnog prepoznavanja nije mnogo istraživano, ali je pokazano da diazepam kod miševa može povećati vreme u interakciji sa drugom životinjom, bez posledičnog uticaja na socijalno prepoznavanje (Riedel i sar., 2009). U istraživanju u disertaciji, inverzni agonist BDZ mesta vezivanja  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora ni u jednoj od testiranih doza nije uspeo da prevenira deficit u socijalnoj kogniciji izazvan primenom MK-801.

#### LITERATURA

- Andiné P, Widermark N, Axelsson R, Nyberg G, Olofsson U, Mårtensson E, Sandberg M. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290: 1393–408.
- Atack JR. Preclinical and clinical pharmacology of the GABAA receptor alpha5 subtype-selective inverse agonist alpha5IA. *Pharmacol Ther* 2010; 125: 11–26.
- Ballard TM, Knoflach F, Prinssen E, Borroni E, Vivian JA, Basile J, Gasser R, Moreau JL, Wettstein JG, Buettelmann B, Knust H, Thomas AW, Trube G, Hernandez MC. RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABAA alpha5 subunit-containing receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 2009; 202: 207–23.
- Bertaina-Anglade V, Enjuanes E, Morillon D, Drieu la Rochelle C. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006; 54: 99–105.
- Brigman JL, Ihne J, Saksida LM, Bussey TJ, Holmes A. Effects of Subchronic Phencyclidine (PCP) Treatment on Social Behaviors, and Operant Discrimination and Reversal Learning in C57BL/6J Mice. *Front Behav Neurosci* 2009; 3: 2.
- Buettelmann B, Ballard TM, Gasser R, Fischer H, Hernandez MC, Knoflach F, Knust H, Stadler H, Thomas AW, Trube G. Imidazo[1,5-a][1,2,4]-triazolo[1,5-d][1,4]benzodiazepines as potent and highly selective GABAA alpha5 inverse agonists with potential for the treatment of cognitive dysfunction. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 5958–61.

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

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

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

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

Martínez-Cué C, Delatour B, Potier MC. Treating enhanced GABAergic inhibition in Down syndrome: use of GABA  $\alpha 5$ -selective inverse agonists. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 46: 218–27.

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

Redrobe JP, Elster L, Frederiksen K, Bundgaard C, de Jong IE, Smith GP, Bruun AT, Larsen PH, Didriksen M. Negative modulation of GABAA  $\alpha 5$  receptors by RO4938581 attenuates discrete sub-chronic and early postnatal phencyclidine (PCP)-induced cognitive deficits in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2012; 221: 451–68.

Riedel G, Kang SH, Choi DY, Platt B. Scopolamine-induced deficits in social memory in mice: reversal by donepezil. *Behav Brain Res* 2009; 204: 217–25.

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

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

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

Sun T, Hu G, Li M. Repeated antipsychotic treatment progressively potentiates inhibition on phencyclidine-induced hyperlocomotion, but attenuates inhibition on amphetamine-induced hyperlocomotion: relevance to animal models of antipsychotic drugs. *Eur J Pharmacol* 2009; 602: 334–42.

Wan H, Warburton EC, Zhu XO, Koder TJ, Park Y, Aggleton JP, Cho K, Bashir ZI, Brown MW. Benzodiazepine impairment of perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 2214–24.

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

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

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u vidu dva rada u časopisima koji su na SCI listi (kategorija M21), kao i kroz pet saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanim u izvodu.

### **RADOVI U VRHUNSKIM MEĐUNARODNIM ČASOPISIMA (M21)**

1. **Timić Stamenić T**, Joksimović S, Biawat P, Stanković T, Marković B, Cook JM, Savić MM. Negative modulation of  $\alpha 5$  GABAA receptors in rats may partially prevent memory impairment induced by MK-801, but not amphetamine- or MK-801-elicited hyperlocomotion. *J Psychopharmacol* 2015 Jun 23. [Epub ahead of print] (IF 2014: 3.593)
2. Milić M, **Timić T**, Joksimović S, Biawat P, Rallapalli S, Divljaković J, Radulović T, Cook JM, Savić MM. PWZ-029, an inverse agonist selective for  $\alpha(5)$  GABA(A) receptors, improves object recognition, but not water-maze memory in normal and scopolamine-treated rats. *Behav Brain Res* 2013; 241: 206-13. (IF 2013: 3,391)

### **SAOPŠTENJA SA MEĐUNARODNIH SKUPOVA ŠTAMPANA U IZVODU (M34)**

1. **Timić Stamenić T**, Santrač A, Divović B, Poe M, Cook J, Savić M. Effects of positive alpha5-selective modulation of GABAA receptors on amphetamine-induced hyperlocomotion. European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Workshop Neuropsychopharmacology, Nice, France, 12-15.3.2015. *European Neuropsychopharmacology* 2015; 25 (Suppl 1): S38-39.
2. **Timić Stamenić T**, Joksimović S, Milić M, Batinić B, Poe MM, Cook JM, Savić MM. Positive modulation at alpha5GABAA receptors is not beneficial for cognitive deficits induced by MK-801 in water maze in rats. 27th Congress of the European College of Neuropsychopharmacology (ECNP), Berlin, Germany, 18-21.10.2014. *European Neuropsychopharmacology* 2014; 24 (Suppl 2): S325.

3. **Timić T**, Joksimović S, Obradović ALj, Poe MM, Biawat P, Ramerstorfer J, Roth BL, Sieghart W, Cook JM, Savić MM. MK-801-induced hyperlocomotion in rats is affected by modulation of  $\alpha_5$ -containing GABAA receptors. 26th Congress of the European College of Neuropsychopharmacology (ECNP), Barcelona, Spain, 5-9.10.2013. *European Neuropsychopharmacology* 2013; 23 (Suppl 2): S259-260.
4. Joksimović S, Obradović ALj, **Timić T**, Radulović T, Biawat P, Kovacević J, Milić M, Batinić B, Cook JM, Savić MM. PWZ-029 alleviates MK-801-induced memory deficits in the rat: implications for the treatment of cognitive impairment in schizophrenia. 26th Congress of the European College of Neuropsychopharmacology (ECNP), Barcelona, Spain, 5-9.10.2013. *European Neuropsychopharmacology* 2013; 23 (Suppl 2): S260.
5. Joksimović SM, **Timić T**, Radulović T, Rallapalli S, Milinković MM, Divljaković JM, Batinić B, Cook JM, Savić MM. Effects of PWZ-029, an  $\alpha_5$  GABAA receptor inverse agonist, on scopolamine-induced spatial learning deficits in the water maze. 25th Congress of the European College of Neuropsychopharmacology (ECNP), Viena, Austria, 13-18.10.2012. *European Neuropsychopharmacology* 2012; 22 (Suppl 2): S190-S191.

## **E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE**

Rezultati studija na transgenim životinjama i sa ligandima selektivnim za  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptore upućuju na regulatornu ulogu modulacije ove populacije receptora u kognitivnim funkcijama. Posljednjih godina intenzivirana su istraživanja efekata modulacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora u kognitivnim deficitima povezanim sa shizofrenijom, Daunovim sindromom i Alzheimerovom bolešću. Savremeni nalazi upućuju i na značaj efekata postignutih delovanjem preko  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora u toku ranog razvoja, te se ova grupa receptora izdvaja kao potencijalna terapijska opcija kod neurorazvojnih bolesti. U disertaciji dobijeni protektivni efekti negativne modulacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora potkrepljuju opravdanost aktuelnih ispitivanja inverznih agonista BDZ mesta vezivanja selektivnih za  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptore u shizofreniji i drugim poremećajima u kojima, pored ostalog, postoji i komponenta kognitivnog deficita. U većini bihevioralnih testova kojima se testiraju kognitivne

sposobnosti životinja, supstance koje imaju optimizovani farmakološki profil i odgovarajuće selektivnosti u modulaciji  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora pokazuju postojanje odnosa doze i efekta u obliku obrnutog slova „J“ ili „U“. Određivanjem ukupne koncentracije liganada i procenjivanjem njihovih slobodnih koncentracija u plazmi i moždanom tkivu potvrđen je selektivni efekat na  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptore. Opsežna *in vitro* karakterizacija omogućila je odabir adekvatnog doznog opsega za bihejvioralna ispitivanja. Jasan doprinos rezultata ove disertacije ogleda se i u istraživanju efekata pozitivne modulacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptore u dobro validiranim animalnim modelima i testovima. Dok je poslednjih godina povećan broj studija koje se bave efektima pozitivne modulacije  $\alpha_5$  GABA<sub>A</sub> receptora na učenje i pamćenje, retki su rezultati ispitivanja efekata pozitivne modulacije ovih receptora u modelima relevantnim za shizofreniju. Efekti dobijeni u modelima sa farmakološki indukovim poremećajima ponašanja dokazano imaju veću translacionu validnost i rezultati dobijeni u ovako dizajniranim studijama odlikuje dobra komplementarnost sa efektima dobijenim kod pacijenata u kliničkim istraživanjima.

## **F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija pod nazivom „**Uticaj modulacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu na poremećaje ponašanja pacova izazvane primenom dizocilpina, skopolamina i amfetamina**”, kandidata dipl. farm. Tamare Timić Stamenić, 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 „**Uticaj modulacije GABA<sub>A</sub> receptora koji sadrže  $\alpha_5$  podjedinicu na poremećaje ponašanja pacova izazvane primenom dizocilpina, skopolamina i amfetamina**” i kandidatu dipl. farm. Tamari Timić Stamenić odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

**KOMISIJA:**

**BEOGRAD, 02.07.2015.**

---

Prof. dr Miroslav Savić, vanredni profesor – mentor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Prof. dr Nenad Ugrešić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Prof. dr Dubravko Bokonjić, redovni profesor  
Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije  
Univerzitet odbrane u Beogradu