

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Milica S. Gajić Bojić

**Vaskularna aktivnost pozitivnih alosternih  
modulatora GABA<sub>A</sub> receptora kod pacova**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET



Milica S. Gajić Bojić

**Vaskularna aktivnost pozitivnih alosternih  
modulatora GABA<sub>A</sub> receptora kod pacova**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY



Milica S. Gajić Bojić

**Vascular activity of GABA<sub>A</sub> receptor positive  
allosteric modulators in the rats**

Doctoral dissertation

Beograd, 2024.

Doktorska disertacija urađena je na Katedri za farmakologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Dijelovi eksperimentalne studije sprovedeni su u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, te u Centru za biomedicinska istraživanja, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjaluci.

MENTOR

---

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

ČLANOVI KOMISIJE

---

Dr Ranko Škrbić, redovni profesor,  
Univerzitet u Banjaluci – Medicinski fakultet

---

Dr Bojan Marković, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

---

Dr Anja Santrač, naučni saradnik  
Syneos Health, Beograd

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## Zahvalnica

*Mentoru, prof. dr Miroslavu Saviću, dugujem ogromnu zahvalnost na prenešenom znanju i iskustvu, na dragocjenom usmjeravanju u istraživačkom radu i na izrazitoj predanosti i pomoći u realizaciji ove doktorske disertacije. Osjećaj ogromnog poštovanja njegove ličnosti, naučnog rada i pristupa poslu rezultat su saradnje sa mojim mentorom, a na dragocjenom iskustvu i savjetima u načinu pristupanja životnim izazovima dugujem mu neizmjernu zahvalnost.*

*Veliku zahvalnosti i poštovanje dugujem prof. dr Ranku Škrbiću za nesebičnu pomoć, podršku, razumijevanje i stručne sugestije koje su učinile ovaj rad boljim. Prof. dr Ljiljani Amidžić veliko hvala za izdvojeno vrijeme i pomoć u realizaciji ove doktorske disertacije. Bez saradničkih laboratorija profesora James Cook-a (University of Wisconsin—Milwaukee, SAD) i profesora Margot Ernst i Petra Scholze (Center for Brain Research, Medical University Vienna, Austrija) ovo istraživanje ne bi bilo moguće, i na tome im hvala.*

*Zahvaljujem se Goranu Jankoviću, Jovani Aranđelović, Aleksandri Vidojević, Branki Divović, Mariji Marinko, Bojanu Batiniću, Jovanki Blagojević i Dejanu Mitroviću sa Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na razumijevanju, entuzijazmu i pomoći u sprovođenju ovog istraživanja. Posebnu zahvalnost dugujem Anji Santrač, kolegici i prijatelju, koja je savjetima i nesebičnom, stalnom podrškom doprinijela realizaciji ove disertacije. Zahvaljujem se kolegama Đorđu Đukanoviću, Nataši Vojinović, Uglješi Maličeviću, Biljani Gatarić i Nebojši Kovačeviću Mandiću, te ostalim kolegama iz Centra za biomedicinska istraživanja, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjaluci, na radu i podršci kojima su doprinijeli istraživanjima.*

*Veliku zahvalnost dugujem prijateljima Dejani Vidojević i Draganu Ružiću, na razumijevanju, nesebičnoj podršci i brizi tokom trajanja istraživanja. Zajednički početak doktorskih studija sa Dejanom, priprema i polaganje ispita, te različiti životni izazovi, doživljaji i iskustva prerasli su u kumstvo i veliko prijateljstvo.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem kolegama iz Fonda zdravstvenog osiguranaja Republike Srpske, Nataši Grubiši, Slobodanu Kusturiću i Aleksandru Sekuliću, koji su mi omogućili da nesmetano obavljam istraživanja i koji su imali razumijevanja i pružali podršku tokom izrade ove disertacije.*

*Prof. dr Svjetlani Stoisavljević Šatari, prof. Ranku Škrbiću, prof. Milošu Stojiljkoviću, prof. dr Lani Nežić i prof. dr Nataši Stojaković zahvaljujem se na ukazanom povjerenju na Katerdi za farmakologiju i podržci u planiranju i realizaciji mnogobrojnih aktivnosti.*

*Posebno sam zahvalna mojoj porodici, mojim roditeljima i mojoj sestri na ljubavi i brizi. Najveću zahvalnost dugujem svojoj majci Milkici, jer su njena podrška, pomoć, savjeti, ljubav i njeno požrtvovanje u toku cijelih studija za mene od najvećeg značaja.*

*Gospodinu Miroslavu Miladinovu dugujem neizmjernu zahvalnost, jer bez njegove podrške i entuzijazma ova disertacija ne bi postojala.*

## SKRAĆENICE I AKRONIMI

ACE – angiotenzin konvertujući enzim (eng. *angiotensin-converting enzyme*)

ANOVA – analiza varijanse (statistički test)

ANT – translokator adenin nukleotida (eng. *adenine nucleotide translocator*)

ARF – G-protein ADP-ribozilacija faktor (eng. *G-protein ADP-ribosylation factors*)

BIG2 – Brefeldin A-inhibiran GDP/GTP izmjenjivački faktor 2 (eng. *Brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2*)

bp – bazni par

BZD – benzodiazepin/i/sko/ski

CaMK-II – Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin- zavisna kinaza II

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

cDNK – komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

cGMP – ciklični gvanozin monofosfat

CNS – centralni nervni sistem

DAB – 3,3'-diaminobenzidin tetrahlorid

DMSO – dimetilsulfoksid

ER – endoplazmatski retikulum

FE – fenilefrin

FGFR – receptor fibroblastnih faktora rasta (eng. *fibroblast growth factor receptor*)

GABA – gama-aminobuterna kiselina (eng. *gamma-aminobutyric acid*)

GABA<sub>A</sub>R – GABA<sub>A</sub> receptor

GABA<sub>A</sub>RAP – protein vezan sa GABA<sub>A</sub>R (eng. *GABA<sub>A</sub>R associated protein*)

GABA-T – gama-aminobutirat-transaminaza (eng. *gamma -aminobutyrate transaminase*)

GAD – glutamat dekarboksilaza (eng. *glutamic acid decarboxylase*)

GATE-16 – protein ATP-aza pojačivač od 16 kDa koji je udružen sa Goldžijevim aparatom (eng. *Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa*)

GLP – glukagonu sličan peptid (eng. *glucagon like peptide*)

GODZ – Goldži-specifičan DHHC protein cinkovih prstiju (eng. *Golgi-specific DHHC zinc finger protein*)

GPCR – receptori vezani za G proteine (eng. *G protein-coupled receptor*)

GRIF-1 – faktor interakcije sa GABA<sub>A</sub>R 1 (eng. *GABA<sub>A</sub> receptor interacting factor-1*)

HAP1 – protein 1 povezan sa Huntingtinom (eng. *Huntingtin-associated protein 1*)

HE – hematoksilin-eozin

HRP – peroksidaza hrena (eng. *horseradish peroxidase*)

IAP – protein povezan sa integrinom (eng. *integrin-associated protein, CD47*)

i.p. – intraperitonealno

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina

KCl – kalijum hlorid

KO – genetski nokaut (eng. *knock out*)

LMD – laserska mikrodisekcija (eng. *laser microdissection*)

MLC – laki lanac miozina (eng. *myosin light chain*)

NAM – negativni alosterni modulator

PAM – pozitivni alosterni modulator

PKA – protein kinaza A

PKC – protein kinaza C

Plic-1 – protein koji vezuje IAP i citoskelet (eng. *Protein linking IAP and cytoskeleton*)

PP1A – protein fosfataza 1 alfa

PRIP-1 – neaktivni protein tipa 1 povezan sa fosfolipazom C

ROC kanal – kanal kojima upravlja receptor (eng. *receptor-operated channel*)

RT-PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. *real-time polymerase chain reaction*)

SAM – neutralni alosterni modulator (eng. *silent allosteric modulator*)

SERCA pumpa – sarkoplazmatski/endoplazmatski retikulum kalcijum ATP-aza pumpa (eng. *SR/ER calcium ATPase pump*)

TBS – Tris puferovan fiziološki rastvor (eng. *Tris buffered saline*)

TGN – trans-Goldžijeva mreža (eng. *Trans-Golgi network*)

TRP kanali – prolazni potencijalni katjonski kanali (eng. *transient receptor potencial channels*)

TSPO – translokatorski protein od 18 kDa (stari naziv - periferni benzodiazepinski receptor) (eng. *translocator protein 18 kDa*)

USP – američka farmakopeja (eng. *United States Pharmacopea*)



## Vaskularna aktivnost pozitivnih alosternih modulatora GABA<sub>A</sub> receptora kod pacova

### SAŽETAK

U posljednje vrijeme uloga GABA (eng. *gamma-aminobutyric acid*, GABA) i GABA<sub>A</sub> receptora (GABA<sub>A</sub>R) na periferiji postaje sve važnija. Iako su dokazi još uvijek ograničeni, sugerisano je da se hipotenzivni efekti benzodiazepina (BZD) i drugih liganada GABA<sub>A</sub>R, pored poznatih mehanizama neuromodulacije u centralnom i perifernom nervnom sistemu, ostvaruju i modulacijom "vaskularnih" GABA<sub>A</sub>R u perifernim krvnim sudovima. Pretpostavili smo da različiti pozitivni alosterne modulatori (PAM) GABA<sub>A</sub>R ispoljavaju direktne vazodilatatorne efekte preko vaskularnih GABA<sub>A</sub>R koji su eksprimirani na aorti pacova.

Ispitivanja predstavljena u ovoj disertaciji sprovedena su u dva pravca. U jednom pravcu vršeno je dokazivanje prisustva  $\alpha 1-6$  i  $\gamma 2$  podjedinica GABA<sub>A</sub>R u aorti pacova, primjenom RT-PCR (eng. *real-time-polymerase chain reaction*) i imunohistohemijske analize. U drugom pravcu vršeno je izometrijsko mjerenje kontrakcije izolovanih prstenova pacovske aorte u prisustvu različitih selektivnih i neselektivnih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R: zolpidema ( $\alpha 1$ -selektivan), XHe-III-074 ( $\alpha 4$ -selektivan), MP-III-022, MP-III-058, GL-II-74, GL-II-73 ( $\alpha 5$ -selektivni), DK-I-56-1 ( $\alpha 6$ -selektivan), SH-I-048A, midazolama i diazepama (neselektivni). Rezultati RT-PCR analize dokazali su ekspresiju iRNK  $\alpha 1-5$  podjedinica u homogenatu tkiva torakalne aorte pacova, dok za  $\alpha 6$  podjedinicu nije utvrđena ekspresija iRNK. Imunohistohemijskim bojenjem histoloških presjeka pacovske aorte potvrđena je ekspresija proteina  $\alpha 1-5$  podjedinice, kao i ekspresija proteina  $\gamma 2$  podjedinice, te je utvrđeno da su identifikovani proteini lokalizovani na vaskularnom glatko-mišićnom sloju aorte pacova. Testovi u kupatilu za rad sa izolovanim prstenovima aorte otkrili su značajne vazodilatacijske efekte svih ispitivanih PAM-ova (preko 50% ostvarene relaksacije prekontrahovanih preparata), pri čemu je diazepam bio najefikasniji ligand, dok je zolpidem pokazao najslabije vaskularne efekte. Flumazenil, kao antagonista BZD mjesta na GABA<sub>A</sub>R, pokazao je slabu vazoaktivnost *per se*, ali je značajno smanjio vazodilatacijske efekte testiranih PAM-ova, što upućuje da se njihova vazoaktivnost ostvaruje modulacijom BZD veznog mjesta na vaskularnim GABA<sub>A</sub>R. Primjenjen u koncentraciji od  $10^{-4}$  M, flumazenil je značajno smanjio relaksaciju izazvanu midazolamom ( $P < 0,01$ ), kao i relaksaciju izazvanu MP-III-058 ( $P < 0,001$ ), i uzrokovao tako pomijeranje njihovih krivih odnosa koncentracija-odgovor udesno i naniže. Vazodilatacijski efekti diazepama nisu smanjeni u prisustvu antagonista (bikukulina, odnosno PK11195), osim onih ostvarenih pri nižim koncentracijama diazepama ( $10^{-7}$  M i  $3 \times 10^{-7}$  M). TSPO antagonista PK11195 ispoljio je vazodilatacijske efekte na fenilefrin (FE)-prekontrahovanim preparatima, uporedive sa efektima diazepama, što nije bio slučaj sa antagonistima bikukulinom i flumazenilom. Maksimalna efikasnost testiranih PAM-ova postignuta je pri koncentraciji ( $10^{-4}$  M) koju je teško postići u *in vivo* sistemu, osim u uslovima predoziranja i zloupotrebe lijekova. Primjenjeni u ovako visokoj koncentraciji, vazodilatacijski efekti testiranih PAM-ova bili su uporedivi sa efektima prazosina, kao referentnog antagoniste adrenergičke kontrakcije. Međutim, njihov relaksacijski potencijal značajno je niži od prazosinskog, na šta ukazuju uočene razlike u vrijednostima  $pEC_{50}$ . Za sve ispitivane PAM-ove vazodilatacijski efekti bili su izraženiji kod FE- prekontrahovanih u odnosu na KCl-prekontrahovane preparate.

Ovo istraživanje potkrepljuje postojanje funkcionalnih GABA<sub>A</sub>R na krvnim sudovima, te ukazuju na potencijal za dalji razvoj obećavajućih kandidata za buduće vazodilatatore. Neophodni su dalji koraci u rasvjetljavanju strukture i rasporeda podjedinica na GABA<sub>A</sub>R, te dalja farmakološka

ispitivanja vaskularnih efekata u modelima sa većim translacijskim kapacitetom, kako bi se nastavila optimizacija liganada koji ciljaju populacije vaskularnih GABA<sub>A</sub>R.

**Ključne riječi:** vaskularni GABA<sub>A</sub> receptori, pozitivni alosteri modulatori (PAM), vaskularna aktivnost,  $\alpha$  podjedinice, aorta pacova

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmakologija

## Vascular activity of GABA<sub>A</sub> receptor positive allosteric modulators in the rats

### ABSTRACT

Recently, the role of GABA (gamma-aminobutyric acid) and GABA<sub>A</sub> receptors (GABA<sub>AR</sub>) in the periphery has become increasingly important. Although the evidence is still limited, it has been suggested that the hypotensive effects of benzodiazepines (BZD) and other GABA<sub>AR</sub> ligands, in addition to the known mechanisms of neuromodulation in the central and peripheral nervous system, are also achieved by the modulation of "vascular" GABA<sub>AR</sub> in peripheral blood vessels. We hypothesized that various positive allosteric modulators (PAM) of GABA<sub>AR</sub> exert direct vasodilator effects via vascular GABA<sub>AR</sub> expressed on rat aorta.

The investigations presented in this dissertation were carried out in two directions. In one direction, the presence of  $\alpha$  and  $\gamma$ 2 subunits of the GABA<sub>AR</sub> in the rat aorta was demonstrated, using RT-PCR (real-time-polymerase chain reaction) and immunohistochemical analysis. In the second direction, isomeric measurement of contraction of isolated rat aortic rings in the presence of various selective and non-selective PAMs of GABA<sub>AR</sub> was performed: zolpidem ( $\alpha$ 1-selective), XHe-III-074 ( $\alpha$ 4-selective), MP-III-022, MP-III-058, GL-II-74, GL-II-73 ( $\alpha$ 5-selective), DK-I-56-1 ( $\alpha$ 6-selective), SH-I-048A, midazolam and diazepam (non-selective).

The results of RT-PCR analysis demonstrated the expression of mRNA  $\alpha$ 1–5 subunits in the tissue homogenate of the rat thoracic aorta, while no mRNA expression was found for the  $\alpha$ 6 subunit. Immunohistochemical staining of histological sections of the rat aorta confirmed the expression of the  $\alpha$ 1-5 subunit protein, as well as the expression of the  $\gamma$ 2 subunit protein, and it was determined that the identified proteins are localized on the vascular smooth-muscle layer of the rat aorta. Assays with isolated aortic rings revealed significant vasodilatory effects of all tested PAMs (over 50% relaxation achieved in precontracted preparation), where diazepam was the most effective ligand, while zolpidem showed the weakest vascular effects. Flumazenil exhibited weak vasoactivity per se, but significantly prevented the relaxant effects of tested PAMs. Applied at a concentration of  $10^{-4}$  M, flumazenil significantly reduced midazolam-induced relaxation ( $P < 0.01$ ), as well as MP-III-058-induced relaxation ( $P < 0.001$ ), shifting their concentration-response curves to the right and down. The vasodilating effects of diazepam were not reduced in the presence of the antagonist (bicuculline, ie PK11195), except for those achieved at lower concentrations of diazepam ( $10^{-7}$  M and  $3 \times 10^{-7}$  M). The TSPO antagonist PK11195 exhibited vasodilatory effects on phenylephrine (FE)-precontracted preparations, comparable to the effects of diazepam, which was not the case with the antagonists bicuculline and flumazenil. The maximum efficiency of the tested PAMs was achieved at a concentration ( $10^{-4}$  M) that is difficult to achieve in the *in vivo* system, except in conditions of overdose and drug abuse. Applied in such a high concentration, the vasodilatory effects of the tested PAMs were comparable to the effects of prazosin, as a reference antagonist of adrenergic contraction. However, their relaxation potential is significantly lower than that of prazosin, as indicated by the observed differences in  $pEC_{50}$  values. For all tested PAMs, the vasodilation effects were more pronounced in FE-precontracted compared to KCl-precontracted preparations.

This research supports the existence of functional GABA<sub>AR</sub>s on blood vessels, and indicates the potential for further development of promising candidates for future vasodilators. Further steps in elucidating the structure and subunit arrangement of GABA<sub>AR</sub>s, and further pharmacological studies of vascular effects in models with higher translational capacity, are necessary to continue the optimization of ligands that target populations of vascular GABA<sub>AR</sub>s.

Keywords: vascular GABA<sub>A</sub> receptors, positive allosteric modulators (PAM), vascular activity,  $\alpha$  subunits, rat aorta

1.	Uvod .....	1
1.1	GABA-ergička transmisija .....	1
1.2	Periferna uloga GABA-e i GABA <sub>A</sub> R .....	3
1.3	Uloga GABA-e u kardiovaskularnom sistemu .....	4
1.4	Vaskularni GABA <sub>A</sub> R .....	6
1.5	Intracelularni proteini koji stupaju u interakcije sa GABA <sub>A</sub> R .....	9
1.6	Pozitivni alosterični modulatori GABA <sub>A</sub> R .....	12
1.7	Vaskularni efekti benzodiazepina .....	16
1.8	Mehanizmi relaksacije vaskularnih glatkih mišića .....	18
1.9	Značaj mjerenja vaskularne kontraktibilnosti .....	19
2.	Ciljevi istraživanja .....	22
3.	Metodologija .....	23
1.10	Supstance .....	23
1.11	Životinje .....	24
1.12	Priprema tkiva .....	25
1.13	Kvalitativna RT-PCR metoda za identifikaciju $\alpha$ podjedinica GABA <sub>A</sub> R u aorti pacova .....	25
1.14	Imunohistohemijska metoda za identifikaciju $\alpha 1-6$ i $\gamma 2$ podjedinice u aorti pacova .....	26
3.5.1	Histološka analiza .....	26
3.5.2	Imunohistohemijska analiza .....	26
1.15	Mjerenje izometrijske kontrakcije prstenova pacovske aorte u prisustvu različitih PAM-ova GABA <sub>A</sub> R .....	27
1.16	Eksperimentalni protokoli za utvrđivanje vaskularne aktivnosti različitih PAM-ova GABA <sub>A</sub> R .....	29
3.7.1	Prvi protokol - mjerenje relaksacije prekontraovanih preparata u prisustvu različitih PAM-ova GABA <sub>A</sub> R .....	29
3.7.2	Drugi protokol - uloga endotela u diazepam-indukovanoj relaksaciji FE-prekontraovanih preparata .....	29
3.7.3	Treći protokol - ispitivanje efekata različitih PAM-ova GABA <sub>A</sub> R na FE-indukovanu kontrakciju preparata .....	29
1.17	Eksperimentalni protokoli za utvrđivanje vaskularne aktivnosti različitih PAM-ova GABA <sub>A</sub> R u prisustvu specifičnih antagonista .....	30
3.8.1	Prvi protokol - ispitivanje vaskularnih efekata prazosina, bikukulina, flumazenila, PK11195 i XLi-093 na FE- prekontraovanim preparatima .....	30
3.8.2	Drugi protokol - ispitivanje antagonističkog uticaja bikukulina i PK11195 na vaskularne efekte diazepama kod FE- prekontraovanih preparata .....	30
3.8.3	Treći protokol - ispitivanje antagonističkog uticaja XLi-093 na vaskularne efekte MP-III-058 kod FE- prekontraovanih preparata .....	31

3.8.4	Četvrti protokol - ispitivanje antagonističkog uticaja flumazenila na vaskularne efekte midazolama i MP-III-058 kod FE- prekontrahovanih preparata .....	31
1.18	Statistička analiza.....	32
2.	Rezultati .....	34
4.1	Kvalitativna RT-PCR analiza za identifikaciju $\alpha$ podjedinica GABA <sub>A</sub> R u aorti pacova .....	34
4.2	Imunohistohemijska analiza za identifikaciju $\alpha 1-6$ i $\gamma 2$ podjedinice u aorti pacova.....	35
4.3	Rezultati mjerenja izometrijske kontrakcije prstenova pacovske aorte u prisustvu različitih PAM-ova GABA <sub>A</sub> R.....	37
4.3.1	Vazodilatacijski efekti različitih PAM-ova GABA <sub>A</sub> R .....	37
4.3.2	Endotel-zavisna relaksacija FE-prekontrahovanih preparata izazvana diazepamom.....	44
4.3.3	Supresivni efekti različitih PAM-ova GABA <sub>A</sub> R na FE-indukovanu kontrakciju preparata.....	45
4.4	Rezultati mjerenja izometrijske kontrakcije prstenova pacovske aorte u prisustvu različitih PAM-ova GABA <sub>A</sub> R i specifičnih antagonista .....	57
4.4.1	Vaskularni efekti prazosina, bikukulina, PK11195 i XLi-093 .....	57
4.4.2	Procjena antagonističkog uticaja bikukulina i PK11195 na vaskularne efekte diazepama kod FE prekontrahovanih preparata pacovske aorte .....	62
4.4.3	Procjena antagonističkog uticaja XLi-093 na vaskularne efekte MP-III-058 kod FE-prekontrahovanih preparata pacovske aorte .....	63
4.4.4	Procjena antagonističkog uticaja flumazenila na vaskularne efekte midazolama i MP-III-058 kod FE- prekontrahovanih preparata pacovske aorte.....	63
5	Diskusija .....	66
5.1	Ekspresija vaskularnih GABA <sub>A</sub> R na pacovskoj aorti.....	67
5.2	Vaskularna aktivnost GABA-e .....	68
5.3	Vaskularna aktivnost neselektivnih PAM-ova.....	69
5.4	Vaskularna aktivnost $\alpha 5$ - selektivnih PAM-ova .....	70
5.5	Vaskularna aktivnost $\alpha 1$ -, $\alpha 4$ - i $\alpha 6$ - selektivnih PAM-ova .....	71
5.6	Zajedničke odlike vaskularne aktivnosti testiranih PAM-ova .....	72
5.7	Vaskularna aktivnost specifičnih antagonista za PAM-ove GABA <sub>A</sub> R .....	73
5.8	Antagonistički uticaj specifičnih antagonista na vaskularne efekte PAM-ova GABA <sub>A</sub> R.....	74
6	Zaključak.....	76
7	Literatura.....	79

# Vaskularna aktivnost pozitivnih alosternih modulatora GABA<sub>A</sub> receptora kod pacova

## 1. Uvod

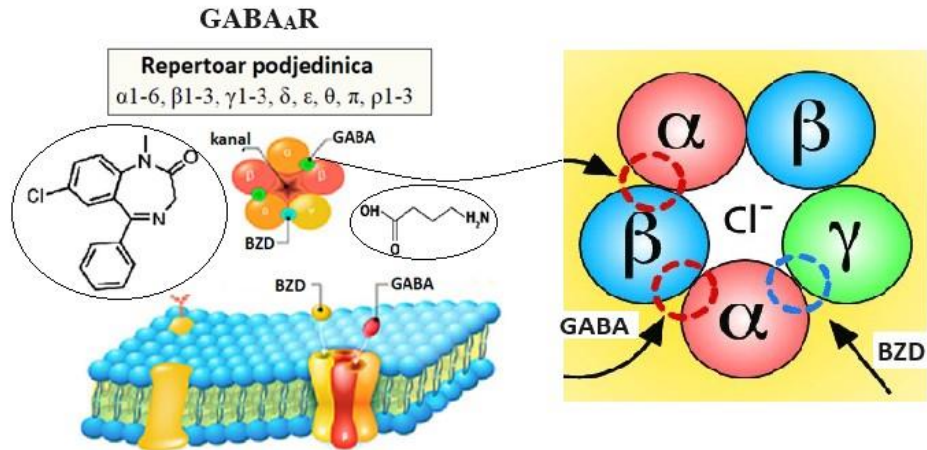
### 1.1 GABA-ergička transmisija

GABA je neproteinska aminokiselina sa četiri ugljenikova atoma, široko zastupljena u biološkim organizmima, uključujući mikroorganizme, biljke i kičmenjake. GABA je glavni inhibitorni neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu (CNS). Poznato je da 30% humanih neurona sadrži GABA-u, koja utiče na skoro sve neuronske aktivnosti, dok se kod pacova procjenjuje da najmanje jedna trećina svih neurona CNS-a koristi GABA-u kao svoj primarni neurotransmiter (Oketch-Rabah i sar., 2021). GABA je najzastupljenija u mozgu, naročito u nigrostrijatnom sistemu (oko 10  $\mu\text{mol/g}$  tkiva). U nešto nižim koncentracijama (2-5  $\mu\text{mol/g}$ ) javlja se širom sive mase, dok je na periferiji značajno manje zastupljena (Rang i sar., 2005).

GABA svoju aktivnost ostvaruje preko dva tipa receptora: jonotropnih GABA<sub>A</sub> i GABA<sub>C</sub> i metabotropnih GABA<sub>B</sub> receptora. GABA<sub>A</sub>R su hetero-oligomerne strukture (200-400 kDa) u čijoj formaciji učestvuju najmanje tri funkcionalne podjedinice, a do sada je identifikovano 19 različitih podjedinica ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\rho$ 1-3). Različite kombinacije ovih podjedinica uslovljavaju postojanje funkcionalno i farmakološki različitih podtipova GABA<sub>A</sub>R (Olsen i Sieghart, 2009).

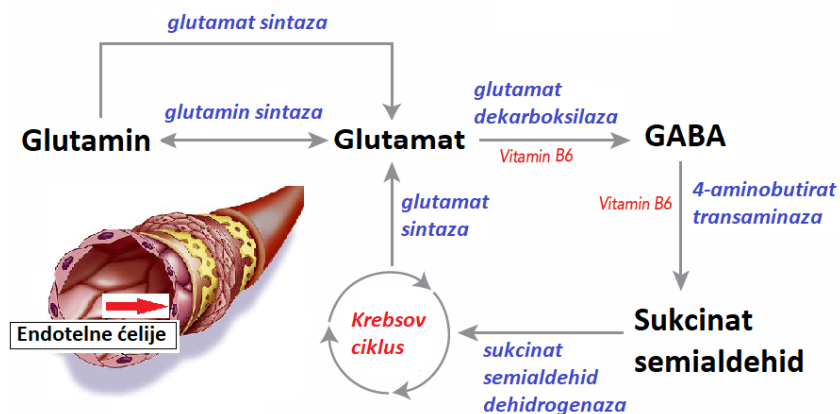
Klasični neuronski GABA<sub>A</sub>R su ligand-zavisni hloridni kanali, sastavljeni od dvije  $\alpha$ , dvije  $\beta$  i jedne  $\gamma$  podjedinice (Slika 1). Vezno mjesto za GABA-u nalazi se na granici između  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica, a na jednom GABA<sub>A</sub>R postoje dva takva mjesta (Sieghart, 2015). Kada se dva molekula GABA-e vežu za  $\beta$ / $\alpha$ - lokaciju GABA<sub>A</sub>R, oni izazivaju konformacionu promjenu u strukturi receptora, što za rezultat ima otvaranje Cl<sup>-</sup> kanala u njegovom centru. Zahvaljujući koncentracionom gradijentu Cl<sup>-</sup> jona, ovaj ekstracelularni anjon ulazi u citoplazmu neurona kroz pomenuti kanal, što izaziva poremećaj potencijala mirovanja neurona (oko -65 mV), odnosno hiperpolarizujuću inhibiciju (Rudolph i Knoflach, 2011). S obzirom da je ekvilibrijumski membranski potencijal za Cl<sup>-</sup> jone obično negativan u odnosu na mirovni potencijal zrele ćelije, povećanje propustljivosti za Cl<sup>-</sup> jone hiperpolarise ćeliju i tako smanjuje njenu eksitabilnost (Rang i sar., 2005). Supstrat hloridnog kanala u okviru GABA<sub>A</sub> receptorskog kompleksa je jedan od najmnogostrukijih mašina u organizmu na koju lijekovi djeluju. Tako na primjer, svoju aktivnost preko hloridnih kanala ostvaruju benzodiazepini, barbiturati, propofol (intavenski anestetik), alfaksolon (steroidni anestetik), ivermektin (anthelmintik) i alkohol (Korpi i sar., 2002; Varagić i Milošević, 2005).

GABA<sub>B</sub> receptori svoje dejstvo ostvaruju inhibicijom voltažnih kalcijumskih kanala i/ili otvaranjem kalijumskih kanala. Nedavno je otkrivena i treća klasa, GABA<sub>C</sub> receptori, koji po strukturi i funkciji podsjećaju na GABA<sub>A</sub> receptore, a sastavljeni su od različitih familija p subjedinica.



Slika 1. Ilustracija "klasičnog" GABA<sub>A</sub>R i repertoara subjedinica. Slika je prilagođena i preuzeta iz izvora: iStock by Getty Images. Cell membrane. GABA receptor stock illustration [online]. Dostupno na <https://www.istockphoto.com/vector/cell-membrane-gaba-receptor-gm1161009135-317986833> [pristupljeno 03. avgusta 2022].

GABA se sintetiše iz glutamata, glavnog ekscitatornog neurotransmitera, u reakciji dekarboksilacije koju katalizuje enzim dekarboksilaza glutaminske kiseline (GAD), i to uz pomoć piridoksal fosfata, aktivnog oblika vitamina B<sub>6</sub>, kao ko-faktora. GABA se metabolizuje pomoću enzima gama-aminobutirat-transaminaza (GABA-T) u sukcinat semialdehid, koji se zatim može redukovati u gama-hidroksibutirat ili oksidovati u sukcinat i na kraju konvertovati u CO<sub>2</sub> i vodu putem ciklusa trikarbonskih kiselina (Krebsov ciklus) (Ghit i sar., 2021, Oketch-Rabah i sar., 2021) (Slika 2). GABA-ergički neuroni i astrociti preuzimaju GABA-u pomoću specifičnih transportera, što uklanja oslobođenu GABA-u više nego GABA-T. Dakle, njeno dejstvo završava se uglavnom preuzimanjem, a u manjem procentu deaminacijom koju katalizuje GABA-T. Transport GABA-e inhibiraju guvacin i nipekotinska kiselina (Rang i sar., 2005).



Slika 2. Sinteza i razgradnja GABA-e. Slika je prilagođena i preuzeta iz izvora Oketch-Rabah i sar., 2021.

Osim u nervnim ćelijama, predstavljeni procesi sinteze/razgranje registrovani su u brojim perifernim tkivima. Sinteza GABA-e iz njenog radio-obilježenog prekursora, glutamata, dokazana je u humanim ćelijskim kulturama endotela umbilikalne vene i aorte (Sen i sar., 2016). Sintetisani nivoi oslobođene GABA-e iz endotelnih ćelija upoređeni su sa nivoima GABA-e iz drugih tipova tkiva kao što su: periferno nervno tkivo (PC12 - feohromocitom nadbubrežne medule pacova),



monociti (THP1) i humani fibroblasti kože (HSF). Poređenjem nivoa ekspresije proteina GAD65/67 i količine GABA-e između različitih tipova ćelija utvrđeno je da PC12 ćelije pokazuju maksimalnu ekspresiju, dok HSF ćelije pokazuju najmanju, što se može pripisati različitim aktivnostima pomenutih enzima između različitih tipova ćelija (Sen i sar., 2016).

## 1.2 Periferna uloga GABA-e i GABA<sub>A</sub>R

Jedinjenje GABA prvi put je sintetisano 1883. godine i tada se smatralo da je u pitanju metabolit prisutan samo kod biljka i mikroorganizama (Oketch-Rabah i sar., 2021). Od kada su Awapara i sar. (1950), te Roberts i Frankel (1950) prvi put identifikovali GABA-u u mozgu sisara, neprekidno i intenzivno se radi na potpunom rasvjetljavanju njene ogromne fiziološke uloge (Ghit i sar., 2021). Vremenom su ustanovljena različita "periferna" svojstva GABA-e, uključujući antihipertenzivno, antidiabetesno, antitumorsko, antioksidativno, antiinflamatorno, antimikrobno, antialergijsko i hepatoprotektivno svojstvo (Ngo i Vo, 2019).

Kao glavnom inhibitornom neurotransmiteru u mozgu, ustanovljena joj je vitalna ulogu u modulaciji sinaptičkog prenosa, promociji razvoja neurona i neuralnoj regulaciji brojnih psihosomatskih stanja (Ghit i sar., 2021).

Međutim, fiziološka i farmakološka relevantnost GABA-e utvrđena je i u perifernim tkivima. Korišćenjem PCR metode, utvrđena je tkivno-specifična ekspresija podjedinica GABA<sub>A</sub>R u perifernim tkivima pacova (Akinci i Schofield, 1999) (Slika 3), što je dodatno podstaklo rasvjetljavanje periferne uloge GABA-e.

Podjedinice	Mozak	Jajnici	Placenta	Tanko crijevo	Testisi	Materica	Nadbubrežna žlijezda
α1	+	+	++	+	+	+	+
α2	+	+	++	+	+	+	+
α3	+	+	++	++	+		+
α4	+	+	+		+		
α5	+	+	+		+		
α6	+		+			+	
β1	++	+	++		++		+
β2	++	+	++		++		+
β3	++	+++	+++	++	++	+	+++
γ1	+	+			++	+	+
γ2	+		+	+	++		+
γ3	+	+		+			
δ	+	+	+	+	+		
ρ1	+	+	+		++		
ρ2	++	+	+	++	++	++	+
ρ3					++		
ε1	+	+	+	+	+	+	+

Slika 3. Prikaz relativnih nivoa ekspresije različitih podjedinica GABA<sub>A</sub>R u perifernim tkivima pacova, određen PCR metodom. Slika je prilagođena i preuzeta iz izvora Akinci i Schofield, 1999.

Funkcionalni "periferni" GABA<sub>A</sub>R identifikovani su u različitim perifernim tkivima kod ljudi, nakon čega su intenzivirane aktivnosti na rasvjetljavanju fiziološke uloge GABA-e i potencijalne farmakološke vrijednosti agonista GABA<sub>A</sub>R na periferiji. Podjedinice α4, α5, β3 i γ2 identifikovane su u glatkim mišićima traheje i bronhijama (Mizuta i sar., 2008, Gallos i sar., 2015), α6, β2 i β3 identifikovane su u epitelnim, a π u mukoznim ćelijama tankog crijeva (Ma i sar.,

2018),  $\alpha_2$ ,  $\alpha_5$ ,  $\beta_3$  i  $\gamma_2$  identifikovane su u  $\beta$  ćelijama pankreasa (Korol i sar., 2018), dok su podjedinice  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$  identifikovane u monocitima i limfocitima periferne krvi (Alam i sar., 2006, Bjurstöm i sar., 2008, Mendu i sar., 2012). Postojanje funkcionalnih heteropentamernih GABA<sub>A</sub>R kod karcinoma želudca opisano je nakon dokazane ekspresije iRNK i proteina za GAD65,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  i  $\gamma_1$  podjedinice, ali ne i za podjedinice GABA<sub>B</sub> receptora (Watanabe i sar., 2006).

Nakon što je utvrđeno da  $\alpha_4$ - i  $\alpha_5$ - selektivni ligandi za GABA<sub>A</sub>R u bronhijama izazivaju relaksacije prethodno kontrahovanih bronhijalnih segmenata i pokazuju antiinflamatornu aktivnost u modelima astme (Forkuo i sar., 2016, Yocum i sar., 2016, Forkuo i sar., 2018, Yocum i sar., 2019), aktivno se radi na razvoju nove terapijske opcije za liječenje bronhokonstriktivnih bolesti. Kliničku relevantnost mogli bi da imaju i ligandi selektivni za GABA<sub>A</sub>R koji sadrže  $\pi$  podjedinicu, s obzirom da su brojne studije ukazale na povećane nivoe ekspresije ovih receptora kod kancera dojke, jajnika, pankreasa i želudca (Juvale i sar., 2021). S druge strane, utvrđeni su smanjeni nivoi ekspresije  $\beta_3$ -GABA<sub>A</sub>R kod hepatocelularnog karcinoma, što može da ima dijagnostički i terapijski značaj kod ove vrste tumora (Minuk i sar., 2007). Brojne kliničke studije pokazale su da oralna primjena GABA-e reguliše nivo insulina i C-peptida kod zdravih dobrovoljaca, te da intravenska primjena GABA-e smanjuje nivo glukoze u krvi kod pacijenata sa dijabetesom (Al-Kuraishy i sar., 2021). Osim toga, utvrđeno je da PAM-ovi GABA<sub>A</sub>R poboljšavaju efikasnosti antidijabetesne terapije, te da u kombinaciji sa egzogenom GABA-om mogu predstavljati novi terapijski modalitet za liječenje *diabetes mellitus*-a tip 1 i 2 (Al-Kuraishy i sar., 2021).

Tkivno specifična, diferencijalna ekspresija podjedinica GABA<sub>A</sub>R dokazana je i u različitim perifernim organima kod pacova, poput bubrega, nadbubrežne žlijezde, jajnika, testisa, materice i ileuma (Akinci i Schofield, 1999, Takano i sar., 2014), ali se i dalje malo zna o ekspresiji GABA<sub>A</sub>R i funkciji GABA-e u perifernim krvnim sudovima.

Ipak, najviše pažnje posvećeno je anatomskoj, fiziološkoj i farmakološkoj karakterizaciji GABA-ergičkog sistema u mozgu, dok se i dalje relativno malo zna o molekularnim fenotipovima i fiziološkoj ulozi ovog sistema na periferiji. Ovo predstavlja potencijalno propuštenu terapijsku priliku u smislu primjene dostupnih ili novih lijekova za različita oboljenja perifernih tkiva.

### 1.3 Uloga GABA-e u kardiovaskularnom sistemu

Poznato je da GABA, iako ne prolazi krvno-moždanu barijeru, nakon parenteralne primjene kod ljudi i životinja izaziva smanjenje krvnog pritiska (Elliott i Hobbiger, 1959; Hayakawa i sar., 2002). Odavno se spekuliše da su antihipertenzivni efekti GABA-e povezani sa njenom perifernom vaskularnom aktivnošću, ali tačni mehanizmi periferne regulacije još nisu utvrđeni.

Tanaka (1985) je mjerenjem sadržaja GABA-e i aktivnosti enzima GAD u različitim perifernim tkivima kod ljudi i sisara pokazao da su endogene količine GABA-e, prisutne i u ne-neuronskim tkivima sisara, uključujući i krvne sudove. Međutim, kasnijim mjerenjima kod kunića i pacova utvrđeno je da su nivoi GABA-e u perifernim krvnim sudovima (aorta, femoralne i mezenterične arterije) kao i aktivnost enzima povezanih sa GABA-om, posebno GAD i GABA-T, do svega 1% od onih u mozgu (Hamel i sar., 1981), što je upućivalo na skromnu perifernu GABA-ergičku transmisiju (Tabela 1).

Tabela 1. Sadržaj GABA-e i aktivnost enzima GAD u krvnim sudovima sisara. Tabela je prilagođena i preuzeta iz izvora Hamel i sar., 1981.

<i>Tkivo</i>	<i>Kunić (n = 6)</i>		<i>Pacov (n = 7)</i>	
	<b>GAD aktivnost</b>	<b>% Mozak</b>	<b>GAD aktivnost</b>	<b>% Mozak</b>
Moždano tkivo	2.767,79 ± 342,83	100	4.814,29 ± 265,52	100
Moždane ovojnice	229,20 ± 42,82	8,2	418,77 ± 77,84	8,7
Aorta	8,01 ± 1,70	0,26	19,99 ± 3,87	0,41
Šuplja vena	17,58 ± 7,38	0,64		
Femoralna arterija	4,86 ± 1,08	0,19		
Mezenterična arterija	20,02 ± 4,68	0,72		
<i>Tkivo</i>	<i>Kunić (n = 6)</i>		<i>Pacov (n = 7)</i>	
	<b>GABA</b>	<b>% Mozak</b>	<b>GABA</b>	<b>% Mozak</b>
Moždano tkivo	100,67 ± 26,06	100	48,26 ± 12,03	100
Moždane ovojnice	3,76 ± 0,26	3,73	3,10 ± 0,61	6,42
Aorta	0,45 ± 0,10	0,45	0,62 ± 0,08	1,28
Šuplja vena	1,76 ± 0,41	1,74		
Femoralna arterija	0,80 ± 0,13	0,79		
Mezenterična arterija	0,96 ± 0,19	0,95		

Prva klinička studija za procjenu efekata peroralno primjenjene GABA-e na nivo krvnog pritiska kod ljudi rađena je davne 1961. godine. Tada je utvrđeno da, nakon oralne primjene 3 g dnevno, GABA nije izazvala nikakve značajne efekte kod normotenzivnih osoba, ali je značajno snizila povišen krvni pritisak kod pacijenata sa hipertenzijom (Takahashi i sar., 1961).

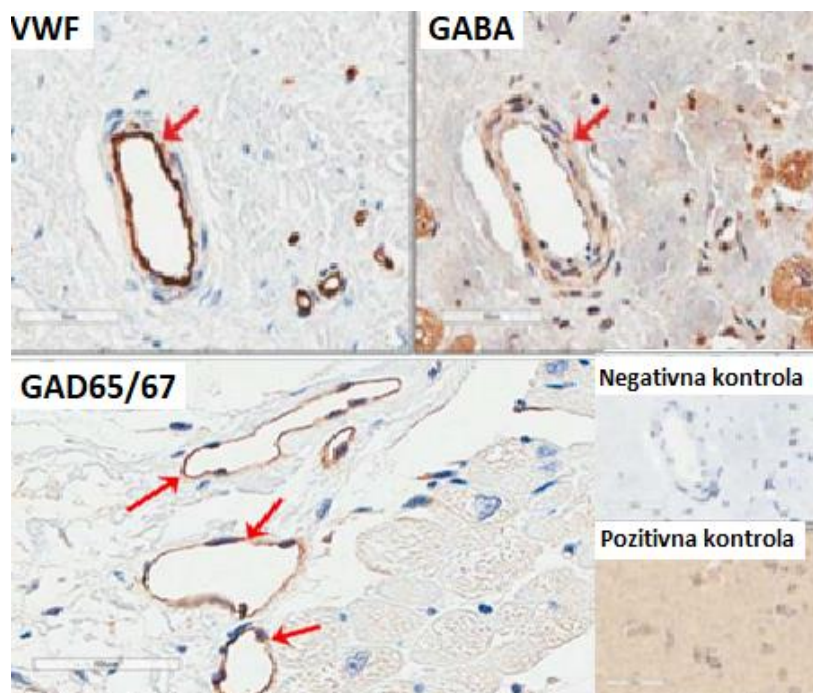
Rezultati novijih randomizovanih, duplo-slijepih, placebo-kontrolisanih kliničkih studija potvrđuju da primjena GABA-e nije povezana sa bilo kakvim ozbiljnim neželjenim efektima, te da je uzrokovala prolazan, umjeren pad (manje od 10%) vrijednosti krvnog pritiska, koje su vraćene na početne nakon prestanka uzimanja GABA-e. Praćeni su efekti oralne primjene GABA-e u vidu različitih dijetetskih suplemenata i hrane, kao što su obogaćeni soja sos (Yamakoshi i sar., 2007), fermentisano mlijeko (Inoue i sar., 2003), zelene alge (Shimada i sar., 2009).

Zbog široke upotrebe GABA-e kao sastojka dijetetskih suplemenata na američkom tržištu, američka farmakopeja USP (eng. *United States Pharmacopeia*) razvija monografiju kvaliteta dijetetskih suplemenata, s obzirom da neke kompanije za predviđanje procjenjuju da će se veličina globalnog tržišta za GABA dijetetske suplemente značajno povećati sa 38 miliona dolara u 2019. na 50 miliona dolara do kraja 2026. godine (MarketWatch, 2021).

Interesantno je da rezultati *in vitro* ispitivanja periferne vazoaktivnosti GABA-e nisu konzistentni. Naime, postoje nalazi da GABA ne relaksira izolovane cerebralne arterije pacova, kunića i majmuna (Lai i sar., 1988), kao ni aortu pacova (Perusquia i sar., 1996, Colussi i sar., 2011), dok su drugi *in vitro* nalazi pokazali da GABA značajno relaksira mezenterične arterije pacova (Farsi i sar., 2011, Kamran i sar., 2013, Kharazmi i sar., 2015), te relaksira izolovane segmente bazilarnih i srednjih cerebralnih arterija pasa i mačaka (Fujiwara i sar., 1975, Edvinsson i Krause, 1979). Štaviše, ovaj relaksantni efekat GABA-e bio je specifično blokiran od strane antagonista

bikukulina i pikrotoksina i potvrđen drugim testiranim GABA<sub>A</sub> agonistima (Fujiwara i sar., 1975, Edvinsson i Krause, 1979).

Poznato je da se koncentracija GABA-e u sistemske cirkulaciji kod ljudi kreće u opsegu od 0,5 do 3  $\mu$ M (Löscher W, 1979). Nedavno je utvrđeno da su, pored intermitentne sinteze i oslobađanja od strane  $\beta$ -ćelija pankreasa i crijevne flore, značajni izvori cirkulišuće GABA-e i endotelne ćelije krvnih sudova. Dokazano je da kultivisane ćelije endotela humane aorte i umbilikalne vene sintetišu GABA-u, koja ispoljava direktne efekte na metabolizam endotelnih ćelija (Sen i sar., 2016), što dalje ukazuje na potencijalnu ulogu GABA kao autokoida za susjedne ćelije glatkih mišića, te potkrepljuje njenu vaskularnu aktivnost (Slika 4).



Slika 4. Imunohistohemijska detekcija Von-Willebrand-ovog faktora (lijevi gornji panel), GABA-e (desni gornji panel) i enzima GAD65/67 (lijevi donji panel) u humanim koronarnim sudovima. Kao pozitivna i negativna kontrola korišćene su sekcije moždanog tkiva i nespecifični IgG, respektivno. Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora Sen i sar., 2016.

## 1.4 Vaskularni GABA<sub>A</sub>R

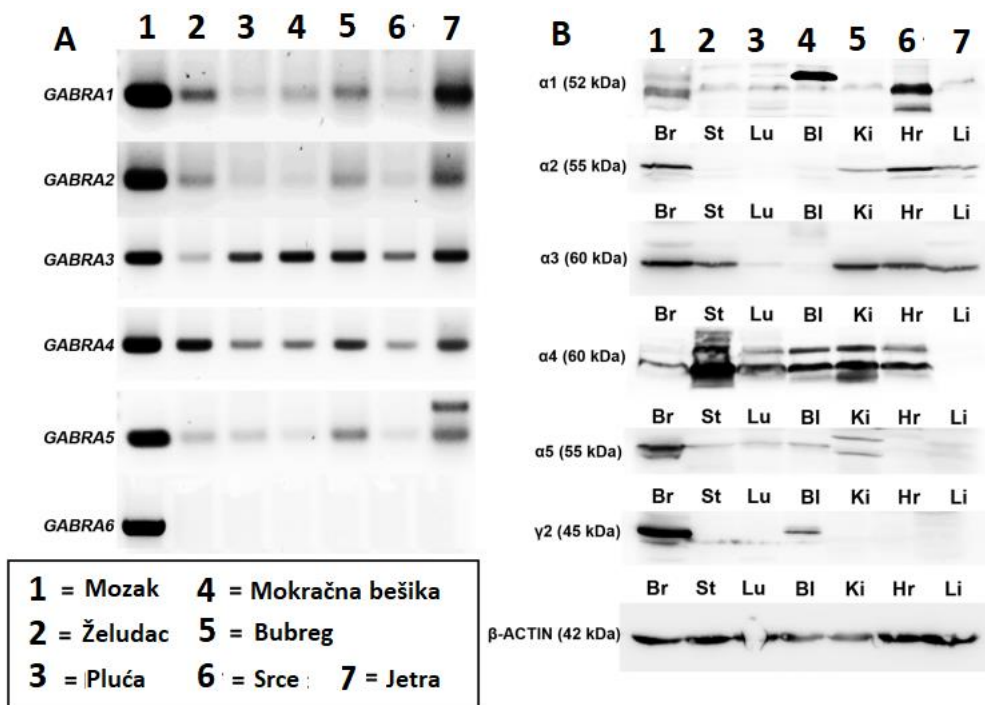
Prvi GABA<sub>A</sub>R izolovani su iz kravljeg mozga početkom 80-tih godina prošlog vijeka metodom afinitetne hromatografije (Sigel i sar., 1983). Od tada do danas, moderne tehnike kloniranja otkrile su ogromnu heterogenost podjedinica, koje su podijeljene u 19 porodica prema homologiji njihove sekvence. Primjenom X- zračne kristalografije nađeno je da pet podjedinica grade centralnu poru GABA<sub>A</sub>R, koja je propustljiva za Cl<sup>-</sup> i HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> jone, pri čemu je visoka homologija utvrđena sa acetilholinskim receptorom (Hilf i Dutzler, 2008).

Zbog prisustva izuzetno širokog repertoara podjedinica GABA<sub>A</sub>R teško je precizno identifikovati i okarakterisati receptorske podtipove (Olsen i Sieghart, 2008), posebno kada se radi o vaskularnim

GABA<sub>A</sub>R gdje "sinaptički-nezavisna" priroda i periferna lokalizacija mogu rezultirati potpuno drugačijom strukturom i modulacijom receptora. Međutim, ne treba očekivati da su sve matematički moguće kombinacije podjedinica prisutne u *in vivo* sistemu, s obzirom da postoje ograničenja u procesima sklapanja i dostupnosti površine podjedinica (Rudolph i Möhler, 2004). Najistaknutije kombinacije poznatih GABA<sub>A</sub>R sastoje se od  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinica ili  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\delta$  podjedinica (Tretter i Moss, 2008). Poznato je da manja populacija sadrži samo  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice, ali je ovaj tip receptora značajniji kod životinskih vrsta (Mortensen i Smart, 2006). Dokazano je da je  $\epsilon$  podjedinica sposobna da zamjeni bilo koju (ali ne obe)  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinicu i vjerovatno  $\gamma$ 2 podjedinicu u  $2\alpha 2\beta 1\gamma$  pentameru (Bollan i sar., 2008), zatim da  $\rho$  podjedinice mogu da formiraju funkcionalne homooligomerne receptore *in vivo*, te da  $\beta$ 3 i  $\delta$  podjedinice mogu da formiraju homooligomerne receptore u različitim perifernim tkivima (Tretter i Moss, 2008).

Zanimljivo je da su prvi vaskularni GABA<sub>A</sub>R lokalizovani na cerebralnim krvnim sudovima goveda i kunića, kada su primjenom tehnika vezivanja [<sup>3</sup>H]muscimola otkrivena vezna mjesta u preparatima pia-arahnoidnih krvnih sudova, ali ne i u perifernom vaskularnom tkivu (aorta i mezenterična arterija) (Krause i sar., 1980).

Heterogenost GABA<sub>A</sub>R-a u velikoj mjeri uslovljena je postojanjem šest različitih  $\alpha$  podjedinica, jer obično jedna od njih u duplikatu učestvuje u formiranju pentamernog Cl<sup>-</sup> kanala (Olsen i Sieghart, 2008). Na Slici 5 predstavljeni su nalazi ekspresije svih  $\alpha$  podjedinica u različitim organima miša, gdje se vidi da  $\alpha$ 6 podjedinica nije identifikovana (Everington i sar., 2018).



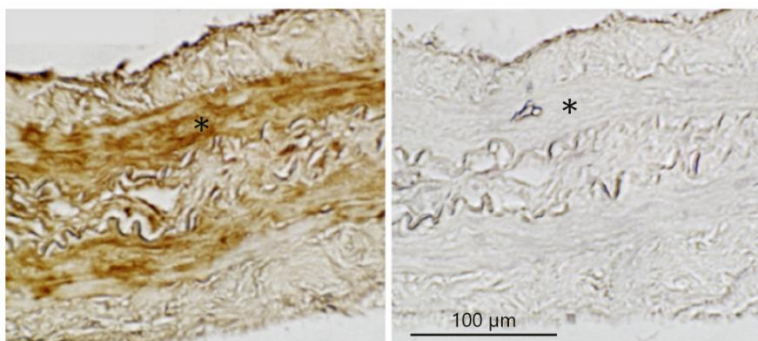
Slika 5. Reprezentativni nalazi ekspresije  $\alpha$ 1-6 podjedinica GABA<sub>A</sub>R u različitim organima miša: (A) PCR nalaz, (B) Western blot nalaz. Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora Everington i sar., 2018.

Što se tiče ekspresije vaskularnih GABA<sub>A</sub>R na perifernim krvnim sudovima, poznati su sljedeći podaci: Western blot nalaz prisustva nespecificovanog proteina GABA<sub>A</sub>R od 57 kDa u aorti miša

(Tyagi i sar., 2007), imunohistochemijska analiza za  $\beta$  podjedinicu u ćelijama glatkih mišića aorte pacova (El Idrissi i sar., 2013), PCR rezultati za ekspresiju  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 2$  i  $\delta$  podjedinica u repnim arterijama miša i za  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  i  $\delta$  podjedinice u humanim omentalnim arterijama (Yim i sar., 2020), te imunohistochemijska analiza za  $\alpha 4$  podjedinicu u glatko-mišićnom sloju humanih omentalnih arterija (Slika 6) (Yim i sar., 2020).

Vjeruje se da vaskularni GABA<sub>A</sub>R imaju ekstrasinaptička svojstva, te da se kontinuirano aktiviraju niskim ambijentalnim, ekstracelularnim nivoima GABA-e, porijeklom iz endotela (Brandes, 2016). Za ekstrasinaptičke GABA<sub>A</sub>R se zna da se farmakološki i funkcionalno razlikuju od sinaptičkih, što je svakako uslovljeno razlikama u strukturi (ekstrasinaptički su formirani uglavnom od  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  i  $\delta$  podjedinica), te razlikama u inhibitornom potencijalu (ekstrasinaptički generišu perzistentnu ili toničnu inhibiciju, različitu od prolazne, fazne inhibicije karakteristične za sinapsu) (Farrant i Nusser, 2005, Belelli i sar., 2009).

Veliki korak u rasvjetljavanju uloge GABA-ergičkog sistema u perifernim krvnim sudovima ostvaren je kada su Yim i sar. (2020) prvim *in vitro* studijama na humanim arterijama dokazali ekspresiju podjedinica GABA<sub>A</sub>R, te pokazali da dejstvom agonista GABA<sub>A</sub>R dolazi do smanjenja membranskog potencijala i intracelularne koncentracije Ca<sup>2+</sup> jona u primarnim ćelijskim kulturama vaskularnog tkiva, te smanjenja miogenog tonusa arterija. Od tada se jasno ukazuje na postojanje funkcionalnih vaskularnih GABA<sub>A</sub>R koji mogu predstavljati ciljno mjesto za nove terapijske modalitete u liječenju hipertenzije. Stoga, potpuna karakterizacija vaskularnih GABA<sub>A</sub>R predstavlja veliki izazov za savremenu farmakologiju kardiovaskularnog sistema.



Slika 6. Reprezentativan prikaz uzdužnog presjeka humane omentalne arterije, obilježene primarnim antitijelom za  $\alpha 4$  podjedinicu GABA<sub>A</sub>R (lijevi panel) i bez dodavanja primarnog antitijela, kao negativna kontrola (desni panel). Glatko-mišićni sloj je označen zvjezdicom. Slika je preuzeta iz izvora Yim i sar., 2020.

Sastav podjedinica određuje funkcionalne i farmakološke osobine individualnog tipa GABA<sub>A</sub>R. Stoga treba imati na umu da se funkcionalni parametri vjerovatno razlikuju kod vaskularnog GABA<sub>A</sub>R receptora u odnosu na "neuronske" tipove receptora, te u odnosu na različite tipove vaskularnih GABA<sub>A</sub>R. Neki od funkcionalnih parametara bi bili: koncentracija liganda neophodna za aktivaciju (EC<sub>50</sub>), stopa aktivacije receptora nakon ekspozicije liganda, brzina i stepen desenzibilizacije u prisustvu liganda, brzina deaktivacije nakon uklanjanja agoniste, srednje vrijeme otvorenosti i zatvorenosti pore receptora, trajanje aktivacije i vjerovatnoća otvaranja, kada je receptor potpuno okupiran ligandom (Farrant i Nusser, 2005). Poznato je da se veliki broj strukturno raznovrsnih jedinjenja vezuje za GABA<sub>A</sub>R: GABA, benzodiazepini, gaboksadol, loreklezor, furosemid, barbiturati, neurosteroidi, anestetici, alkohol (Kopri i sar., 2002), pa čak i prirodni polifenoli, kao što su flavonoidi i flortanini (Ríos i sar., 2022). Međutim, pojedinačni

tipovi i podtipovi GABA<sub>A</sub>R pokazuju specifične obrazce reagovanja na različite ligande, što je činjenica koja najviše motiviše i ohrabruje dalja istraživanja u oblasti razvoja novih lijekova (Tretter i Moss, 2008). Težnja je razviti nova jedinjenja kojima bi se specifično ciljale pojedinačne populacije receptora, u perspektivi svakako i vaskularnih GABA<sub>A</sub>R, čime bi se postigla efikasnost liječenja i izbjegli različiti neželjeni efekti.

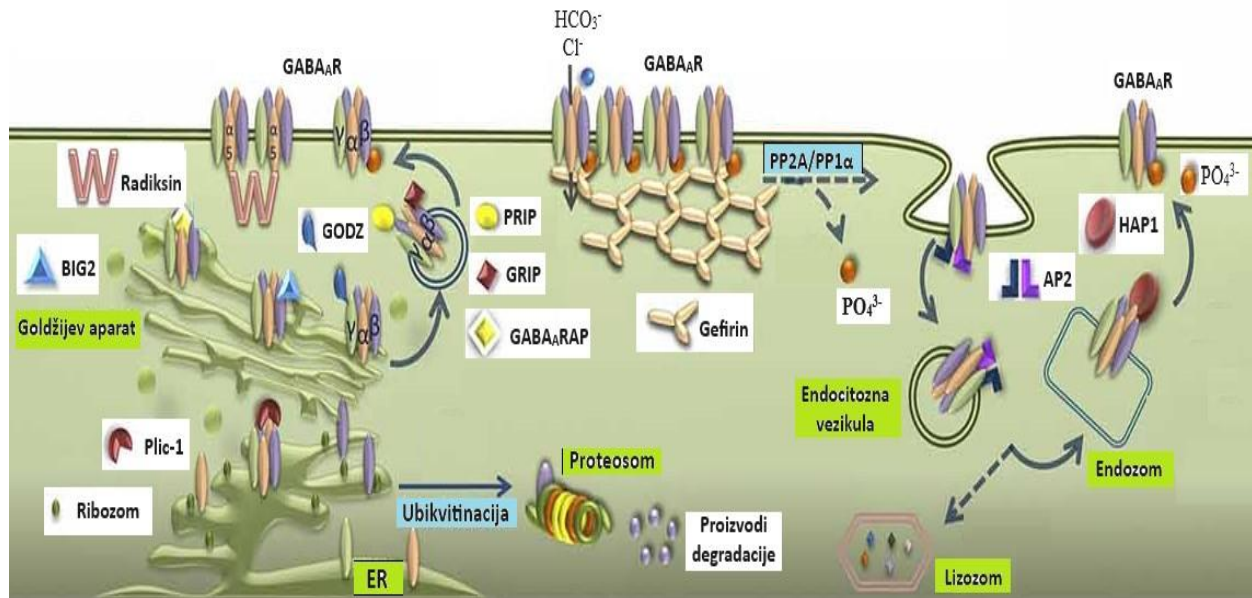
Za centralni GABA<sub>A</sub>R se zna da interreaguje sa brojnim intracelularnim proteinima i to preko svojih intracelularnih petlji, što za posledicu ima modifikaciju funkcionalnih karakteristika receptora, te posredovanje u intracelularnom transportu, sazrijevanju i stabilizaciji receptora (Tretter i Moss, 2008). Pretpostavka je da i vaskularni GABA<sub>A</sub>R ostvaruju sličan vid interakcije sa intraćelijskim prostorom, te u nastavku slijedi pregled najvažnijih supstrata intracelularne komunikacije.

## 1.5 Intracelularni proteini koji stupaju u interakcije sa GABA<sub>A</sub>R

Kinaze za koje je poznato da fosforilišu GABA<sub>A</sub>R su: cAMP-zavisna protein kinaza (PKA), protein kinaza C (PKC), Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin- zavisna kinaza II (CaMK-II), protein kinaza B (Akt) i tirozin kinaza iz porodice Src (Tretter i Moss, 2008). PKA može pojačati ili smanjiti funkciju GABA<sub>A</sub>R (McDonald i sar., 1998; Nusser i sar., 1999), a uključena je u fosforilaciju GABA<sub>A</sub>R koji sadrže β1 ili β3 podjedinicu, i to preko adapterskog proteina AKAP79/150 (Brandon i sar., 2003). Ukoliko se fosforilacija izvrši na β3 podjedinici, na serin pozicijama 408 i 409, dolazi do pojačavanja funkcije receptora, dok ista fosforilacija na poziciji serina 409 na β1 podjedinici izaziva smanjenje funkcije GABA<sub>A</sub>R. PKA negativno reguliše endocitozu GABA<sub>A</sub>R, i to fosforilacijom atipičnog obrazca vezivanja za klatrinski-AP2 adapterski kompleks. Slično PKA, u zavisnosti od sastava podjedinica PKC ima različite efekte na funkciju GABA<sub>A</sub>R, a svoju aktivnost ostvaruju preko vezanog proteina RACK-1 (Jovanovic i sar., 2004; Herring i sar., 2005). Efekti CaMK-II na GABA<sub>A</sub>R razlikuju se u neuronskom okruženju u poređenju sa *in vitro* efektima na ćelijskim kulturama (Houston i Smart, 2006). *In vitro* mjesta fosforilacije GABA<sub>A</sub>R od strane CaMK-II su: β1- serin 384 i 408, β2- serin 410, β3- serin 383 i 408, γ2S/L- serin 348 i treonin 350, γ2L- serin 343 (McDonald i Moss, 1994).

Pored kinaza, GABA<sub>A</sub>R su supstrati za brojne fosfataze. Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin- zavisna fosfataza (kalcineurin) vezuje se direktno za intracelularnu petlju γ2 podjedinice GABA<sub>A</sub>R, čime defosforiliše receptor i uzrokuje njegovu deaktivaciju (Wang i sar., 2003). Poznato je da protein fosfataza 1alfa (PP1A) reguliše fosforilaciju β podjedinica preko PKA, pri čemu su Terunuma i sar. (2004) predložili sljedeći model: aktivirani receptori vezani za G protein povećavaju intracelularne nivoe cAMP, koji dalje pojačavaju aktivnost PKA; aktivirana PKA fosforiliše GABA<sub>A</sub>R, ali i protein PRIP-1 koji je vezan za GABA<sub>A</sub>R (neaktivni protein tipa 1 povezan sa fosfolipazom C) koji u bazalnim uslovima vezuje PP1A i drži ga u neaktivnom obliku; fosforilisani PRIP-1 oslobađa PP1A što rezultira defosforilacijom β podjedinice GABA<sub>A</sub>R. Osim direktne regulacije funkcije receptora u fosforilisanom stanju, porodica proteina PRIP (PRIP-1 i PRIP-2) takođe je uključena i u endocitozu GABA<sub>A</sub>R (Kanematsu i sar., 2007).

Poznato je da veliki broj intracelularnih proteina ostvaruje direktnu interakciju sa intracelularnim domenima GABA<sub>A</sub>R, te su stoga važni za regulisanje membranskog transporta i lokalizacije GABA<sub>A</sub>R (Slika 7).



Slika 7. Ilustracija lokalizacije i uloge različitih intracelularnih proteina koji stupaju u interakciju sa GABA<sub>A</sub>R. Nesastavljene podjedinice GABA<sub>A</sub>R podvrgavaju se procesima poli-ubikvitinacije, a potom završavaju ciklus proteozomalnom degradacijom. GABA<sub>A</sub>AP transport do Goldžijevog aparata negativno je regulisan preko Plic-1. Isporku GABA<sub>A</sub>AP do plazmatske membrane regulišu GODZ, BIG2, PRIP i GRIP (protein koji intereaguje sa glutamatnim receptorom). Fosforilacija β3 ili γ2 podjedinice na njihovoj intracelularnoj petlji negativno reguliše internalizaciju GABA<sub>A</sub>R. Proces GABA<sub>A</sub>R endocitoze posredovan je AP2/klatrinom/dinaminom. Većina internalizovanih GABA<sub>A</sub>R brzo se reciklira nazad u plazmatsku membranu mehanizmom koji zavisi od interakcije sa HAP1, dok se nerekicirani GABA<sub>A</sub>R usmjeravaju na lizozomsku degradaciju. Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora Mele i sar., 2019.

GABA<sub>A</sub>RAP ili protein vezan sa GABA<sub>A</sub>R (eng. *GABA<sub>A</sub>R associated protein*) uglavnom je lokalizovan u intracelularnim odjeljcima, kao što su endoplazmatski retikulum (ER), Goldžijev aparat i intracelularne vezikule, a samo mali dio je direktno ko-lokalizovan sa sinaptičkim GABA<sub>A</sub>R (Leil i sar., 2004). Smatra se da je GABA<sub>A</sub>RAP važan regulator kinetike kanala, te da se vezivanjem za intracelularnu petlju γ2 podjedinice uključuje u regulaciju transporta receptora kroz ćeliju (Luu i sar., 2006). GABA<sub>A</sub>RAP genetski nokaut (KO, eng. *knock out*) miševi izgledaju potpuno zdravi i pokazuju normalno sinaptičko grupisanje GABA<sub>A</sub>R (O'Sullivan i sar., 2005), što ukazuje da se njegova funkcija može zamjeniti drugim ćelijskim proteinima koji pokazuju visoku homologiju sa GABA<sub>A</sub>RAP, uključujući GATE-16 (eng. *Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa*). Pored toga, poznato je da se GABA<sub>A</sub>RAP i GATE-16 mogu naći i na autofagozomskim membranama, budući da su homolozi proteina kvasca Aut7, koji je povezan sa autofagozomima (Tretter i Moss, 2008). Autofagija je odgovorna za najveći dio intracelularne degradacije proteina, pogotovo tokom gladi i apoptoze i igra važnu ulogu u remodelovanju ćelije, pri čemu se mali agregati abnormalnih proteina razgrađuju autofagijom. Citoplazmatski sastojci, uključujući organele, obavijeni su membranskom vrećicom koja se naziva izolaciona membrana. Nastali autofagozomi spajaju se sa endozomima ili lizozomima, nakon čega se degradira sadržaj iz citoplazme. Proces je prvobitno izučavan na ćelijama kvasca, gdje je utvrđeno da je više od 16 gena potrebno za formiranje autofagozoma, a u cijelom procesu značajnu interakciju ostvaruju i GABA<sub>A</sub>RAP i GATE-16 (Tretter i Moss, 2008).

Plic-1 je protein okarakterisan kao partner za vezivanje GABA<sub>A</sub>R, jer stupa u interakciju sa intracelularnom petljom α1, α2, α3, α6 i β3 podjedinice, ali nikako sa γ2 i δ podjedinice (Tretter i



Moss, 2008). Njegovo ime (eng. *Protein linking IAP and cytoskeleton*) potiče od interakcije sa IAP (protein povezan sa integrinom; eng. *integrin-associated protein*, CD47) i srednjim filamentima koji sadrže vimentin. Elektronska mikroskopija otkrila je njegovo prisustvo u jamama obloženim klatrinom, na ivici Goldžijevog aparata, ER i direktno sa GABA-ergijskim sinapsama. Kako Plic-1 ima N-terminalni domen sličan ubikvitinu, te domen povezan sa ubikvitinom u C-terminusu, a koji posreduje u interakcijama sa podjedinicama GABA<sub>A</sub>R, vjeruje se da Plic-1 stabilizuje intracelularne receptore, vjerovatno tako što inhibira poliubikvitinaciju i proteosomsku degradaciju (Bedford i sar., 2001).

Protein 1 povezan sa Huntingtinom (HAP1; eng. *Huntingtin-associated protein 1*), nosi ovaj naziv jer je prvobitno pronađen povezan sa Huntingtinom, proteinskim proizvodom gena za Huntingtonovu bolest, a tek kasnije utvrđena je njegova interakcija sa  $\beta$ 1-3 podjedinicama GABA<sub>A</sub>R (Kittler i sar., 2004). To je citosolni protein, uključen u procese transporta receptora kroz ćeliju, a prisutan je u dendritima, aksonima i perinuklearnim strukturama u somi, tako da mu je aktivnost uglavnom vezana za neuronske GABA<sub>A</sub>R.

Faktor interakcije sa GABA<sub>A</sub>R 1 (GRIF-1; eng. *GABA<sub>A</sub> receptor interacting factor-1*) identifikovan je kao protein koji stupa u interakciju sa  $\beta$ 2 podjedinicom (Beck i sar., 2002). Iako još nisu sprovedene funkcionalne studije koje bi direktno odgovorile na njegovu ulogu, smatra se da GRIF-1 učestvuje u transportu receptora jer, osim što je homolog HAP1, može direktno da stupi u interakciju sa kinezinskim motornim proteinima (Brickley i sar., 2005).

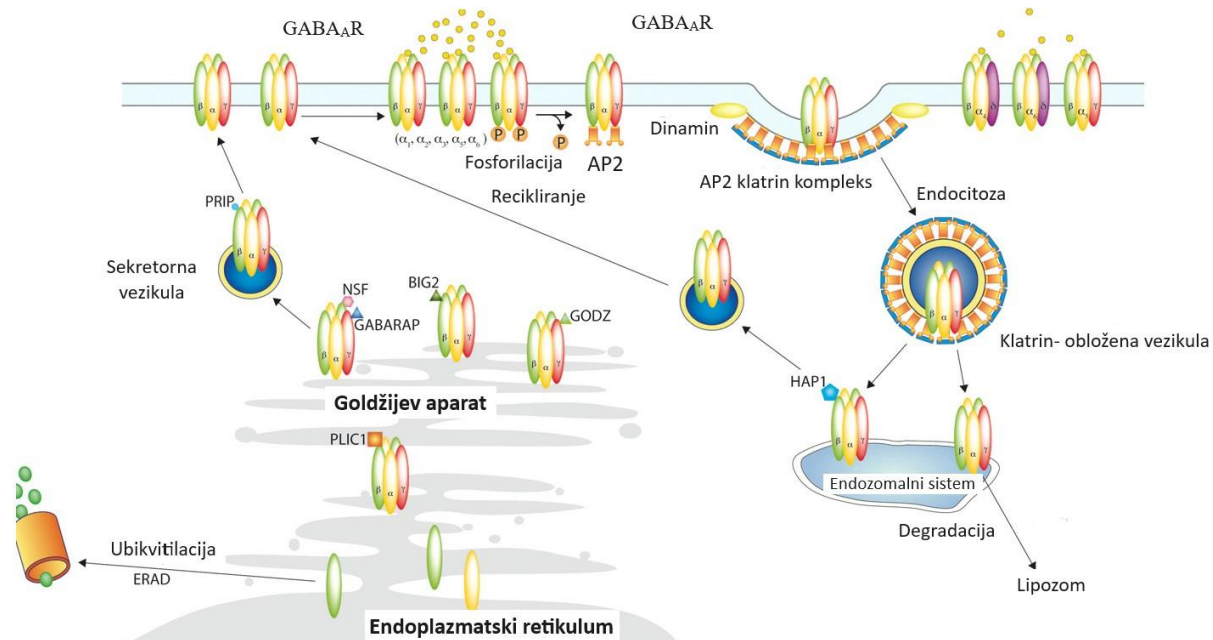
Brefeldin A-inhibiran GDP/GTP izmjenjivački faktor 2 (BIG2; eng. *Brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2*) je GDP/GTP faktor razmjene, težine od 200 kDa, na malim G-protein ADP-ribozilacija faktorima (ARF; eng. *G-protein ADP-ribosylation factors*), koji su uključeni u transport proteina kroz trans-Goldžijevu mrežu (TGN; eng. *Trans-Golgi network*) u signalni put egzocitoze. BIG2 vezuje se za intracelularnu petlju svih  $\beta$  podjedinica (Charych i sar. 2004), a poznato je da ko-ekspresija BIG2 i  $\beta$ 3 podjedinice dovodi do gubitka  $\beta$ 3-GABA<sub>A</sub>R na putu od ER do Goldžijevog aparata (Tretter i Moss, 2008). Sugerije se da bi BIG2 mogao imati važnu ulogu u transportu novoformiranih GABA<sub>A</sub>R, i to pomoću vezikula obloženih klatrinom/AP-1, na putu do plazmatske membrane, te ulogu u reciklaži GABA<sub>A</sub>R (Shen i sar., 2006).

Goldži-specifičan DHHC protein cinkovih prstiju (GODZ; eng. *Golgi-specific DHHC zinc finger protein*) stupa u interakciju sa  $\gamma$ 2 podjedinicom, i to na intracelularnoj petlji sa cisteinom, blizu mjesta vezivanja za GABA<sub>A</sub>AP. Dokazano je da je intracelularna petlja  $\gamma$ 2 podjedinice podložna palmitoilaciji na pet mjesta cisteina, što utiče na klasterovanje GABA<sub>A</sub>R i stabilnost ćelijske površine (Keller i sar., 2004; Rathenberg i sar., 2004). S obzirom da je GODZ protein sa četiri transmembranska regiona i intracelularnim N- i C- završetkom, te da sadrži DHHC-CRD domen, predviđa se da on ima aktivnost palmitoil-transferaze (Tretter i Moss, 2008). GODZ se uglavnom nalazi u Goldžijevom aparatu, a kada se prekomjerno eksprimira u HEK ćelijama,  $\gamma$ 2 podjedinica se intracelularno zarobljava sa GODZ-om, dok u slučaju ko-ekspresije sa  $\alpha$ 2 $\beta$ 3 $\gamma$ 2 receptorima GODZ djelimično napušta Goldžijev aparat, kako bi osigurao transport receptora na površinu (Fang i sar., 2006).

Radiksin je član ERM porodice (eng. *ezrin/radixin/moesin*) proteina koji su strukturno slični veznim mjestima N- završetka FERM domena i C-završetka F-aktina, koja ih povezuju za citoskelet. Radiksin stupa u interakciju sa nekoliko transmembranskih proteina, a jedan od njih je ekstrasinaptički  $\alpha$ 5GABA<sub>A</sub>R (Serwanski i sar., 2006). Da bi povezao  $\alpha$ 5 podjedinicu sa aktinom, neophodno je da se radiksin aktivira fosforilacijom, kako bi se prvo ostvarilo intramolekularno vezivanje između N- i C- završetaka (Loebrich i sar., 2006). Radiksin grupiše  $\alpha$ 5GABA<sub>A</sub>R

nezavisno od gefirinskog sistema, što otvara mogućnost njegove interakcije sa vaskularnim  $\alpha 5$ GABA<sub>A</sub>R.

Opisane uloge gore navedenih proteina odnose se na interakcije sa neuronskim GABA<sub>A</sub>R, s obzirom da je najviše studija rađeno na moždanim strukturama i modelima. Pretpostavka je da su neki od navedenih proteina uključeni u regulaciju transporta, lokalizaciju i stabilnost vaskularnih GABA<sub>A</sub>R. Stoga, dok ne dobijemo neophodne rezultate novih studija na vaskularnim strukturama, ostaje nam da spekuliramo o modelima sinteze, sklapanja, transporta i uklanjanja vaskularnih GABA<sub>A</sub>R (Slika 8).



Slika 8. Interakcije GABA<sub>A</sub>R u procesu "trafficking" sa intracelularnim proteinima. Podjedinice GABA<sub>A</sub>R sintetišu se i sklupaju u ER, a zatim sazrijevaju u Goldžijevom aparatu, te kroz sekretorni put dopijevaju do ćelijske membrane. Ekstrasinaptički GABA<sub>A</sub>R aktiviraju se nižim koncentracijama ambijentalne GABA-e u ekstracelularnom prostoru. Fosforilacija ne utiče samo na funkciju receptora, već reguliše i njegovo uklanjanje sa površine putem endocitoze posredovane klatrinom. Iz endozomalnog sistema GABA<sub>A</sub>R se recikliraju na površinu ćelije ili se razgrađuju u lizozomima. Drugi sistem degradacije GABA<sub>A</sub>R funkcioniše kroz proteazom nakon ubikvitilacije. Slika je preuzeta i prilagođena iz izvora Tretter i Moss, 2008.

## 1.6 Pozitivni alosterni modulatori GABA<sub>A</sub>R

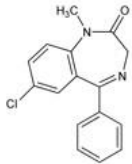
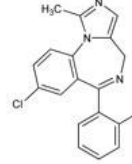
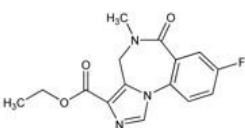
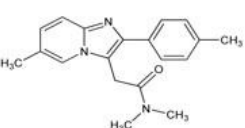
Za aktivno mjesto na GABA<sub>A</sub>R, koje se naziva i ortosterno, pored GABA-e mogu se vezati i brojni drugi ligandi. Ortosterni agonisti, kao što su GABA, gaboksadol, izoguvacin, muscimol i progabid aktiviraju GABA<sub>A</sub>R, što dovodi do povećane provodljivosti Cl<sup>-</sup> jona, dok se ortosterni antagonisti, kao što su bikukulin i gabazin, takmiče sa GABA-om za vezivanje, te tako spriječavajući njen efekat snižavaju Cl<sup>-</sup> provodljivost (Ghit i sar., 2021).

Efekat vezivanja GABA-e za receptor može biti izmjenjen vezivanjem alosternih modulatora. Alosterni modulatori se vezuju na drugom mjestu na GABA<sub>A</sub>R, ali bez prisustva GABA-e ne mogu aktivirati GABA<sub>A</sub>R. U slučaju kada je vezana GABA, oni izazivaju konformacione promjene na

receptoru koje mogu biti pozitivnog, negativnog ili neutralnog karaktera. Promjene koje dovode do povećanja provodljivost Cl<sup>-</sup> jona uzrokuju PAM-ovi kao što su barbiturati, BZD, z-lekovi (ne-BZD), alkohol (etanol), etomidat, glutetimid, određeni anestetici i neurosteroidi. S druge strane, negativni alosterični modulatori (NAM), kao što su pregnenolon sulfat i cink, smanjuju Cl<sup>-</sup> provodljivost, dok neutralni ili tihi (eng. *silent*, SAM) modulatori (flumazenil) svojom interakcijom sa GABA<sub>A</sub>R ne utiču na otvaranje Cl<sup>-</sup> kanala, već samo spriječavaju PAM ili NAM da ostvare svoje dejstvo (Ghit i sar., 2021).

Upravo sa razvojem tehnika za identifikaciju strukture GABA<sub>A</sub>R, razvijani su i eksperimentalni pristupi za karakterizaciju različitih podjedinica, te su sintetisana jedinjenja selektivna za pojedine podtipove receptora. Takvi ligandi bi djelovanjem isključivo na određene podtipove GABA<sub>A</sub>R mogli da ispolje specifične farmakološke efekte, čime bi se doprinijelo karakterizaciji vaskularnih GABA<sub>A</sub>R.

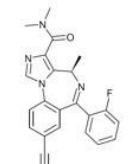
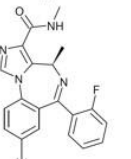
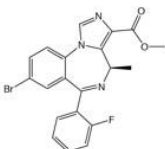
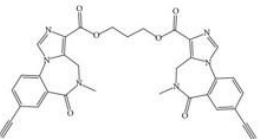
Najviše pažnje posvećeno je GABA<sub>A</sub>R osjetljivim na BZD modulaciju. Vezivno mjesto za ligande sa BZD strukturom nalazi se na granici između  $\gamma$  i  $\alpha$  podjedinice (Sieghart, 2015). Ligandi koji djeluju preko BZD mjesta vezivanja mogu biti pozitivni, neutralni ili negativni modulatori GABA-ergičke transmisije, odnosno agonisti, antagonisti ili inverzni agonisti BZD veznog mjesta (Rudolph i Knoflach, 2011).

Modulator	Hemijska struktura	Hemijski naziv	Ref.
Diazepam		7-hloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H1,4-benzodiazepin-2-on	Savić i sar., 2010
Midazolam		8-hloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin	Savić i sar., 2010
Flumazenil		Etil-8-fluoro-5,6-dihidro-5-metil-6-okso4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboksilat	Siebert i sar., 2018
Zolpidem		(2R,3R)-2,3-dihidroksibutandioinska kiselina;N,N-dimetil-2-[6-metil-2-(4-metilfenil)imidazo[1,2-a]piridin-3-il]acetamid	Savić i sar., 2010

Slika 9. Hemijske strukture i nazivi modulatora BZD veznog mjesta na GABA<sub>A</sub>R, široko zastupljeni u kliničkoj praksi.

Karakterizacija određenog tipa GABA<sub>A</sub>R obično se započinje primjenom dobro poznatih modulatora BZD veznog mjesta na GABA<sub>A</sub>R, koji se dugo primjenjuju u kliničkoj praksi (Slika 9). U nastavku slijede glavne terapijske indikacije za neke od izdvojenih modulatora, koji igraju ulogu referentnih supstanci u različitim modelima ili metodama istraživanja.

Terapijske indikacije za diazepam su: a) kratkoročno ublažavanje simptoma kod anksioznosti koja je teškog oblika, onesposobljuje pacijenta ili izaziva neprihvatljive tegobe, a javlja se sama ili udružena sa nesanicom ili kratkotrajnim psihosomatskim, organskim ili psihičkim oboljenjem; b) cerebralna paraliza; c) mišićni spazam i tetanus; d) terapija akutnih konvulzija (status epilepticus), konvulzija nastalih usljed trovanja i febrilnih konvulzija; e) simptomatsko liječenje akutne alkoholne apstinencije; f) premedikacija nervoznih pacijenata prije hiruških i stomatoloških intervencija. Terapijske indikacije za midazolam su: a) sedacija uz očuvanje svijesti prije i tokom dijagnostičkih ili terapijskih postupaka sa lokalnom anestezijom ili bez nje; b) anestezija (kao premedikacija, za uvođenje u anesteziju i kao sedativna komponenta u kombinovanoj anesteziji; c) sedacija u jedinicama intenzivne njege. Terapijske indikacije za flumazenil su: a) okončanje opšte anestezije koja je indukovana i/ili održavana BZD; b) reverzija sedacije i drugih specifičnih centralnih efekata izazvanih BZD. Terapijske indikacije za zolpidem su: a) povremena nesanica; b) prolazna nesanica (Agencija za lijekove i medicinska sredstva Bosne i Hercegovine).

Modulator	Hemijska struktura	Hemijski naziv	Ref.
GL-II-73		(R)-8-Etini-6-(2-fluorofenil)-N,N,4-trimetil-4H-benzo[f]imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-karboksamid	Prevot i sar., 2019
MP-III-022		(R)-8-etini-6-(2-fluorofenil)-N,4-dimetil-4H-benzo[f]imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-karboksamid	Stamenić i sar., 2016
MP-III-058		Metil (R)-8-bromo-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-benzo[f]imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-karboksilat	Gajić Bojić i sar., 2023
XLi-093		8-etini-1-[3-(8-etini-5-metil-6-okso-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karbonil)oksipropil]-5-metil-6-okso-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboksilna kiselina	Clayton i sar., 2015

Slika 10. Hemijske strukture i nazivi modulatora BZD veznog mjesta, selektivni za  $\alpha 5$ GABA<sub>A</sub>R

Sa razvojem modela farmakofor/receptor, zasnovanog na studijama afiniteta i efikasnosti (Huang i sar., 2000), u istraživačkim laboratorijama širom svijeta predano se radi na sintezi i karakterizaciji serije visoko selektivnih i efikasnih PAM-ova. Tako je omogućena sintezu  $\alpha$ xGABA<sub>A</sub>R - selektivnih liganada, kandidata za ispitivanje potencijalne vazoaktivnosti, izazvane modulacijom vaskularnih GABA<sub>A</sub>R. Na Slici 10 izdvojeni su nosintetisani modulatori, selektivni za  $\alpha 5$ GABA<sub>A</sub>R (pri čemu su GL-II-73, MP-III-022 i MP-III-058 okarakterisani kao pozitivni, dok je ligand XLi-093 neutralan modulator  $\alpha 5$ GABA<sub>A</sub>R). Pretpostavka je da su  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  i  $\alpha 6$  podjedinice, kao pretežno ekstrasinaptičke, uključene u strukturu vaskularnih GABA<sub>A</sub>R. Stoga, ispitivanje vaskularne aktivnosti PAM-ova koji su funkcionalno selektivni za GABA<sub>A</sub>R koji sadrže ove podjedinice može doprinijeti karakterizaciji vaskularnih GABA<sub>A</sub>R. Na slici 11 predstavljeni su nosintetisani PAM-ovi selektivni za  $\alpha 4$ GABA<sub>A</sub>R (XHe-III-074), odnosno za  $\alpha 6$ GABA<sub>A</sub>R (DK-

I-56-1), kao i jedan neselektivan, ali visoko efikasan PAM (SH-I-048A). Ovdje treba napomenuti da se klasični BZD ne vezuju za GABA<sub>A</sub>R koji sadže  $\alpha 4$  ili  $\alpha 6$  podjedinice (Olsen i Sieghart, 2009).

Modulator	Hemijska struktura	Hemijski naziv	Ref.
SH-I-048A		(S)-7-bromo-5-(2-fluorofenil)-3-metil-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-on	Obradović i sar., 2014
DK-I-56-1		7-metoksi-5-(4-metoksi-d3)fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on	Vasović i sar., 2019
XHe-III-074		(S)-terc-Butil-7-metoksi-9-okso-11,12,13,13a-tetrahidro-9H-benzo[e]imidazo[5,1-c]pirolo[1,2-a][1,4]diazepin-1-karboksilat	Yocum i sar., 2016

Slika 11. Hemijske strukture i nazivi neselektivnih i selektivnih modlulatora BZD veznog mjesta na GABA<sub>A</sub>R.

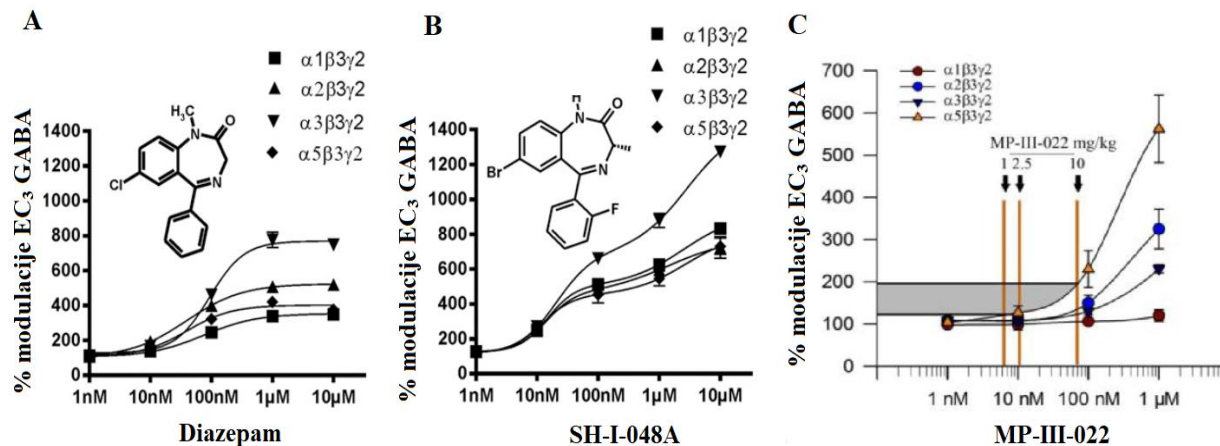
U Tabeli 2 prikazani su *in vitro* profili afiniteta, a na Slici 12 predstavljene su vrijednosti potencijacije za pojedine podtipove GABA<sub>A</sub>R pri različitim koncentracijama liganada, korišćenih u različitim farmakološkim modelima.

Diazepam i midazolam su često korišćeni neselektivni PAM-ovi visoke efikasnosti za GABA<sub>A</sub>R koji sadrže  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  ili  $\alpha 5$  podjedinice. Zolpidem je visoko-selektivan ligand za GABA<sub>A</sub>R koji sadrže  $\alpha 1$ , što ga čini pogodnim za ispitivanje uključenosti  $\alpha 1$ GABA<sub>A</sub>R u različitim farmakološkim modelima. Izdvajanjem nekog od dostupnih  $\alpha x$  -selektivnih PAM-ova u pogledu farmakološke aktivnosti na izolovanim krvnim sudovima, kako u smislu izražene vaskularne aktivnosti, tako i u smislu izostanka ili slabe vaskularne aktivnosti, doprinijelo bi fenotipizaciji vaskularnih GABA<sub>A</sub>R.

Tabela 2. Afiniteti ispitivanih supstanci (K<sub>i</sub>) za BZD mjesto vezivanja humanih rekombinantnih  $\alpha x \beta 3 \gamma 2$  GABA<sub>A</sub>R, izraženi u nM.

PAM	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	Reference
Diazepam	14.0	7.8	13.9	ND	13.4	ND	Savić i sar., 2010.
SH-I-048A	0.77	0.17	0.38	ND	0.11	ND	Obradović i sar., 2014.
Zolpidem	19	450	398	ND	>15 000	ND	Savić i sar., 2010.
MP-III-022	850	360	660	ND	55	ND	Timić Stamenić i sar., 2016
MP-III-058	350	690	580	ND	100	ND	Gajić Bojić i sar. 2023

XLi-093	>1000	>1000	858	1550	15	>2000	Li i sar., 2003.
---------	-------	-------	-----	------	----	-------	------------------



Slika 12. Krive efikasnosti za PAM-ove: (A) diazepam, (B) SH-I-048A i (C) MP-III-022, na  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ ,  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ ,  $\alpha 3\beta 3\gamma 2$  i  $\alpha 5\beta 3\gamma 2$  podipu GABA<sub>A</sub>R, pri EC<sub>3</sub> GABA (koncentracija GABA-e koja izaziva 3% maksimalne efikasnosti). Slika je prilagođena i preuzeta iz izvora: (Timić Stamenić i sar., 2016) i (Obradović i sar., 2014).

## 1.7 Vaskularni efekti benzodiazepina

Iako su vaskularni efekti GABA-e kompleksni i samo djelimično poznati, vazodilatacijska svojstva BZD odavno su poznata i klinički priznata. Pored primarne indikacije u liječenju anksioznosti i drugih psihijatrijskih stanja, BZD izazivaju značajno miorelaksantno i antihipertenzivno dejstvo, te ih tako smatraju starom klasom novih antihipertenziva u tretmanu akutnih stanja hipertenzije (Colussi i sar., 2018). Rezultati kliničkih studija pokazali su da BZD značajno smanjuju vrijednosti krvnog pritiska kod zdravih dobrovoljaca (Kitajima i sar., 2004), kao i kod pacijenata koji su podvrgnuti operaciji (Yamakoshi i sar., 2007), te da su podjednako efikasni u liječenju urgentnih hipertenzivnih stanja kao i ACE (angiotenzin konvertujući enzim, eng. *angiotensin-converting enzyme*) inhibitori (Yilmaz i sar. 2011).

Ove kliničke studije potkrepljene su brojnim eksperimentalnim *in vitro* studijama za procjenu vaskularne aktivnosti BZD. Kao klinički najčešće korišćeni PAM-ovi GABA<sub>A</sub>R dokazano je da ispoljavaju direktne vazodilatacijske efekte na izolovanim krvnim sudovima (Moriyama i sar., 2011, Colussi i sar., 2011, Kagota i sar., 2021). U Tabeli 3 predstavljeni su značajni procenti relaksacije ostvareni na izolovanoj pacovskoj aorti, u prisustvu ispitivanih BZD (Kagota i sar., 2021). Slične funkcionalne studije na izolovanim krvnim sudovima pokazale su da relaksantni efekti BZD nisu povezani sa aktivacijom TSPO, translokatorskog proteina od 18 kDa, ranije zvanog periferni BZD receptor (eng. *translocator protein 18 kDa*) (Galindo i sar., 2001, Park i sar., 2006, Colussi i sar., 2011).

Na bazi ovih nalaza, vjeruje se da BZD ostvaruju svoju vazoaktivnost ne samo preko centralnog i perifernog nervnog sistema, već i direktnim dejstvom na vaskularne GABA<sub>A</sub>R (Jacob i White, 2000, El Idrissi i sar., 2013).

Tabela 3. Parametri relaksacije određeni za ispitivane BZD ( $10^{-5}$  M) na preparatima izolovane pacovske aorte. Slika je prilagođena i preuzeta iz izvora Kagota i sar., 2021.

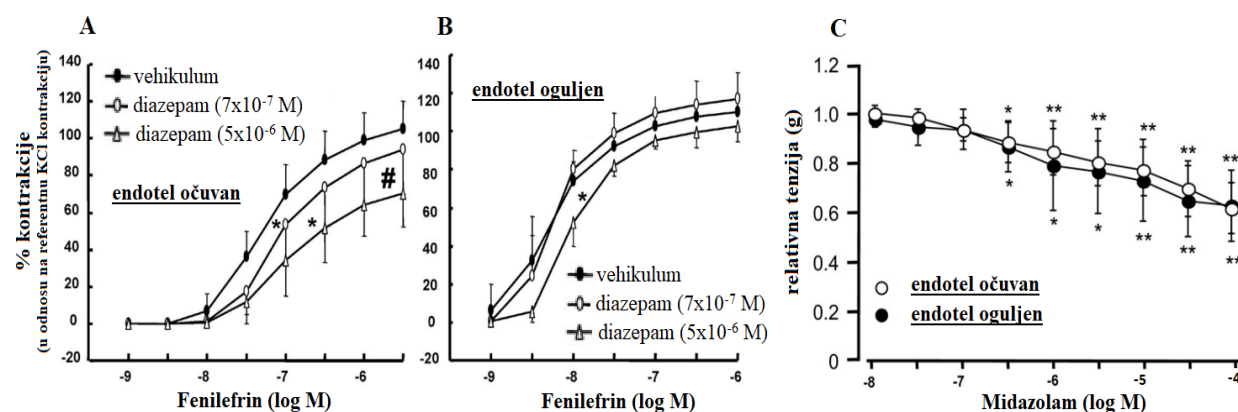
	<b>-log EC<sub>50</sub> (M)</b>	<b>E<sub>max</sub> (%)</b>
Rastvarač	–	3,2 ± 1,3
Diazepam	5,26 ± 0,72	65,4 ± 12,2
Estazolam	5,03 ± 1,26	55,9 ± 5,7
Etizolam	5,48 ± 0,35	66,8 ± 10,4
Tofisopam	5,06 ± 0,59	67,0 ± 6,4
Zolpidem	5,47 ± 0,14	83,8 ± 10,1

U cilju utvrđivanja mehanizama vazoaktivnosti BZD rađena su brojna *in vitro* ispitivanja sa diazepamom, uglavnom na izolovanim segmentima pacovske aorte. Pokazano je da diazepam inhibira FE- indukovane oscilacije kalcijuma u glatkim mišićima (Hong i sar., 1998), suprimira FE- izazvane kontrakcije aorte (Park i sar., 2006), te uzrokuje značajnu vazodilataciju FE- prekontrahovane aorte (Galindo i sar., 2001, Kagota i sar., 2021).

Za diazepam je utvrđeno da čak pri kliničkoj koncentraciji ( $7 \times 10^{-7}$  M) slabi FE kontrakciju izolovane pacovske aorte, dok pri suprakliničkim koncentracijama ( $5 \times 10^{-6}$  M) značajno suprimira kontrakciju izazvanu FE-om (Park i sar., 2006) (Slika 13A,B).

Od malobrojnih ispitivanja na humanim krvnim sudovima, interesantan je nalaz vaskularne aktivnosti midazolama na izolovanoj gastroepipločnoj arteriji, kada su utvrđeni značajni relaksacijski efekti pri visokim koncentracijama ( $10^{-5}$  i  $10^{-4}$  M), što nije bio slučaj sa kliničkim koncentracijama ( $3 \times 10^{-6}$  M) midazolama (Moriyama i sar., 2011) (Slika 13C).

Osim toga, pokazano je da su relaksacijski efekti BZD na izolovanim krvnim sudovima antagonizovani u prisustvu flumazenila, te je tako sugerisano da je receptor sličan centralnom GABA<sub>A</sub>R osjetljivom na BZD odgovoran za ispoljenu vazoaktivnost (Monasterolo i sar., 2022, Moriyama i sar., 2011).



Slika 13. Efekti BZD na izolovanim krvnim sudovima: (A,B) Efekti diazepama na izolovanim prstenovima pacovske aorte u prisustvu FE; (C) Efekti midazolama na izolovanim prstenovima humane gastroepipločne arterije, koji su prethodno kontrahovani noradrenalinom. Slika je prilagođena i preuzeta iz izvora: (Park i sar. 2006) i (Moriyama i sar., 2011).

## 1.8 Mehanizmi relaksacije vaskularnih glatkih mišića

Za razliku od neuromišićne spojnice koja se nalazi na vlaknima skeletnih mišića, glatke mišićne ćelije su inervisane autonomnim nervnim vlaknima koja se difuzno granaju na vrhu mišićnih vlakana. U većini slučajeva, ova vlakna ne ostvaruju direktan kontakt sa ćelijskim membranama već formiraju difuzne spojeve koji luče svoju transmittersku supstancu u matriks, a ona dalje difundje nekoliko nanometara do mišićne ćelije (Sweeney i Hammers, 2018, Guyton i Hall, 2006). U normalnom stanju mirovanja, membranski potencijal glatko-mišićne ćelije iznosi oko -50 do -60 milivolti (Kuo i Ehrlich, 2015, Webb, 2003). Ćelijska membrana glatkih mišića ima mnogo više voltažno-zavisnih  $\text{Ca}^{2+}$  kanala nego skeletni mišići, te je upravo protok  $\text{Ca}^{2+}$  jona odgovoran za akcioni potencijal glatkih mišićnih ćelija, pa tako i za mehanizam relaksacije glatkih mišića. Ekstracelularna koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  jona kreće se u rasponu 2 – 4 mM, dok citosolna koncentracija u mirovnju iznosi približno 100 nM. Pored citosola, jedan dio intracelularne koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  jona odnosi se i na količine uskladištene unutar ER, a koje iznose približno 0,4 mM (Bootman, 2012).

Na Slici 14 predstavljeni su mehanizmi kontrakcije, odnosno relaksacije glatko-mišićne ćelije krvnog suda. Mehanizam kontrakcije započinje vezivanjem  $\text{Ca}^{2+}$  jona za kalmodulin, a zatim kombinacija kalmodulin-  $\text{Ca}^{2+}$  aktivira fosforilišući enzim miozin kinazu. Jedan od lakih lanaca svake miozinske glave, nazvan regulatorni lanac, fosforilise ova miozin kinaza, nakon čega miozinska glava ima sposobnost da se uzastopno vezuje za aktinski filament i da pokrene ciklus "povlačenja" i tako uzrokuje kontrakciju (Sweeney i Hammers, 2018). S druge strane, mehanizam relaksacije pokreće suprotne kaskadne procese, a nastaje kao rezultat smanjenja intracelularne koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  jona i/ili povećane aktivnosti enzima fosfataze MLC (eng. *myosin light chain*, lakog lanca miozina) (Gao i sar., 2001).

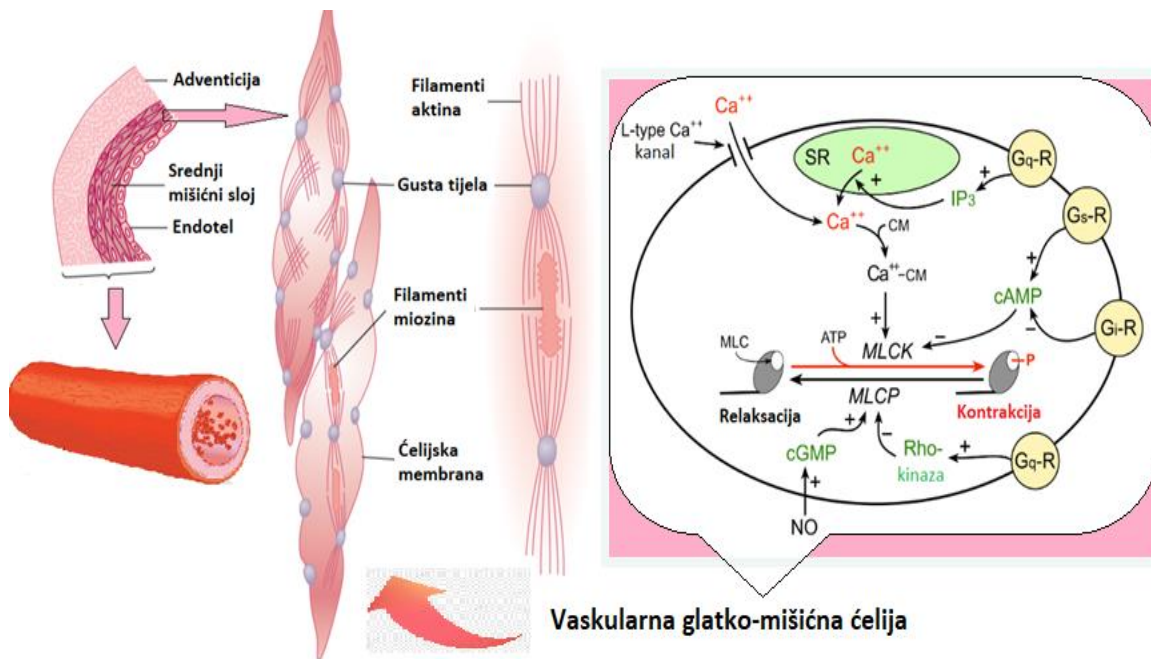
Međutim, značajan procenat svih kontrakcija glatkih mišića nastaje bez nervne aktivacije i generisanja akcionog potencijala, već direktnim dejstvom stimulišućih faktora, kao što su lokalni hemijski faktori ili različiti hormoni. Ovi lokalni medijatori mogu da iniciraju mehanizme relaksacije glatko-mišićne ćelije tako što dovode do hiperpolarizacije, odnosno povećanja stepena negativnosti unutar mišićne ćelije (Kuo i Ehrlich, 2015).

Osim toga, mehanizme kontrakcije/relaksacije mogu izazvati hormoni bez direktnog uticaja na promjenu membranskog potencijala. To uključuje aktivaciju membranskih receptora na način da ne dolazi do aktivacije voltažnih jonskih kanala, već do inhibicije oslobađanja intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  iz sarkoplazmatskog retikuluma. Poznati su membranski receptorski mehanizmi za aktivaciju citoplazmatskih enzima adenilat ciklaze ili gvanilat ciklaze, koji dalje dovode do formiranja sekundarnih glasnika: cikličnog adenzin monofosfata (cAMP) ili cikličnog gvanozin monofosfat (cGMP). Ovi sekundarni glasnici, pored mnogih drugih efekata, mogu da indirektno uzrokuju smanjenje intracelularne koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  jona i relaksaciju na više načina: promjenom fosforilacije brojnih enzima uključenih u kaskadu kontrakcije, aktivacijom pumpe koja pomjera  $\text{Ca}^{2+}$  jone iz citosola u ER (SERCA pumpa, eng. *SR/ER calcium ATPase*), te aktivacijom pumpi na ćelijskoj membrani koje izbaciju  $\text{Ca}^{2+}$  jone iz ćelije ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPazna pumpa (PMCA) i  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmjenjivač (NCKS)) (Kuo i Ehrlich, 2015).

Kako ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  jona u ER zavisi od hidrolize ATP-a, inhibicija  $\text{Ca},\text{Mg}$ -ATPaze na ER, te aktivnost  $\text{Ca}^{2+}$ -vezujućih proteina na ER uzrokuju smanjenje intracelularne koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$



jona (Webb, 2003). Plazmatska membrana također sadrži Ca,Mg-ATPazu, koja zajedno sa Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmjenjivačem pruža dodatni mehanizam za smanjenje intracelularne koncentracije Ca<sup>2+</sup> jona (Webb, 2003). Osim toga, mogući mehanizmi relaksacije uključuju i inhibiciju TRP (eng. *transient receptor potencial*) kanala i receptor-zavisnih Ca<sup>2+</sup> kanala na plazmatskoj membrani (Kuo i Ehrlich, 2015).



Slika 14. Struktura i mehanizmi kontrakcije/relaksacije vaskularne glatko-mišićne ćelije. Slika je prilagođena i preuzeta iz izvora: Klabunde R.E. Vascular Smooth Muscle Contraction and Relaxation. Cardiovascular physiology concepts [online]. Revised 7/5/2019, dostupno na: <https://cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP026>. [pristupljeno 04. avgusta 2022] i izvora (Guyton i Hall, 2006).

## 1.9 Značaj mjerenja vaskularne kontraktilnosti

Eksperimentalna vaskularna farmakologija fokusirana je na razvoj novih terapijskih modaliteta, uzimajući u obzir da su kardiovaskularne bolesti vodeći uzrok smrti širom svijeta. Mjerenje kontraktilnosti u izolovanim krvnim sudovima pruža funkcionalne dokaze o fenotipskim karakteristikama koje nastaju kao posljedica lokalnih ćelijskih i biokemijskih promjena (Jin i sar., 2018). Stoga *in vitro* eksperimenti za mjerenje vaskularne kontraktilne funkcije izolovanih krvnih sudova i dalje imaju veliki značaj u savremenim vaskularnim istraživanjima.

Metodologija istraživanja izolovanog tkiva u kupatilu razvijena je davne 1904., a postupak je prvi put opisao Rudolf Magnus (Upchurch i Iaizzo, 2022). Iako je metodologija utemeljena još početkom prošlog vijeka i danas laboratorije širom svijeta mjere vaskularnu kontraktilnu funkciju izolovanih animalnih i humanih krvnih sudova (Slika 15), o čemu svjedoči orgoman broj *PubMed* internet pretraga vezanih za ovu metodu (Jin i sar., 2018). Osim toga, mjerenje kontrakcije izolovanih tkiva u kupatilu za izolovane organe/tkiva danas se rutinski koristi kao "zlatni standard" za kliničku dijagnostiku suspektosti na malignu hipertermiju (Kim, 2012).

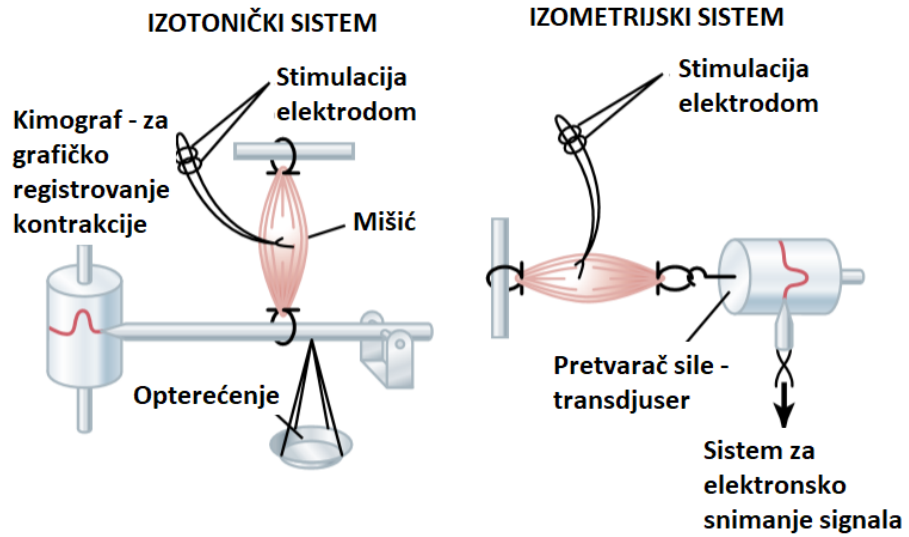


Slika 15. Ilustracija rada naučnika u laboratoriji početkom 20. vijeka i danas.

Dostupno na: <http://www.20thcenturyphotographs.com/product/scientists-at-work-in-a-laboratory/> [pristupljeno 09. avgusta 2022] i <https://www.reprocell.com/drug-efficacy-safety-adme/platform-technologies/organ-baths-wire-myographs> [pristupljeno 30. septembra 2023].

Mjerenje kontraktilnosti u kupatilu zasnovano je na primjeni izometrijskog sistema kontrahovanja. Ukoliko se tokom kontrakcije mišić ne skraćuje, takvu kontrakciju zovemo izometrijskom. Za razliku od izotoničke kontrakcije, gdje se mišić skraćuje tokom kontrahovanja, i to u prisustvu fiksnog opterećenja, mišićne kontrakcije se u izometrijskom sistemu registruju preko pretvarača sile, ali tako da ne dolazi do skraćanja mišićne dužine (Slika 16). Ovaj izometrijski sistem registruje striktno promjene u snazi same mišićne kontrakcije, dok kod izotoničkog sistema karakteristike kontrakcije zavise od opterećenja i njegove inercije (Guyton i Hall, 2006). Stoga je kupatilo za rad sa izolovanim tkivima nezamjenljiv farmakološki alat za ispitivanje funkcionalnih karakteristika kontrakcije različitih vrsta mišićnih tkiva (glatkih, srčanih ili skeletnih mišića), ali i za istraživanje mehanizama nervo-mišićnih interakcija.

Pored izolovanih krvnih sudova, izometrijsko mjerenje kontraktilnosti u kupatilu primjenjuje se na raznovrsnim tkivima/organima animalnog ili humanog porijekla, kao što su izolovani segmenti traheje, bronha, dijafragme, uterusa, mokraćne bešike i crijeva.



Slika 16 . Izotonički i izometrijski sistem za registrovanje mišićne kontrakcije. Slika je prilagođena i preuzeta iz izvora Guyton i Hall, 2006.

## 2. Ciljevi istraživanja

Ovo istraživanje, sprovedeno u četiri faze, imalo je dva osnovna cilja:

1. Identifikacija  $\alpha(1-6)$  i  $\gamma 2$  podjedinica  $GABA_{A}R$  u torakalnoj aorti pacova.
2. Ispitivanje vaskularne aktivnosti 12 supstanci, neselektivnih i selektivnih za određene podtipove ( $\alpha 4, \alpha 5, \alpha 6$  podtip) BZD mjesta vezivanja  $GABA_{A}R$  kod pacova.

U prvoj fazi istraživanja, primjenom RT-PCR metode, utvrdiće se nivo ekspresije iRNK za podjedinice:  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$  i  $\alpha 6$   $GABA_{A}R$ , u homogenatu pacovske torakalne aorte.

U drugoj fazi istraživanja, primjenom imunohistohemijske analize, utvrdiće se ekspresija i lokalizacija proteina  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$  i  $\gamma 2$  podjedinice  $GABA_{A}R$ , na poprečnom presjeku parafinski ukalupljene torakalne aorte pacova.

U trećoj fazi istraživanja, mjerenjem izometrijske kontrakcije izolovanih prstenova pacovske aorte, utvrdiće se vaskularna aktivnost GABA-e i različitih neselektivnih i selektivnih PAM-ova BZD mjesta vezivanja  $GABA_{A}R$  (diazepam, midazolam, zolpidem, SH-I-048A, MP-III-022, MP-III-058, GL-II-73, GL-II-74, XHe-III-074, DK-I-87-1, DK-I-56-1, XLi-093), i to u pogledu ostvarene relaksacije FE- prekontrahovanih prstenova, te u pogledu supresivnih efekata ispitivanih supstanci na FE kontrakciju.

U četvrtoj fazi istraživanja, primjenom specifičnih antagonista (PK11195, bikukulin, flumazenil, XLi-093, prazosin) ispitaće se mehanizam vazodilatacije različitih PAM-ova (diazepam, midazolam i MP-III-058), u kupatilu za rad sa izolovanim prstenovima pacovske aorte.

### 3. Metodologija

#### 1.10 Supstance

U ovoj studiji korišćeni su PAM-ovi GABA<sub>A</sub>R predstavljeni u Tabeli 4. Supstance sa zaštićenim kodovima (numeričko-slovne oznake) sintetisane su na Katedri za hemiju i biohemiju Univerziteta Viskonsin—Milvoki, SAD. Standardne hemikalije za izradu hranljivog rastvora za eksperimente na kupatilu za rad sa izolovanim organima (Lach:Ner, Zagreb, Hrvatska), GABA, FE hidrohlorid, acetilholin jodid, bikukulin, PK11195, prazosin hidrohlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), zolpidem (Toronto Chemical Research, North York, Kanada), diazepam (Opfikon, Švajcarska), midazolam (F. Hoffman-La Roche, Bazel, Švajcarska), te reagensi za RT-PCR i imunohistohemijsku analizu (Thermo Fisher Scientific, Fremont, SAD) komercijalno su dostupni. Primarna antitijela za imunohistohemijsku analizu, za podjedinice  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  i  $\gamma 2$  ljubazno su donirana od strane saradničke laboratorije dr Petra Scholze (*Center for Brain Research, Medical University*, Beč, Austrija). Pomenuta antitijela sintetisana su na bazi imunološkog odgovora kunića prema peptidu koji u svojim sekvencama odgovara sekvencama podjedinica GABA<sub>A</sub>R pacova (osim za  $\alpha 4$  podjedinicu čije su sekvence majmuna bile identične sa odgovarajućim humanim sekvencama), dok su primarna antitijela za podjedinice  $\alpha 1$  i  $\alpha 5$  komercijalno dostupna od strane proizvođača Sigma Aldrich (G4416) i R&D (PPS027), respektivno.

Svi ispitivani PAM-ovi i druge testirane supstance pripremljeni su kao osnovni rastvori u koncentraciji  $10^{-1}$  M (izuzetak je XLi-093, čiji je osnovni rastvor u koncentraciji  $10^{-3}$  M). Sve ispitivane supstance rastvorene su u 100% alkoholu, sa izuzetkom za FE, acetilholin i GABA-u, odnosno za XLi-093, bikukulin, PK11195 i prazosin, čiji su osnovni rastvori pripremljeni u destilovanoj vodi, odnosno u DMSO-u. Sva naredna razblaženja vršena su u mješavini odgovarajućeg rastvarača i destilovane vode, tako da konačna koncentracija rastvarača (etanola ili DMSO-a) nikada nije prelazila 0,33% u kupatilu za rad sa izolovanim organima.

Tabela 4. Prikaz korišćenih PAM-ova u istraživanju

Supstanca	Hemijski naziv i <i>in vitro</i> profil	Referenca
<b>Diazepam</b>	7-hloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H1,4-benzodiazepin-2-on ( <b>standardan neselektivan BZD</b> )	Savić i sar., 2010
<b>Zolpidem</b>	(2R,3R)-2,3-dihidroksibutandioinska kiselina;N,N-dimetil-2-[6-metil-2-(4-metilfenil)imidazo[1,2-a]piridin-3-il]acetamid ( <b>PAM visokog afiniteta za <math>\alpha 1</math>GABA<sub>A</sub>R</b> )	Savić i sar., 2010
<b>Flumazenil</b>	Etil-8-fluoro-5,6-dihidro-5-metil-6-okso4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboksilat ( <b>SAM</b> )	Siebert i sar., 2018
<b>Midazolam</b>	8-hloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin ( <b>neselektivan BZD</b> )	Savić i sar., 2010

<b>SH-I-048A</b>	(S)-7-bromo-5-(2-fluorofenil)-3-metil-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-on ( <b>neselektivan PAM visokog afiniteta i efikasnosti</b> )	Obradović i sar., 2014
<b>MP-III-022</b>	(R)-8-etinil-6-(2-fluorofenil)-N,4-dimetil-4H-benzo[f]imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-karboksamid ( <b>PAM visokog afiniteta za <math>\alpha 5GABA_A R</math></b> )	Stamenić i sar., 2016
<b>MP-III-058</b>	Metil (R)-8-bromo-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-benzo[f]imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-karboksilat ( <b>PAM visokog afiniteta za <math>\alpha 5GABA_A R</math></b> )	Gajić Bojić i sar., 2023
<b>GL-II-73</b>	(R)-8-Etinil-6-(2-fluorofenil)-N,N,4-trimetil-4H-benzo[f]imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-karboksamid ( <b>PAM visokog afiniteta za <math>\alpha 5GABA_A R</math></b> )	Prevot i sar., 2019
<b>GL-II-74</b>	(R)-N-Etil-8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-benzo[f]imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-karboksamid ( <b>PAM visokog afiniteta za <math>\alpha 5GABA_A R</math></b> )	Prevot i sar., 2019
<b>XHe-III-074</b>	(S)-terc-Butil-7-metoksi-9-okso-11,12,13,13a-tetrahidro-9H-benzo[e]imidazo[5,1-c]pirolo[1,2-a][1,4]diazepin-1-karboksilat ( <b>PAM visokog afiniteta za <math>\alpha 4GABA_A R</math></b> )	Yocum i sar., 2016.
<b>DK-I-87-1</b>	8-hloro-2-(2-(metoksi-d3)fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on (SAM za $\alpha 6GABA_A R$ )	Vasović i sar., 2019
<b>DK-I-56-1</b>	7-metoksi-5-(4-metoksi-d3)fenil)-2,5-dihidro-3H-pirazolo[4,3-c]hinolin-3-on ( <b>PAM visokog afiniteta za <math>\alpha 6GABA_A R</math></b> )	Vasović i sar., 2019
<b>XLi-093</b>	8-etinil-1-[3-(8-etinil-5-metil-6-okso-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karbonil)oksipropil]-5-metil-6-okso-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboksilna kiselina ( <b>SAM za <math>\alpha 5-GABA_A R</math></b> )	Clayton i sar., 2015

*In vitro* karakterizacija ispitivanih PAM-ova (određivanje afiniteta i efikasnosti na različitim  $\alpha_x GABA_A R$ ) urađena je u okviru programa skrininga psihoaktivnih supstanci (PDSP) Nacionalnog Instituta za mentalno zdravlje (SAD), kao i u saradničkoj laboratoriji dr Margot Ernst (*Center for Brain Research, Medical University*) Beč, Austrija.

## 1.11 Životinje

Odrasli, zdravi pacovi (oba pola) Wistar soja (težine 250-300 g), odgajani u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, korišćeni su u ovoj studiji u svrhu izolovanja torakalne aorte. Sve primjenjene procedure bile su u skladu sa Direktivom Evropske unije broj: 2010/63 i odobrene su od strane Uprave za veterinu, Odjeljenje za zaštitu ogleđnih životinja, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije. Ženke i mužjaci držani su u odvojenim sobama, u standardnim plastičnim kavezima (najviše po pet životinja u jednom

kavezu), sa slobodnim pristupom hrani i vodi, pri sobnoj temperaturi, relativnoj vlažnosti 40-70%, osvjetljenju 120 lx, dok je ciklus svjetlo/mrak podešen na 12/12h (svjetla se pale u 6 h ujutru). Najveći broj životinja iskorišćen je za *in vitro* ispitivanje vaskularne aktivnosti PAM-ova GABA<sub>A</sub>R, na izolovanim prstenovima pacovske aorte (po svakom protokolu 5-10 životinja), dok je značajno manji broj životinja iskorišćen za identifikaciju  $\alpha$  i  $\gamma 2$  podjedinica GABA<sub>A</sub>R u torakalnoj aorti pacova. U studiji je korišćeno ukupno oko 250 pacova.

## 1.12 Priprema tkiva

U svrhu izolovanja torakalne aorte, za eksperimente izvedene na kupatilu za rad sa izolovanim prstenovima aorte, pacovi su anestetizirani intraperitonealnom (i.p.) primjenom kombinacije anestetika: ketamin hidrohlorida u dozi od 90 mg/kg i ksilazin hidrohlorida u dozi od 10 mg/kg. Za potrebe izvođenja RT-PCR i imunohistohemijske analize, pacovi su eutanazirani primjenom ugljen dioksida.

Postupak izolovanja torakalne aorte sproveden je brzo i spretno, kako bi se izbjeglo njeno istezanje ili oštećenje. Neposredno nakon izolovanja aorta je prenijeta u Petrijevu šoljicu napunjenu hladnim (4°C) Krebs-bikarbonatnim rastvorom sljedećeg sastava: 118,3 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 11 mM glukoze (Rizvić i sar., 2017). Nakon toga izvršeno je njeno pažljivo čišćenje od okolnog masnog i vezivnog tkiva, a potom segmentisanje na prstenove (približno 3 mm dužine) koji su korišćeni za dalja farmakološka ispitivanja.

Segmenti izolovane torakalne aorte predviđeni za molekularna ispitivanja sakupljeni su, te brzo zamrznuti u tečnom azotu, a potom čuvani na -80°C do izolacije RNK. Segmenti aorte predviđeni za imunohistohemijska ispitivanja fiksirani su u neutralnom formalinu tokom 48h do dalje histološke obrade.

## 1.13 Kvalitativna RT-PCR metoda za identifikaciju $\alpha$ podjedinica GABA<sub>A</sub>R u aorti pacova

Izolacija ukupne RNK izvršena je u homogenatu pacovske aorte primjenom rastvora TRI Reagent Solution (Ambion, Foster City, Kalifornija), prema uputstvu proizvođača. Kvantifikacija RNK vršena je na NanoDrop™ 1000 spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, SAD). Zbog niske koncentracije RNK objedinjeni su RNK ekstrakti aorti iz ukupno 5 životinja. Nakon tretmana DNazom (Thermo Scientific, Vilnius, Litvanija), 1  $\mu$ g ukupne RNK reverzno je prepisan na cDNK, primjenom kompleta za reverznu transkripciju cDNK visokog kapaciteta (Applied Biosystems, Vilnius, Litvanija), prema preporukama proizvođača. Dobijeni produkti cDNK čuvani su na -20°C do analize ekspresije gena. Za analizu ekspresije gena za  $\alpha$  podjedinice (1-6) GABA<sub>A</sub>R korišćena je metoda lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu (*real time PCR*). PCR reakcije izvedene su korišćenjem 7500 Real Time PCR sistema (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija) u 10  $\mu$ L reakcione zapremine. Sastav reakcione zapremine bio je sljedeći: 5  $\mu$ L specifičnog reagensa Power SIBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies, Warrington, Ujedinjeno Kraljevstvo), 300 nM svakog prajmera i količina cDNK ekvivalentna 100 ng ukupne RNK. Uslovi PCR reakcije bili su sljedeći: 10 min na 95°C, 40 ciklusa od po 15 s na 95°C i 60 s na 60°C. Sekvence prajmera za amplifikaciju cDNK ciljnih gena prethodno su okarakterisane, za *gabru* 1–6 (Mendu i sar., 2012) i za *actb* ( $\beta$ -aktin) (Faseleh i sar., 2017) i prikazane u Tabeli 5.

Specifičnost prajmera potvrđena je generisanjem krive topljenja (eng. *melting curve*) nakon PCR amplifikacije za svaki produkt PCR reakcije.

Tabela 5. Pregled prajmera korišćenih za RT-PCR

Prajmeri	"forward" prajmer (5'-3')	"reverse" prajmer (5'- 3')
<b>gabra1</b>	CTCCTACAGCAACCAGCTATACCC	GCGGTTTTGTCTCAGGCTTGAC
<b>gabra2</b>	AAGAGAAAGGCTCCGTCATG	GCTTCTTGTGGTTCTGGAGTAG
<b>gabra3</b>	CAAGCACCACTTCAACATAG	AGGTCTTGGTCTCAGCAGGA
<b>gabra4</b>	GATGTCAACAGCAGAACTGAGGTG	TTGTGCCAGATCCAGAAGGTGGTG
<b>gabra5</b>	GCCTTGGAAGCAGCTAAAATC	GAAGTCTTCTCCTCAGATGCTCT
<b>gabra6</b>	CACTCTGACTCCAAGTACCATCTG	GTACACAAGGTTGAATCCTG
<b>Actb</b>	ACCCACACTGTGCCCATCTA	CGGAACCGCTCATTGCC

U svakom uzorku istovremeno je amplifikovan i produkt referentnog, stabilno eksprimiranog gena, beta aktina (*Actb*). Predviđene veličine svih amplikona (baznih parova) u homogenatu aorte bile su sljedeće: 113 bp za  $\alpha_1$ , 134 bp za  $\alpha_2$ , 174 bp za  $\alpha_3$ , 135 bp za  $\alpha_4$ , 178 bp za  $\alpha_5$ , 221 bp za  $\alpha_6$  i 290 bp za  $\beta$ -aktin. Za kontrolno tkivo uzet je homogenat mozga pacova. Deset  $\mu$ L PCR proizvoda analizirano je elektroforezom u 1,8% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom i vizuelizovano na UV transluminatoru.

## 1.14 Imunohistohemijska metoda za identifikaciju $\alpha_1$ -6 i $\gamma_2$ podjedinice u aorti pacova

### 3.5.1 Histološka analiza

Izolovana i očišćena pacovska aorta fiksirana je u neutralnom (10%), puferovanom (pH 7,2) formalinu na sobnoj temperaturi, tokom 48 h. Nakon dehidracije u etil alkoholu (70%, 96%, 100%) i bistrenja u ksilolu, koji su obavljeni u tkivnom procesoru Leica TP1020, Leica Biosystems, SAD, tkivo aorte ukalupljeno je u dva parafinska bloka. Parafinski tkivni blokovi su potom sječeni rotacionim mikrotomom Rotary 3003, PFM, Njemačka, na presjeke debljine 5-6  $\mu$ m. Dobijeni presjeci postavljeni su na odgovarajuća predmetna stakalca i sušeni na 60°C.

U prvom koraku histološke procedure presjeci tkiva su deparafinirani u ksilolu (dvije izmjene po 5 minuta), a zatim rehidrirani u opadajućim koncentracijama etil alkohola (100%, 96% i 70%, po 5 minuta za svaku izmjenu) i isprani u destilovanoj vodi. Nakon toga presjeci su obojeni rutinskom metodom hematoksilin-eozin (HE). Cjelokupan postupak obavljen je automatski po standardnom protokolu za aparat Myr Myreva, SS-30 slide Stainer, Španija. Gotovi preparati analizirani su svjetlosnim mikroskopom Leica DM6000B.

### 3.5.2 Imunohistohemijska analiza

Za imunohistohemijsku analizu, isti parafinski blokovi dodatno su sječeni na presjeke debljine 4-5  $\mu$ m. Presjeci su postavljeni na pozitivno naelektrisana Super Frost predmetna stakalca (Menzel-glaser). Nakon deparafinizacije i rehidracije imunohistohemijsko bojenje nastavljeno je blokiranjem aktivnosti endogene peroksidaze. Ova aktivnost blokirana je inkubacijom tkiva u 3%



vodenom rastvoru vodonik peroksida, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon kratkotrajnog ispiranja vodonik peroksida obavljen je toplotni oporavak antigena, zagrijavanjem tkiva 20 minuta u citratnom puferu (pH 6,0) pri temperaturi od 96°C.

U cilju sprječavanja nespecifičnog bojenja pozadine i/ili smanjenja nespecifičnog vezivanja endogenih IgG, presjeci tkiva su kratko (5-10 minuta) prije aplikacije primarnog antitijela inkubirani u komercijalno pripremljenom proteinskom bloku (Ultra V Block, Thermo Fisher Scientific, SAD).

Za identifikaciju traženih antigena korišćena su sljedeća razblaženja primarnih poliklonalnih antitijela: odnos 1:100 za  $\alpha 2$  i  $\alpha 4$ ; odnos 1:150 za  $\alpha 3$ ; odnos 1:300 za  $\alpha 6$ ; odnos 1:500 za  $\alpha 1$  i  $\gamma 2$ ; odnos 1:600 za  $\alpha 5$  (Pirker i sar., 2000; Sperk i sar., 2020). Optimalna vrijednost titra, aplicirana je na tkivo aorte i ostavljena da stoji preko noći na 4°C, u vlažnoj komori. Po isteku inkubacije, višak antitijela ispran je TBS puferom (eng. *Tris buffered saline*; pH 7,4). Za verifikaciju imunološke reakcije korišćen je kolorimetrijski, visoko osjetljiv, detekcioni sistem, oslobođen biotina i sačinjen od polimera označenih peroksidazom hrena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) i konjugovanih sa sekundarnim antitijelom (UltraVision Detection sistem HRP polimer & DAB Plus Chromogen). U prvom koraku detekcije primjenjen je pojačivač (eng. *enhancer*) primarnog antitijela (10 minuta), a zatim HRP polimer (15 minuta), oba na sobnoj temperaturi. Poslije svake izmjene (primarno antitijelo, pojačivač i polimer) tkiva su kratko ispirana TBS puferom (pH 7,4). Specifičnost imunohistohemijske reakcije postala je vidljiva nakon kratkotrajne inkubacije sa 3,3'-diaminobenzidin tetrahlorid (DAB) hromogenom. Svi primjenjeni reagensi komercijalno su dostupni od proizvođača Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, Fermont, SAD). Nizom sprovedenih inkubacija (primarno antitijelo, HRP polimer i DAB hromogen) nastali kompleks razvija smeđu boju u cilju detekcije pozitivne imunološke reakcije.

Nakon ispiranja hromogena presjeci tkiva su kontrastirani Majer-ovim hematokilinom (tokom 30 sekundi), a zatim isprani tekućom vodom, dehidrirani u rastućoj koncentraciji etil alkohola (70%, 90% i 100%), deparafinisani u ksilolu i trajno uklopljeni u *kanada* balzam. Nakon montiranja presjeci su analizirani na svjetlosnom mikroskopu (Leica DM6000B), a potom fotografisani.

Za kontrolisano praćenje imunohistohemijske reakcije na tkivu (pozitivna i negativna kontrola) poštovane su preporuke proizvođača. Za pozitivnu kontrolu korišćeno je tkivo mozga pacova, i to za svaku podjedinicu uzeti su specifični dijelovi mozga: cerebralni korteks za  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  i  $\gamma 2$  podjedinice; hipokampus za  $\alpha 2$  i  $\alpha 5$  podjedinice i cerebelum za  $\alpha 6$  podjedinicu (Pirker i sar., 2000; Sieghart i Sperk, 2002). Za negativnu kontrolu apliciran je TBS pufer, umjesto primarnog antitijela, zbog čega se u tim presjecima nije mogla očekivati nikakva imunološka aktivnost.

## 1.15 Mjerenje izometrijske kontrakcije prstenova pacovske aorte u prisustvu različitih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R

Kontraktilnost glatkih mišića pacovske aorte mjerena je izometrijski i snimljena digitalno pomoću MLT0201 pretvarača sile-pomjeranja (Panlab, Španija), sistema za prikupljanje podataka PoverLab/4SP (AD Instruments, Castle Hill, Australija) i softvera LabChart 7 Pro (AD Instruments). Aortni prstenovi (približno 3 mm dužine) montirani i pričvršćeni su između dva trougla od nerđajućeg čelika, a zatim su suspendovani u kupatilo (četvorokomorno kupatilo za organe, *Panlab system*, Španija) sa hranljivim rastvorom (Krebs-bikarbonatni rastvor) zapremine 15 mL, pri konstantnoj temperaturi (37°C) i uz kontinuiranu aerizaciju sa smješom 5% CO<sub>2</sub> i 95% O<sub>2</sub>. Jedan kraj aortnog prstena povezan je sa izometrijskim pretvaračem sile (transdjuserom; eng.

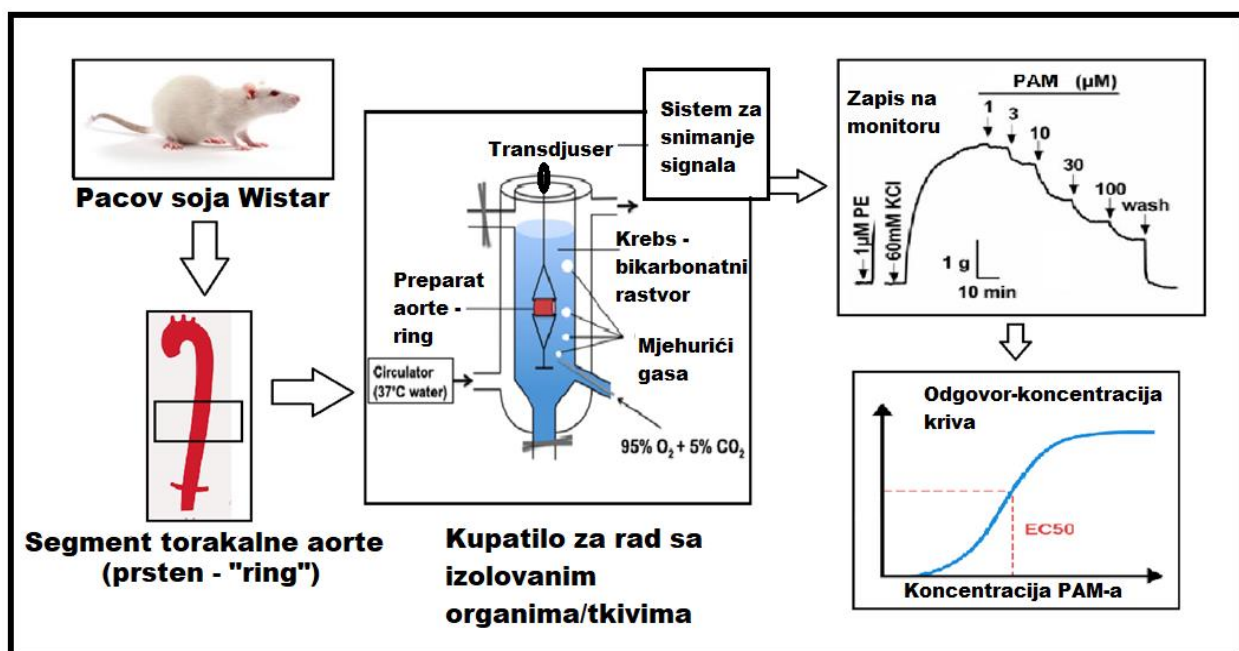
*transducer*), dok je drugi kraj fiksiran za zid kupatila. Prstenovi su postavljeni pod optimalnu pasivnu tenziju istezanja od 2,0 g, nakon čega je tkivu ostavljeno neko vrijeme (oko 10-tak minuta) da se prilagodi i spontano smanji postavljenu tenziju, te uspostavi miran plato. Zatim je zategnutost povećana za još 2,0 g u odnosu na postignutu vrednost platoa, pri čemu su preparati prstenova aorte ispirani hranljivim rastvorom u kupatilu svakih 15-tak minuta (Jespersen i sar., 2015).

Nakon perioda inkubacije i adaptacije preparata ("*equilibration period*") u trajanju od 1 h, tokom kojeg je vršeno redovno ispiranje preparata (svakih 15-tak minuta), preparati su izloženi početnom kontrahovanju ("*challenge*" kontrakcije) sa kalijum hloridom (KCl) u koncentraciji  $6 \times 10^{-2}$  M. Nakon prve "*challenge*" kontrakcije preparati su ispirani hranljivim rastvorom, a zatim ponovo izloženi KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M). U pravilu, svaki naredni "*challenging*" pokazivao je veće kontrakcije, te je u svrhu boljeg fiziološkog odgovora preparata vršeno uglavnom 2-3 puta "*challenge*" kontrahovanje sa KCl.

Preparati su zatim ostavljeni da se ponovo uravnoteže 30-tak minuta, sa periodima ispiranja svakih 15-tak minuta, a kada je postignut stabilan nivo tenzije, pristupilo se odgovarajućem eksperimentalnom protokolu (Slika 17).

Preparati bez endotela pripremljeni su trljanjem (grebanjem) površine intime aortnog prstena nerđajućom žicom (trouglićem za kupatilo). Uspješno uklanjanje endotela potvrđeno je izostankom relaksacije u prisustvu acetilholina ( $10^{-5}$  M). Aortni prstenovi, submaksimalno prekontrahovani sa FE ( $3 \times 10^{-7}$  M), kod kojih je relaksacija u prisustvu acetilholina bila manja od 30% smatrali su se bez endotela ("*endotel-ogoljeni*" preparati).

Za svaki eksperimentalni protokol korišćen je samo jedan prsten od iste životinje, a od jedne pacovske aorte najčešće je dobijeno 4-6 prstenova. Aortni prstenovi čuvani u hladnom Krebs-bikarbonatnom rastvoru ( $4^{\circ}\text{C}$ ) u frižideru sačuvali su svoju vijabilnost tokom 48 h od uzorkovanja i mogli su se koristiti za izometrijsko mjerenje nakon gore opisane adaptacije u kupatilu.



Slika 17. Shematska ilustracija sistema za mjerenje izometrijske kontrakcije preparata pacovske aorte u kupatilu za rad sa izolovanim organima/tkivima.

## **1.16 Eksperimentalni protokoli za utvrđivanje vaskularne aktivnosti različitih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R**

### **3.7.1 Prvi protokol - mjerenje relaksacije prekontrahovanih preparata u prisustvu različitih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R**

Prva serija eksperimenata imala je za cilj da procjeni koncentracijsko-zavisne vaskularne efekte GABA-e i različitih PAM-ova (diazepam, midazolam, zolpidem, SH-I-048A, XHe-III-074, MP-III-022, MP-III-058, XLi-093 i DK-I-56-1) na preparatima aorte koji su submaksimalno prekontrahovani (približno 60-70% od maksimalne kontrakcije). Poređene su krive odnosa koncentracija i odgovor za ispitivane supstance kod preparata sa intaktnim endotelom, i to za dvije vrste prekontrakcija: FE prekontrakcija (FE,  $3 \times 10^{-7}$  M) i kalijumska prekontrakcija (KCl,  $6 \times 10^{-2}$  M).

Rastuće koncentracije svake od ispitivanih supstanci (u rasponu od  $10^{-8}$  M do  $10^{-5}$  M) dodate su nakon što je postignut stabilan plato prekontrakcije. Koncentracije su dodavane u kupatilo kumulativno, u koracima od pola logaritma, tako što je svaka nova koncentracija supstance dodata nakon postizanja stabilnog stanja tenzije preparata ("*steady state*") od prethodne koncentracije (trajanje obično 15-tak minuta ili duže). S obzirom da su prethodno izvedeni kontrolni eksperimenti, za praćenje uticaja vremena na vijabilnost preparata, pokazali da se za obe vrste prekontrakcija (FE- i KCl-) održava zadovoljavajući nivo postignute prekontrakcije u periodu od 5-6 h trajanja eksperimenta, zaključeno je da postoje adekvatni uslovi za mjerenje "sporije" vazoaktivnosti ispitivanih supstanci. Osim toga, kontrolna koncentracija-odgovor kriva, dobijena od preparata koji su tretirani samo dodavanjem rastućih zapremina rastvarača (koje odgovaraju rastućim koncentracijama ispitivanih PAM-ova) ukazala je na smanjenje tenzije preparata od ukupno 15–20% na kraju eksperimenata. Vaskularni odgovor ispitivanih PAM-ova i GABA-e izražen je procentom smanjenja prekontrakcijske tenzije preparata (za obe vrste prekontrakcije).

### **3.7.2 Drugi protokol - uloga endotela u diazepam-indukovanoj relaksaciji FE-prekontrahovanih preparata**

Drugom serijom eksperimenata ispitivana je uloga endotela u ispoljavanju efekta diazepamom izazvane relaksacije FE-prekontrahovanih preparata ( $3 \times 10^{-7}$  M).

Nove krive odnosa koncentracija i relaksacija za diazepam (u rasponu od  $10^{-8}$  M do  $10^{-5}$  M) dobijene su od preparata kojima je uklonjen endotel, te su poređene sa krivama diazepamom kod preparata sa očuvanim endotelom (dobijene u prvom eksperimentalnom protokolu).

### **3.7.3 Treći protokol - ispitivanje efekata različitih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R na FE-indukovanu kontrakciju preparata**

U trećoj seriji eksperimenata ispitivani su vaskularni efekti različitih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R (diazepam, zolpidem, midazolam, SH-I-048A, XHe-III-074, MP-III-022, MP-III-058, GL-II-73, GL-II-74 i DK-I-56-1, XLi-093, DK-I-87-1) na kontraktilni odgovor preparata sa očuvanim endotelom, indukovano rastućim koncentracijama FE. Osim toga, ispitivani su efekti GABA-e

(ortosterni agonist GABA<sub>A</sub>R), flumazenila (NAM BZD-skog veznog mjesta na GABA<sub>A</sub>R) i cinka (ZnCl<sub>2</sub>, negativni modulator GABA<sub>A</sub>R).

Na početku protokola utvrđena je referentna kontrakcija svakog preparata, i to dodatkom hipertoničnog rastvora KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M). Nakon što su preparati dovoljno isprani i stabilizovani (postignut stabilan nivo bazalne tenzije), pristupilo se dodavanju rastućih koncentracija FE (u rasponu od  $10^{-9}$  M do  $10^{-4}$  M), te je tako dobijena kontrolna kriva odnosa koncentracija-odgovor za FE. Zatim su preparati ponovo isprani i kada je postignut stabilan nivo tenzije dodat je ispitivan PAM (odnosno testirani modulator), direktno u kupatilo i to 60 minuta prije nego što je dobijena druga FE-indukovana kontrakcija. Efekti testiranog jedinjenja na FE-izazvanu kontrakciju procenjeni su poređenjem kontraktinog odgovora preparata u prisustvu i odsustvu jedinjenja. Na ovaj način ispitana je vaskularna aktivnost testiranih modulatora za tri različite koncentracije ( $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M i  $10^{-5}$  M). Rezultati su izraženi u odnosu na referentnu kontrakciju koju je postigao isti preparat kontrahovan sa KCl na početku protokola.

## **1.17 Eksperimentalni protokoli za utvrđivanje vaskularne aktivnosti različitih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R u prisustvu specifičnih antagonista**

### **3.8.1 Prvi protokol - ispitivanje vaskularnih efekata prazosina, bikukulina, flumazenila, PK11195 i XLi-093 na FE- prekontrahovanim preparatima**

Prva serija eksperimenata imala je za cilj da procjeni vaskularnu aktivnost samih antagonista. Nakon što je postignut *steady state* prekontrahovanih preparata (FE,  $3 \times 10^{-7}$  M), pristupilo se dodavanju rastućih koncentracija ispitivanih antagonista. Poređene su krive odnosa koncentracija-odgovor za:

- prazosin – selektivni antagonist  $\alpha 1$  adrenergičkih receptora;
- bikukulin – kompetitivni ortostatski antagonist GABA<sub>A</sub>R;
- flumazenil – kompetitivni antagonist BZD-skog veznog mjesta na GABA<sub>A</sub>R,
- PK11195 – specifični antagonist za TSPO;
- XLi-093 – selektivni antagonist za GABA<sub>A</sub>R koji sadrže  $\alpha 5$  podjedinicu ( $\alpha 5$ GABA<sub>A</sub>R).

Koncentracije su dodavane u kupatilo kumulativno, u koracima od pola logaritma, tako što je svaka nova koncentracija dodata nakon postizanja *steady state* od prethodne koncentracije. Za procjenu vaskularne aktivnosti dobijene su i kontrolne krive rastvarača (kumulativnim dodavanjem smješe destilovane vode i DMSO-a, u zapreminama koje odgovaraju rasponu koncentracija od  $10^{-7}$  do  $3 \times 10^{-5}$  M).

Vaskularni odgovori ispitivanih antagonista izraženi su procentom smanjenja FE-prekontraksije preparata i upoređeni su sa vaskularnim odgovorom diazepamama, odnosno MP-III-058 (za flumazenil i XLi-093), dobijenim pod istim uslovima u kupatilu.

### **3.8.2 Drugi protokol - ispitivanje antagonističkog uticaja bikukulina i PK11195 na vaskularne efekte diazepamama kod FE- prekontrahovanih preparata**

Nakon procjene vaskularnih efekata samih antagonista (bikukulin i PK11195), u drugoj seriji eksperimenata ispitivani su njihovi antagonistički efekti na vaskularne efekte diazepamama.

Na početku protokola izvršena je FE- prekontraksija preparata sa očuvanim endotelom (FE,  $3 \times 10^{-7}$  M). Kada je postignut *steady state* preparata, dodat je ispitivani antagonist, bikukulin ( $10^{-5}$  M) ili PK11195 ( $10^{-5}$  M). Nakon 30 minuta od momenta dodavanja antagoniste u kupatilo (period

inkubacije preparata antagonistom) izvršeno je dodavanje rastućih koncentracija diazepama (u rasponu od  $10^{-7}$  do  $3 \times 10^{-5}$  M), i to u koracima od pola logaritma, tako što je svaka nova koncentracija diazepama dodata nakon postizanja stabilnog stanja tenzije preparata od prethodne koncentracije. Vaskularna aktivnost diazepama procijenjena je poređenjem njegovih krivih odnosa koncentracija-odgovor u prisustvu i odsustvu antagoniste (bikukulin, odnosno PK11195), a izražena je procentom smanjenja FE- prekontrakcije preparata.

### **3.8.3 Treći protokol - ispitivanje antagonističkog uticaja XLi-093 na vaskularne efekte MP-III-058 kod FE- prekontraovanih preparata**

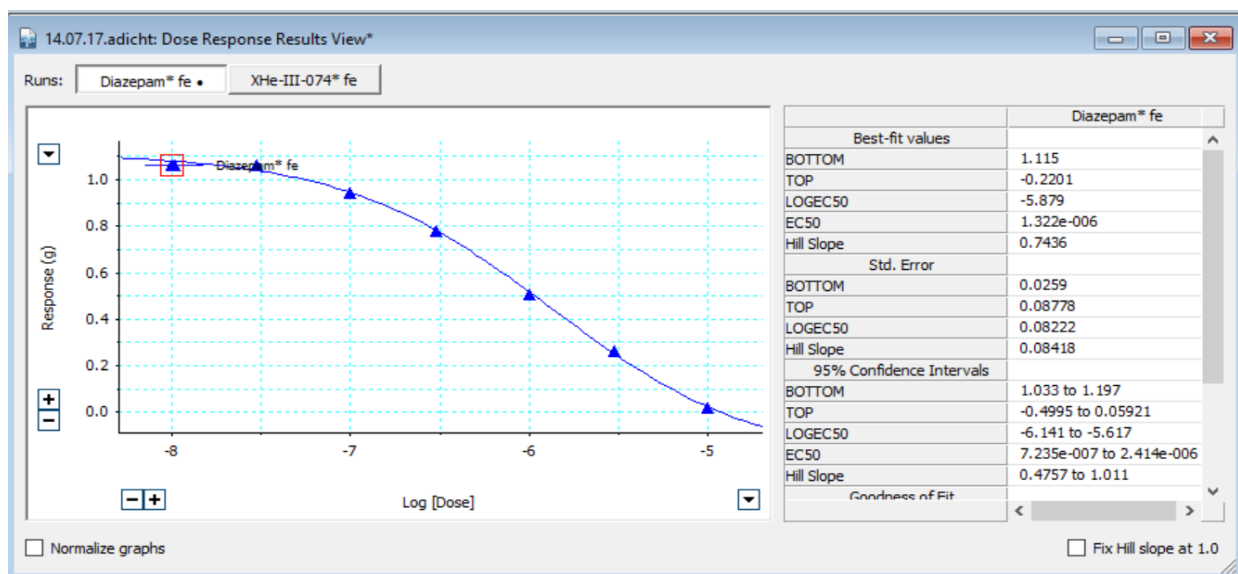
Treća serija eksperimenata imala je za cilj da ispita antagonistički efekat supstance XLi-093, selektivnog antagoniste  $\alpha 5$ GABA<sub>A</sub>R, na vaskularnu aktivnost MP-III-058,  $\alpha 5$  selektivnog PAM-a. Nakon postizanja *steady state* prekontraovanih preparata sa očuvanim endotelom (FE,  $3 \times 10^{-7}$  M), dodat je ispitivani antagonista, XLi-093 ( $10^{-7}$  M), i to 30 minuta (period inkubacije) prije dodavanja rastućih koncentracija supstance MP-III-058 ( $10^{-8}$  M –  $10^{-4}$  M). Antagonistički uticaj XLi-093 procijenjen je poređenjem krivih odnosa koncentracija-odgovor za MP-III-058 u prisustvu i odsustvu XLi-093.

### **3.8.4 Četvrti protokol - ispitivanje antagonističkog uticaja flumazenila na vaskularne efekte midazolama i MP-III-058 kod FE- prekontraovanih preparata**

Na početku četvrtog protokola utvrđena je referentna KCl- indukovana kontrakcija preparata (KCl,  $6 \times 10^{-2}$  M). Nakon višestrukog ispiranja i stabilizacije preparata pristupilo se dodavanju submaksimalne koncentracije FE ( $3 \times 10^{-7}$  M) za postizanje optimalne prekontrakcije preparata. Zatim je u sistem dodat antagonista flumazenil ( $10^{-4}$  M), a 30 minuta kasnije dodate su rastuće koncentracije midazolama, odnosno supstance MP-III-058 ( $10^{-8}$  M –  $10^{-4}$  M). Antagonistički uticaj flumazenila procijenjen je poređenjem krivih odnosa koncentracija-odgovor za midazolam, odnosno MP-III-058 u njegovom prisustvu i odsustvu. Rezultati su izraženi u odnosu na referentnu kontrakciju koju je postigao isti preparat kontraovan sa KCl na početku protokola.

## 1.18 Statistička analiza

Za rezultate mjerenja izometrijske kontrakcije preparata pacovske aorte izvršena je statistička analiza primjenom softvera LabChart 7 Pro (AD Instruments) i SigmaPlot 11 (Sistat Software Inc.) Softverskom obradom podataka (Slika 18) iz odgovarajućih koncentracija-odgovor krivih (registrovanih kao grafički zapis na monitoru) izračunati su farmakološki parametri:  $EC_{50}$  (koncentracija ispitivane supstance koja uzrokuje 50% maksimalnog odgovora) i  $E_{max}$  (maksimalna efikasnost ispitivane supstance).



Slika 18. Prikaz pojedinačnog rezultata za efekte diazepama na FE-prekontrahovanom preparatu (dana 14.07.2017.), snimljenog softverom LabChart 7 Pro. Na lijevoj strani slike predstavljena je kriva odnosa koncentracija-odgovor za diazepam, dobijena na osnovu vrijednosti registrovanih tenzija preparata i zabilježenih dodavanja supstance u određenim koncentracijama. Na desnoj strani slike predstavljene su parametri "fitovane" sigmoidalne krive, dobijene primjenom nelinearne regresione analize.

Za obradu podataka iz registrovanih sigmoidalnih krivih softverski je primjenjena nelinearna regresiona analiza, i to četvoroparametarski matematički model, sa jednačinom predstavljenoj na Slici 19.

Vrijednosti pomenutih parametara ( $pEC_{50}$  i  $E_{max}$ ) izražene su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška za "n" broj ponavljanja. Vrijednost broja "n" odnosi se na broj aortnih prstenova testiranih u jednom protokolu, pri čemu je svaki prsten dobijen od posebne životinje.

Statistička poređenja izvršena su korišćenjem Studentovog t-testa, odnosno dvofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa ponovljenim mjerenjem. Statistička značajnost prikazana je na grafikonima kao \* za  $P < 0,05$ , \*\* za  $P < 0,01$ , \*\*\* za  $P < 0,001$  (pored oznaka zvjezdice \*, u grafikonima sa više različitih značajnosti korišćene su i druge oznake, poput # i  $S$ ).

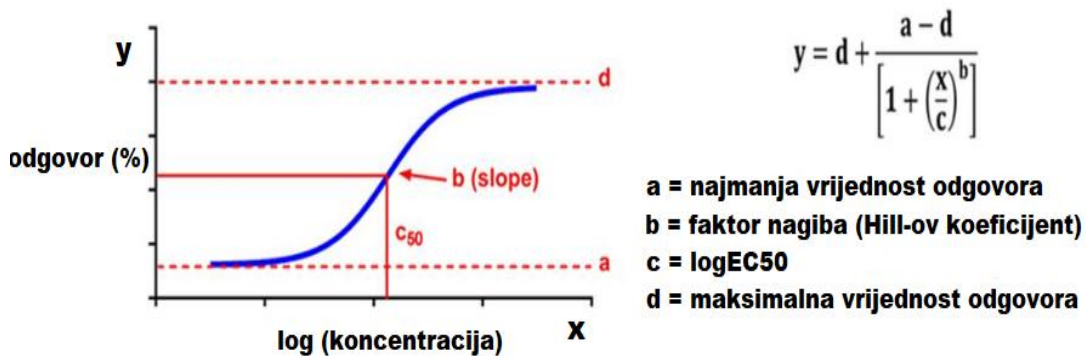
Razlike između grupa testirane su Bonferroni post-hoc testom.

Za obradu rezultata RT-PCR analize primjenjen je GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software).

Rezultati imunohistohemijske analize bili su deskriptivni i nisu zahtjevali statističku analizu, a semi-kvantitativna vizuelna procjena imunoreaktivnosti podjedinica  $GABA_{AR}$  izvršena je pod

svjetlosnim mikroskopom, na osnovu intenziteta signala i broja obojenih ćelija, uz orijentaciju prema kontrolnim presjecima.

#### 4 - parametarski sigmoidni model



Slika 19. Četvoro-parametarski sigmoidni model za izračunavanje vrijednosti EC<sub>50</sub>.

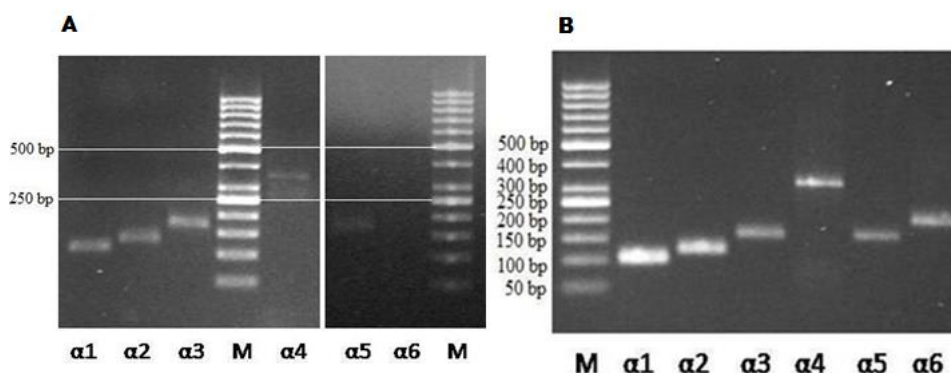
Slika je prilagođena i preuzeta iz izvora Kellie Johnson, 2022. Curve Fitting for Immunoassays: ELISA and Multiplex Bead Based Assays (LEGENDplex™. BioLegend [online]. Dostupno na <https://www.biolegend.com/en-us/blog/curve-fitting-for-immunoassays-legendplex> [pristupljeno 18. jula 2022].

## 2. Rezultati

### 4.1 Kvalitativna RT-PCR analiza za identifikaciju $\alpha$ podjedinica GABA<sub>A</sub>R u aorti pacova

Rezultati RT-PCR analize za ekspresiju iRNK *gabral*, *gabrab*, *gabrac*, *gabrad*, *gabra5* i *gabrab* u homogenatu torakalne aorte pacova ilustrovani su na Slici 20.

Prikazani su gelovi (1,8% agarozni gelovi oboljeni etidijum bromidom) koji sadrže cDNK amplifikovane primjenom prajmera za svih šest  $\alpha$  podjedinica GABA<sub>A</sub>R. Kao što je vidljivo na Slici 20A. detektovane su podjedinice:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  i  $\alpha 5$ . Međutim,  $\alpha 6$  podjedinica nije detektovana pod primjenjenim uslovima u testiranim uzorcima aorte. Svi PCR proizvodi (cDNK trake za detektovane  $\alpha$  podjedinice) pokazali su očekivanu veličinu. Podjedinice  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$  davale su jasnu, jednostruku traku, dok su podjedinice  $\alpha 4$  i  $\alpha 5$  davale jednu, ali manje vidljivu traku, što ukazuje na značajno niži nivo ekspresije u poređenju sa  $\alpha 1$ -3.

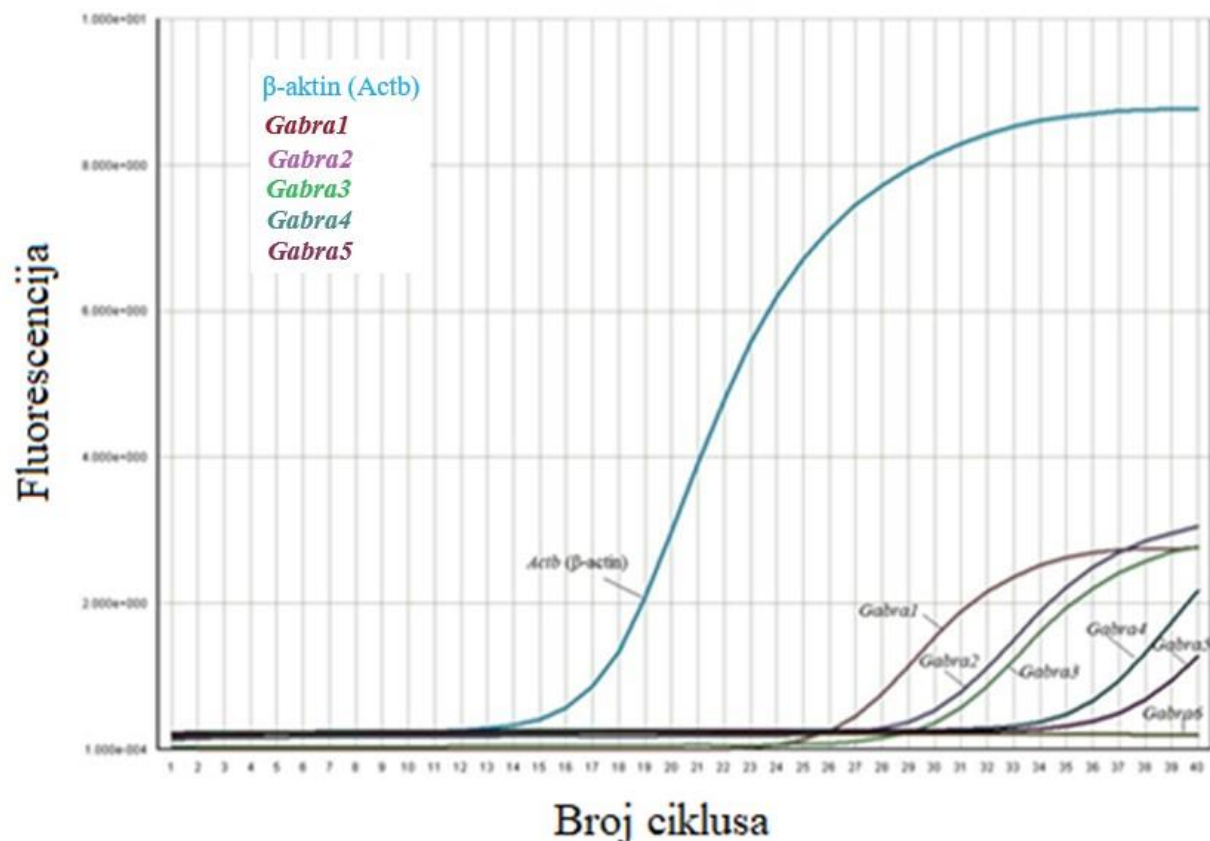


Slika 20. Reprezentativni RT-PCR gelovi iRNK  $\alpha$  podjedinica GABA<sub>A</sub>R ekspimiranih u: A) homogenatu torakalne aorte pacova; B) homogenatu mozga pacova. Primjenjen je DNK molekularni marker (ladder) od 50 bp (M)

Kao pozitivna kontrola za ekspresiju  $\alpha$  podjedinica GABA<sub>A</sub>R uzeta je RNK iz homogenata mozga pacova (Slika 20B). Za razliku od drugih tkiva na periferiji, mozak zasigurno posjeduje sve ispitivane  $\alpha$  podjedinice. Predviđene veličine (izražene u baznim parovima) svih amplifikovanih proizvoda bile su sljedeće:  $\alpha 1$  – 113 bp;  $\alpha 2$  – 134 bp;  $\alpha 3$  – 174 bp;  $\alpha 4$  – 345 bp;  $\alpha 5$  – 178 bp i  $\alpha 6$  – 221 bp.

Na Slici 21 predstavljeni su nivoi iRNK za  $\alpha$  podjedinice GABA<sub>A</sub>R i  $\beta$ -aktin (Actb) mjereni u realnom vremenu (*real-time* PCR mjerenje stepena fluorescencije u odgovarajućem broju ciklusa reakcije) u homogenatu pacovske aorte. U poređenju sa genom domaćinom (Actb), nivoi ekspresije za ispitivane *gabral*-6 značajno su slabiji (potreban je veći broj ciklusa za njihovu identifikaciju).



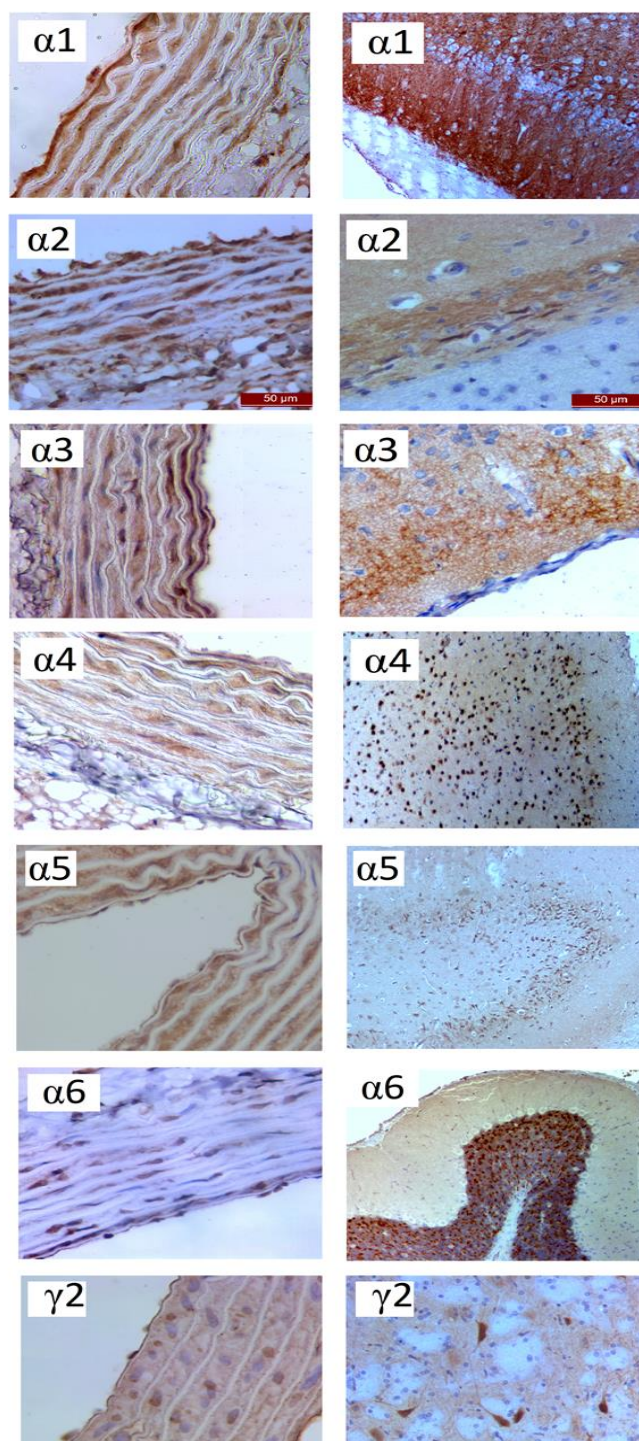


Slika 21. Reprezentativni prikaz RT-PCR mjerenja nivoa ekspresije iRNK u homogenatu torakalne aorte pacova za gen domaćin (*Actb*) i *gabra*1-6.

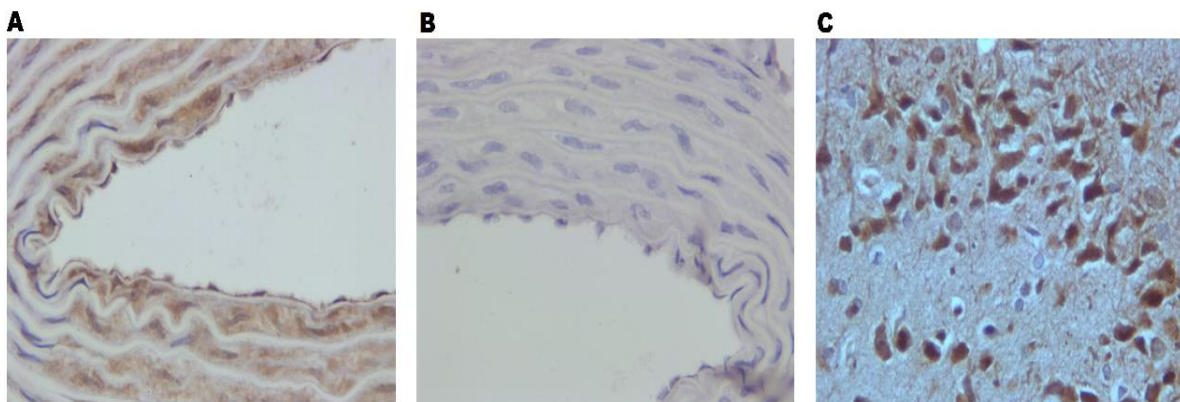
## 4.2 Imunohistohemijska analiza za identifikaciju $\alpha$ 1-6 i $\gamma$ 2 podjedinice u aorti pacova

Rezultati imunohistohemijske analize za identifikaciju proteina  $\alpha$ 1-6 i  $\gamma$ 2 podjedinice GABA<sub>A</sub>R analizirani su svjetlosnim mikroskopom, a dobijene slike presjeka tkiva predstavljene su zbirno na Slici 22. Poprečni presjeci pacovske aorte sa smeđim bojenjem ukazuju na ekspresiju  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5 i  $\gamma$ 2 podjedinice, za razliku od presjeka koji su tretirani sa primarnim antitijelom za  $\alpha$ 6 GABA<sub>A</sub>R podjedinicu. Vidljivo je da su elastična vlakna, položena između glatko-mišićnih ćelija, jasno neobojena, te da je pozitivan signal evidentan u glatko-mišićnom sloju. Za svaku od testiranih podjedinica utvrđena je imunoreaktivnost u specifičnoj regiji mozga, što je interpretirano kao pozitivna kontrola (Pirker i sar., 2000, Sieghart i Sperk, 2002).

Na slici 23 izdvojeni su presjeci aorte koji su bili tretirani primarnim antitijelom za  $\alpha$ 5 podjedinicu. Tamno smeđe obojeni dijelovi aorte ukazuju na ekspresiju  $\alpha$ 5 podjedinice (Slika 23A), za razliku od presjeka aorte koji nisu bili tretirani primarnim antitijelom i kod kojih je izostala smeđa obojenost (Slika 23B). Najintenzivnija imunoreaktivnost primjećena je u CA1 piramidalnim neuronima hipokampusa, kao što je i očekivano za  $\alpha$ 5 podjedinicu, te je stoga nalaz iz moždanog tkiva pacova predstavljen kao pozitivna kontrola (Slika 23C).



Slika 22. Reprezentativne mikroskopske slike imunohistohemijske analize, koje ukazuju na ekspresiju i lokalizaciju podjedinica GABA<sub>A</sub>R u histološkim presjecima: pacovske aorte (lijeva kolona) i specifičnih regija pacovskog mozga (desna kolona), obilježenim primarnim antitijelima za  $\alpha$ 1-6 i  $\gamma$ 2 podjedinice. Pozitivan imuni odgovor označen je smeđim bojenjem presjeka. Mikroskopsko uvećanje 400x (osim sekcija mozga za:  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 i  $\gamma$ 2 - mikroskopsko uvećanje 100x).



Slika 23. Reprezentativne slike, dobijene svjetlosnim mikroskopom, ukazuju na ekspresiju i lokalizaciju  $\alpha 5$  podjedinice  $GABA_A R$ : A) presjek pacovske aorte u kome je registrovan pozitivan imuni odgovor u glatko-mišićnom sloju (smeđa obojenost); B) presjek pacovske aorte u kome je izostavljeno primarno antitijelo, a umjesto njega je primjenjen TBS pufer (negativna kontrola); C) presjek hipokampusa (pozitivna kontrola). Mikroskopsko uvećanje 40x.

Semi-kvantitativnom procjenom imunohistohemijske analize za testirane podjedinice  $GABA_A R$  utvrđeno je da torakalna aorta pacova ima visoku vrijednost imunoreaktivnosti za podjedinice  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$ , srednju vrijednost imunoreaktivnosti za podjedinice  $\alpha 5$  i  $\gamma 2$  i nisku vrijednost imunoreaktivnosti za  $\alpha 4$  podjedinicu  $GABA_A R$ . Imunoreaktivnost za  $\alpha 6$  podjedinicu nije primjećena (Tabela 6).

Tabela 6. Semi-kvanitivna procjena imunoreaktivnosti podjedinica  $GABA_A R$  u torakalnoj aorti pacova soja Wistar.

Podjedinice	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\gamma 2$
Ocjene	+++	+++	+++	+	++	-	++
imunoreaktivnosti	visoka	visoka	visoka	niska	srednja	negativno	srednja

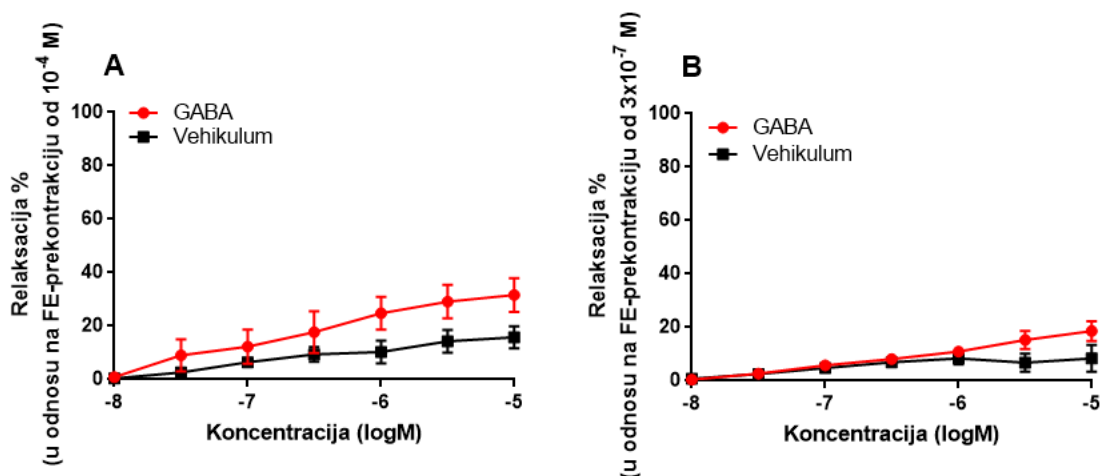
### 4.3 Rezultati mjerenja izometrijske kontrakcije prstenova pacovske aorte u prisustvu različitih PAM-ova $GABA_A R$

#### 4.3.1 Vazodilatacijski efekti različitih PAM-ova $GABA_A R$

##### 4.3.1.1 Vazodilatacijski efekti GABA-e

Na Slici 24 predstavljeni su vaskularni efekti GABA-e za dvije različite koncentracije FE- prekontrakcije preparata pacovske aorte ( $10^{-4}$  M i  $3 \times 10^{-7}$  M). Kod obe jačine FE- prekontrakcije

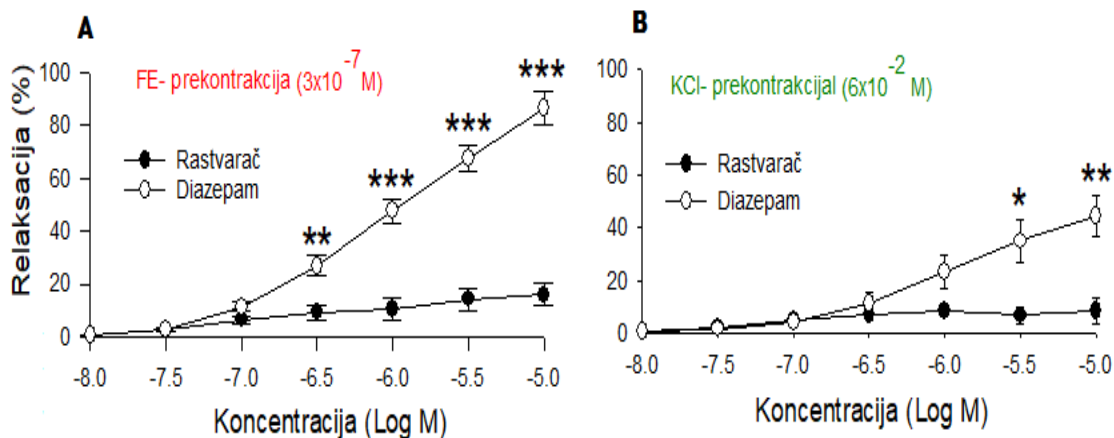
nisu utvrđeni značajni vazodilatacijski efekti GABA-e, u poređenju sa efektima vehikuluma (destilovana voda).



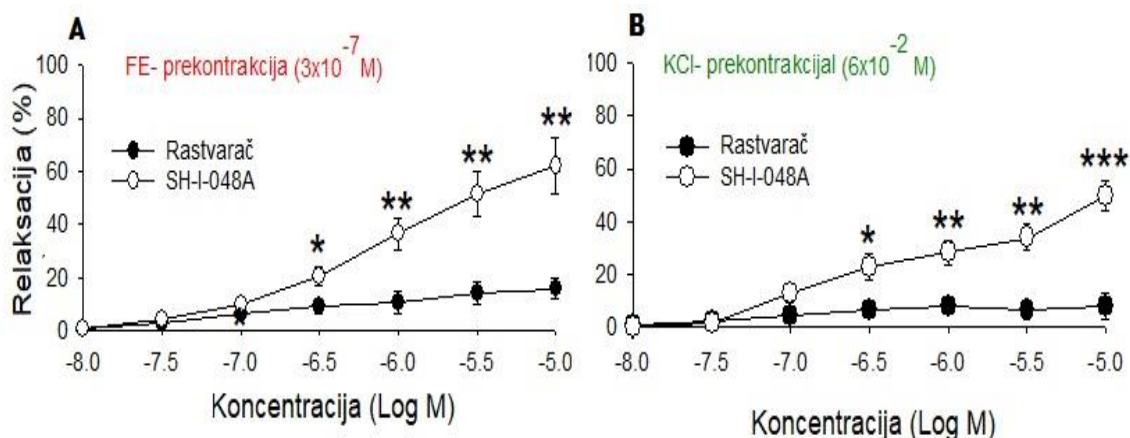
Slika 24. Krive odnosa koncentracija-odgovor za GABA-u na FE- prekontrahovanim preparatima: (A) pri FE koncentraciji  $10^{-4}$  M: GABA (n = 7) i rastvarač (n = 6) i B) pri FE koncentraciji  $3 \times 10^{-7}$  M: GABA (n = 9) i rastvarač (n = 5). Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontrakcije.

#### 4.3.1.2 Vazodilatacijski efekti neselektivnih PAM-ova (diazepam i SH-i-048A)

Na Slikama 25 i 26 predstavljeni su vazodilatacijski efekti diazepama i SH-I-048 na preparatima prekontrahovanim sa FE, odnosno KCl. Za razliku od GABA-e, ispoljena je značajna vaskularna aktivnost, a procenti relaksacije kretali su se u opsegu od 60-90% za FE-prekontrakciju, odnosno u opsegu od 40-60% za KCl- prekontrakciju.



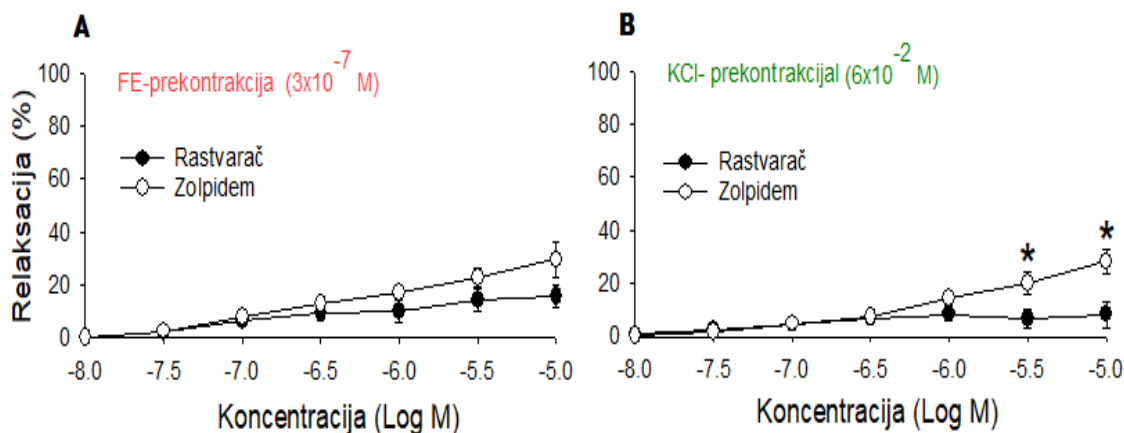
Slika 25. Krive odnosa koncentracija-relaksacija dobijene kumulativnim dodavanjem diazepama: A) na FE-prekontrahovanim preparatima: diazepam (n = 8) i rastvarač (n = 6) i B) na KCl- prekontrahovanim preparatima: diazepam (n = 8) i rastvarač (n = 5). Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE-prekontrakcije (A), odnosno KCl-prekontrakcije (B). \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; značajno različite  $E_{max}$  vrijednosti.



Slika 26. Krive odnosa koncentracija-relaksacija, dobijene kumulativnim dodavanjem SH-I-048A: A) na FE-prekontrahovanim preparatima: SH-I-048A (n = 6) i rastvarač (n = 6) i B) na KCl- prekontrahovanim preparatima: SH-I-048A (n = 8) i rastvarač (n = 5). Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontraksije (A), odnosno KCl-prekontraksije (B). \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; značajno različite Emax vrijednosti.

#### 4.3.1.3 Vazodilatacijski efekti zolpidema ( $\alpha$ 1-selektivni PAM)

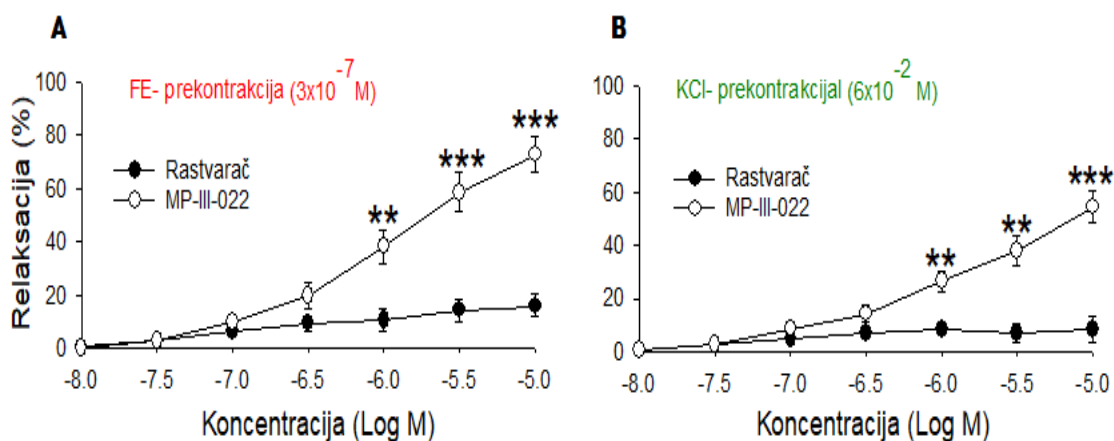
Na Slici 27. prikazane su krive odnosa koncentracija-odgovor za zolpidem. Utvrđena je skromnija vaskularna aktivnost zolpidema, u poređenju sa drugim ispitivanim PAM-ovima (ostvarena je relaksacija od oko 30%), te nije bilo statistički značajne razlike u relaksaciji izazvanoj na FE-prekontrahovanim preparatima, u poređenju sa odgovarajućom kontrolom (rastvarač).



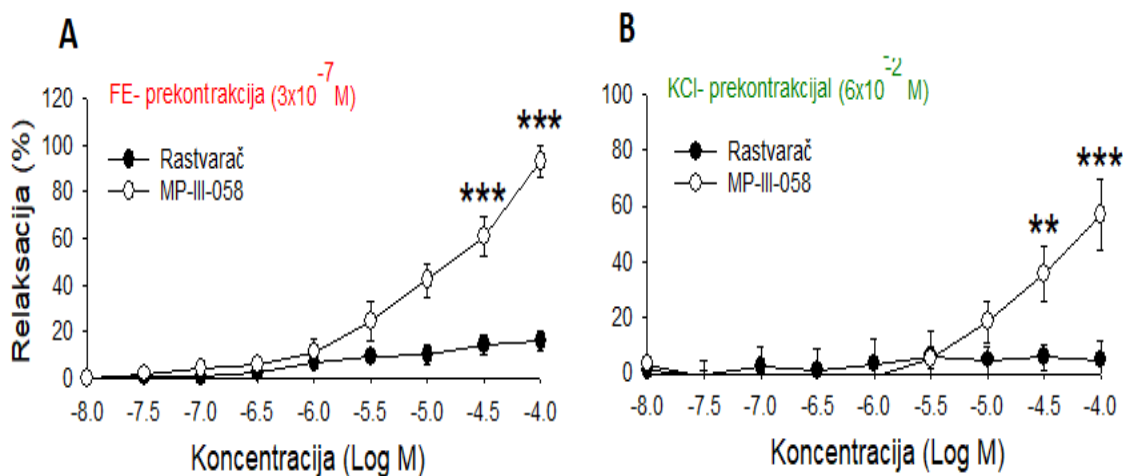
Slika 27. Krive odnosa koncentracija-relaksacija dobijene kumulativnim dodavanjem zolpidema: A) na FE-prekontrahovanim preparatima: zolpidem (n = 6) i rastvarač (n = 6) i B) na KCl- prekontrahovanim preparatima: zolpidem (n = 8) i rastvarač (n = 5). Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontraksije (A), odnosno KCl-prekontraksije (B). \*P < 0,05 značajno različite Emax vrijednosti.

### 4.3.1.3 Vazodilatacijski efekti $\alpha 5$ - selektivnih PAM-ova (MP-III-022 i MP-III-058)

Na slikama 28 i 29 predstavljeni su vazodilatacijski efekti MP-III-022 i MP-III-058, respektivno.

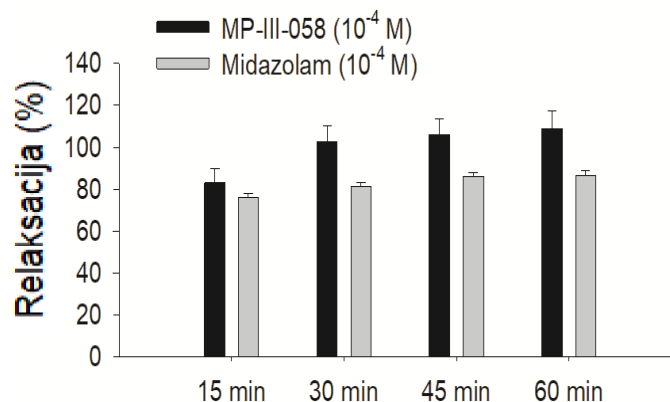


Slika 28. Krive odnosa koncentracija-relaksacija dobijene kumulativnim dodavanjem MP-III-022: A) na FE-prekontrahovanim preparatima: MP-III-022 (n = 6) i rastvarač (n = 6) i B) na KCl- prekontrahovanim preparatima: MP-III-022 (n = 7) i rastvarač (n = 5). Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontraksije (A), odnosno KCl-prekontraksije (B). \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; značajno različite Emax vrijednosti.



Slika 29. Krive odnosa koncentracija-relaksacija dobijene kumulativnim dodavanjem MP-III-058: A) na FE-prekontrahovanim preparatima: MP-III-058 (n = 7) i rastvarač (n = 6) i B) na KCl- prekontrahovanim preparatima: MP-III-058 (n = 9) i rastvarač (n = 5). Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) je izražena u procentima smanjenja FE- prekontraksije (A), odnosno KCl-prekontraksije (B). \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; značajno različite Emax vrijednosti.

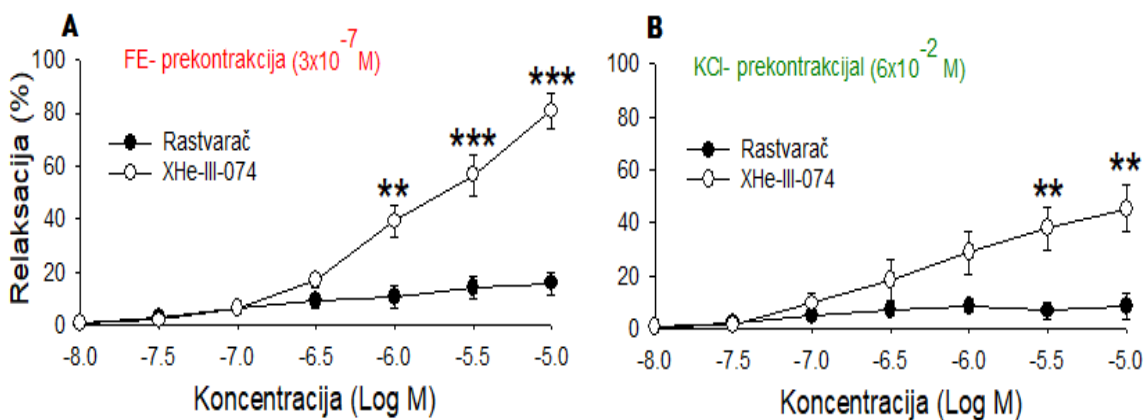
Dodatno, na Slici 30 predstavljeni su vaskularni efekti za MP-III-058 mjereni u nekoliko vremenskih tačaka nakon dodavanja najveće koncentracije ( $10^{-4}$  M) i upoređeni sa vaskularnim efektima midazolama, dobijenim pod istim eksperimentalnim uslovima.



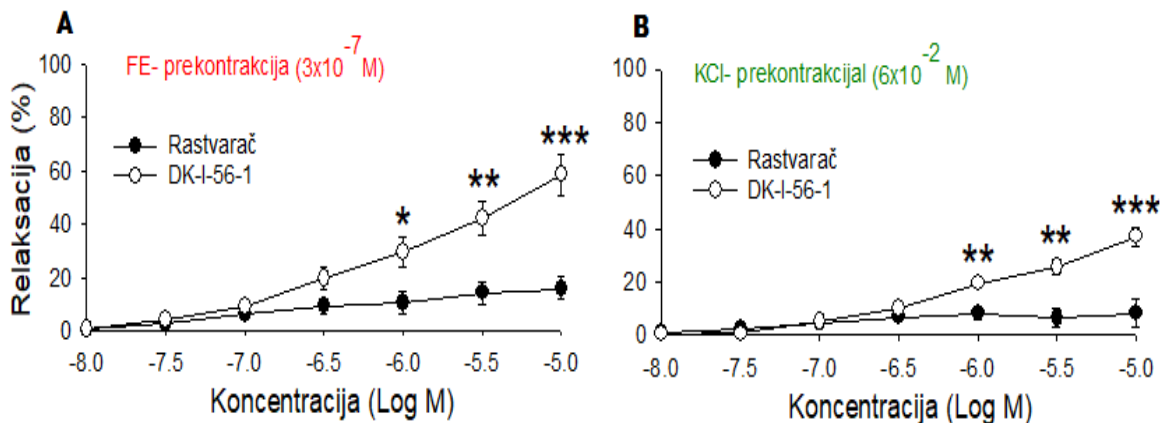
Slika 30. Vazodilatacijski efekti MP-III-058 (n = 3) i midazolama (n = 3) u koncentraciji 10<sup>-4</sup> M mjereni su 15, 30, 45 i 60 minuta nakon njihovog dodavanja u kupatilo. Rezultati (srednja vrijednost ± S.E.M.) izraženi su kao procenat smanjenja FE prekontraksije.

#### 4.3.1.4 Vazodilatacijski efekti XHe-III-074 (α4-selektivni PAM) i DK-I-56-1 (α6-selektivni PAM)

Relaksacijski efekti α4- i α6- selektivnih PAM-ova prikazani su na Slikama 31 i 32, respektivno. Oba testirana liganda pokazala su značajnu relaksaciju, pri čemu su efekti bili izraženiji na FE-prekontrahovanim preparatima.

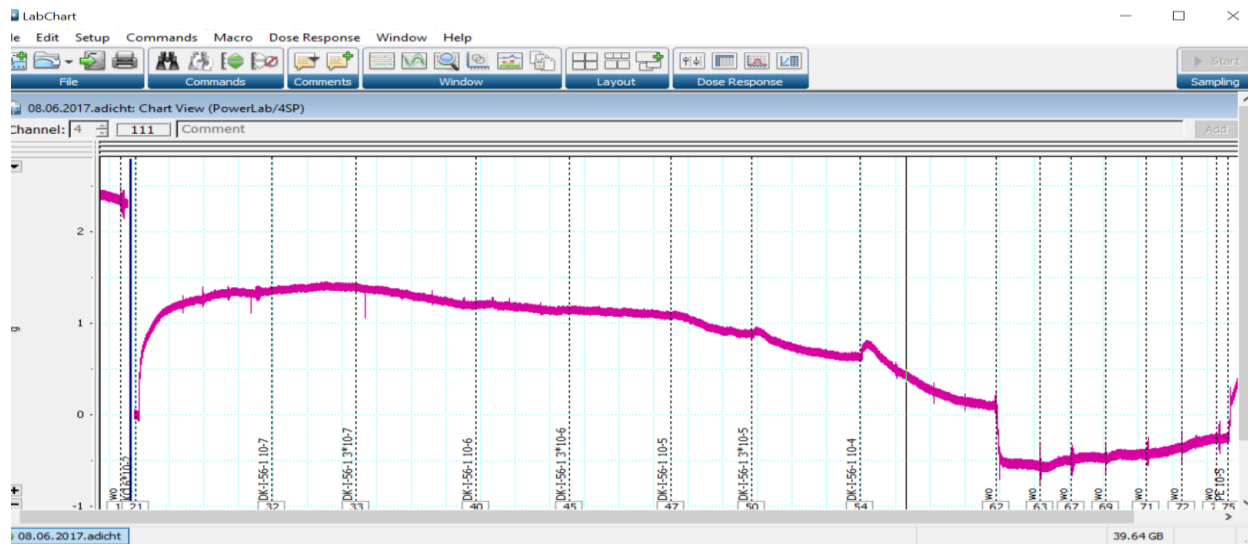


Slika 31. Krive odnosa koncentracija-relaksacija dobijene kumulativnim dodavanjem XHe-III-074: A) na FE-prekontrahovanim preparatima: XHe-III-074 (n = 7) i rastvarač (n = 6) i B) na KCl-prekontrahovanim preparatima: XHe-III-074 (n = 6) i rastvarač (n = 5). Relaksacija (srednja vrijednost ± S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontraksije (A), odnosno KCl-prekontraksije (B). \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; značajno različite E<sub>max</sub> vrijednosti.



Slika 32. Krive odnosa koncentracija-relaksacija dobijene kumulativnim dodavanjem DK-I-56-1: A) na FE-prekontrahovanim preparatima: DK-I-56-1 (n = 8) i rastvarač (n = 6) i B) na KCl- prekontrahovanim preparatima: DK-I-56-1 (n = 7) i rastvarač (n = 5). Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontraktacije (A), odnosno KCl-prekontraktacije (B). \*P < 0,05. \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; značajno različite Emax vrijednosti.

Vazodilatacijski efekti ispitivanih PAM-ova, osim što su koncentracijski- zavisni i različiti za različite vrste prekontraktacije, takođe su i reverzibilni. Reverzibilna priroda ovih efekata utvrđena je višestrukim ispiranjem preparata na kraju protokola, kada je registrovano značajno povećanje tenzije (Slika 33).



Slika 33. Prikaz pojedinačnog rezultata za efekte DK-I-56-1 na KCl-prekontrahovanom preparatu (dana 08.06.2017.), snimljenog softverom LabChart 7 Pro. Na snimku se vidi spontan porast tenzije preparata, nakon višestrukog ispiranja i uklanjanja liganda DK-I-56-1 iz sistema (zadnji dio traseje).



#### 4.3.1.5 Farmakološki parametri (pEC<sub>50</sub> i E<sub>max</sub>) za ispitivane PAM-ove

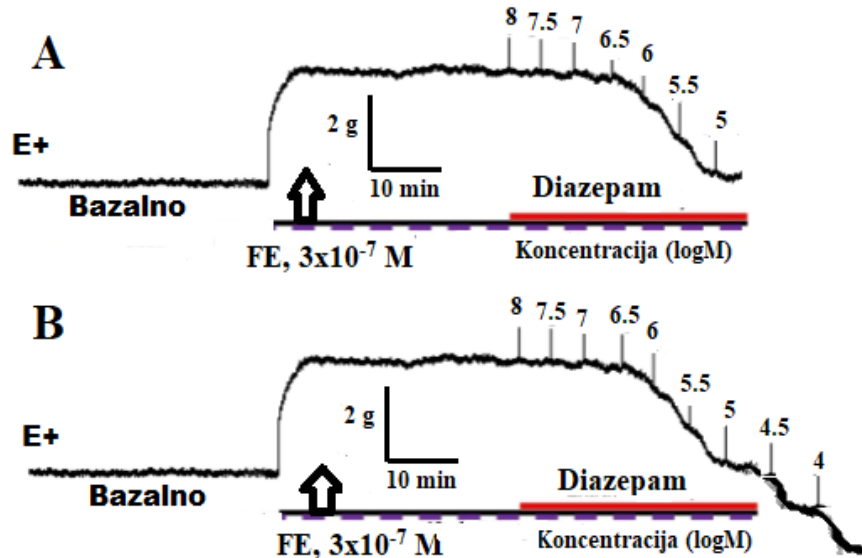
U Tabeli 7 predstavljene su EC<sub>50</sub> vrijednosti za ispitivane PAM-ove i GABA-u, te njihove E<sub>max</sub> vrijednosti dobijene pri koncentraciji 10<sup>-5</sup> M. Zavisno od vrste prekontrakcije (FE- ili KCl-) ispoljeni su različiti nivoi relaksacije, pri čemu su kod svih PAM-ova (osim za XHe-III-074) utvrđeni veći vazodilatacijski odgovori (veće pEC<sub>50</sub> i E<sub>max</sub> vrijednosti) na FE- prekontrahevanim preparatima.

Tabela 7. Farmakološki parametri (pEC<sub>50</sub> i E<sub>max</sub>) za različite ligande (10<sup>-5</sup> M) ispitivane na prekontrahevanim preparatima torakalne aorte pacova sa očuvanim endotelom.

Ligand	pEC <sub>50</sub>			E <sub>max</sub> (%)		
	FE- prekontrakcija			KCl- prekontrakcija		
	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n
<b>Diazepam</b>	5.57 ± 0.12	86.59 ± 6.13*	8	5.36 ± 0.27	44.45 ± 8.06*	8
<b>GABA</b>	5.76 ± 0.36	22.87 ± 3.79	9			
<b>SH-I-048A</b>	6.02 ± 0.22	62.14 ± 10.87*	6	5.94 ± 0.81	49.92 ± 5.83*	8
<b>Zolpidem</b>	6.35 ± 0.54	29.65 ± 6.42	6	4.72 ± 0.24	28.28 ± 4.39*	8
<b>XHe-III-074</b>	5.55 ± 0.20	80.87 ± 6.69*	7	5.96 ± 0.29	45.30 ± 8.80*	6
<b>MP-III-022</b>	5.51 ± 0.35	72.83 ± 6.78*	6	5.38 ± 0.22	54.55 ± 6.13*	7
<b>DK-I-56-1</b>	5.25 ± 0.49	58.79 ± 7.84*	8	5.22 ± 0.52	37.12 ± 3.53*	7
<b>Rastvarač</b>	6.77 ± 0.15	15.83 ± 4.23	6	6,25 ± 0.35	8.36 ± 5.04	5

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± S.E.M. za "n" broj ispitivanih preparata. Efikasnost (E<sub>max</sub>) izražena je kao procenat smanjenja referentne FE- ili KCl- prekontrakcije, a statistička značajnost u odnosu na efekte kontrole (rastvarača) obilježena je zvjezdicom u Tabeli 7.

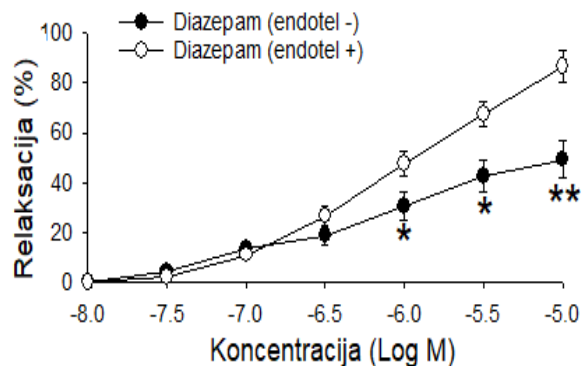
Maksimalni relaksacijski odgovor ostvaren je pri koncentraciji liganada od 10<sup>-5</sup> M. Međutim, na određenom broju eksperimenata, gdje su primjenjene veće koncentracije ispitivanih liganada (3x10<sup>-5</sup> M i 10<sup>-4</sup> M), utvrđen je odgovor daleko iznad 100% relaksacije. To ukazuje da receptorski mehanizmi nisu potpuno zasićeni pri koncentraciji 10<sup>-5</sup> M, ali isto tako upućuje i na mogućnost neselektivnog dejstva pri pomenutoj koncentraciji (Slika 34).



Slika 34. Shematska ilustracija softverskih snimaka koji prikazuju relaksaciju izazvanu diazepamom kod FE-prekontrahovanih preparata sa očuvanim endotelom: (A) pri koncentraciji  $10^{-5}$  M ostvareno oko 100 % relaksacije; (B) pri koncentraciji  $10^{-4}$  M ostvareno preko 200 % relaksacije.

#### 4.3.2 Endotel-zavisna relaksacija FE-prekontrahovanih preparata izazvana diazepamom

Kod preparata pacovske aorte sa očuvanim endotelom, diazepam je izazvao relaksaciju od oko 87% ( $n = 8$ ), dok je kod preparata sa oštećenim (ogoljenim) endotelom vrijednost  $E_{max}$  za diazepam iznosila oko 49% ( $n = 12$ ) (Slika 35).



Slika 35. Poređenje krivih odnosa koncentracija-relaksacija dobijenih kumulativnim dodavanjem diazepamima na FE-prekontrahovanim preparatima pacovske aorte sa očuvanim endotelom ( $n = 8$ ) i ogoljenim endotelom ( $n = 12$ ). Statističke značajnosti obilježene su zvjezdicama (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ), a relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontraksije.

Međutim, iako je efikasnost diazepamima bila značajno veća u prisustvu endotela, vrijednosti  $pEC_{50}$  za obe grupe preparata nisu se značajno razlikovale (Tabela 8). Dakle, utvrđeno je da je diazepam-izazvana relaksacija FE-prekontrahovanih preparata pacovske aorte djelimično endotel-zavisna.

Tabela 8. Farmakološki parametri (pEC<sub>50</sub> i Emax) za diazepam ispitivani na FE- prekontrahevanim preparatima pacovske aorte za očuvanim i ogoljenim endotelom

FE (3x10 <sup>-7</sup> M) prekontraktacija	Preparati sa očuvanim endotelom			Preparati sa ogoljenim (uklonjenim) endotelom		
	pEC <sub>50</sub>	Emax (%)	n	pEC <sub>50</sub>	Emax (%)	n
<b>Diazepam</b>	5.57 ± 0.12	86.59 ± 6,13	8	6.05 ± 0.20	49.48 ± 7.42	12

#### 4.3.3 Supresivni efekti različitih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R na FE-indukovanu kontrakciju preparata

##### 4.3.3.1 Farmakološki parametri (pEC<sub>50</sub> i Emax) za ispitivane PAM-ove

Supresivni efekti ispitivanih PAM-ova na FE kontrakciju bili su koncentracijski-zavisni. Generalno, statistički značajni supresivni efekti na FE krivu odnosa koncentracija-kontrakcija ispoljeni su pri visokoj koncentraciji PAM (10<sup>-5</sup> M), dok je pri nižim koncentracijama (10<sup>-7</sup> M i 10<sup>-6</sup> M) izostao značajan efekat na FE krivu. U tabelama 9 i 10 predstavljeni su farmakološki parametri koji opisuju potentnost (pEC<sub>50</sub>) i efikasnost (Emax) FE u odsustvu ili prisustvu različitih PAM-a GABA<sub>A</sub>R (pri koncentracijama: 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M i 10<sup>-5</sup> M) dobijeni na preparatima pacovske aorte.

Tabela 9. Vrijednosti pEC<sub>50</sub> za FE u odsustvu i prisustvu različitih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R (u koncentracijama: 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M i 10<sup>-5</sup> M), dobijene na preparatima pacovske aorte

Ligandi (inkubacija 60 min)	Potentnost (pEC <sub>50</sub> )								
	inkubacija sa 10 <sup>-7</sup> M	bez liganda	n	inkubacija sa 10 <sup>-6</sup> M	bez liganda	n	inkubacija sa 10 <sup>-5</sup> M	bez liganda	n
<b>Diazepam</b>	6.86 ± 0.16	7.90 ± 0.25	5	7.07 ± 0.24	7.93 ± 0.26	9	9.44 ± 0.48	8.02 ± 0.60	6
<b>SH-I-048A</b>	6.88 ± 0.19	8.47 ± 0.85	5	7.12 ± 0.32	8.40 ± 0.88	5	5.96 ± 0.32 #	8.00 ± 0.64	7
<b>Zolpidem</b>	6.85 ± 0.17	7.47 ± 0.45	6	6.98 ± 0.22	8.66 ± 1.16	5	7.50 ± 0.53	7.56 ± 0.25	5
<b>XHe-III-074</b>	7.03 ± 0.27	6.29 ± 0.51	5	6.51 ± 0.21	6.89 ± 0.44	6	8.21 ± 0.36	7.92 ± 0.64	11
<b>MP-III-022</b>	9.10 ± 0.48	8.04 ± 0.66	8	7.44 ± 0.46	7.94 ± 0.68	7	8.29 ± 0.46	8.16 ± 0.43	7
<b>MP-III-058</b>	6.37 ± 0.23	7.24 ± 0.06	4	7.42 ± 0.28	7.24 ± 0.06	<sup>11</sup>	5.79 ± 0.43	8.16 ± 0.43	4
<b>XLi-093</b>	6.39 ± 0.21	7.24 ± 0.06	7	6.87 ± 0.28	7.24 ± 0.06	7			
<b>DK-I-56-1</b>	8.14 ± 0.78	7.68 ± 0.68	7	6.11 ± 0.33	7.25 ± 0.26	5	7.66 ± 0.50	7.91 ± 0.35	7
<b>Vehikulum</b>							8.04 ± 0.66	7.24 ± 0.06	7

Tabela 10. Vrijednosti  $E_{max}$  za FE u odsustvu i prisustvu različitih PAM-a GABA<sub>A</sub>R (u koncentracijama:  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M i  $10^{-5}$  M), dobijene na preparatima pacovske aorte

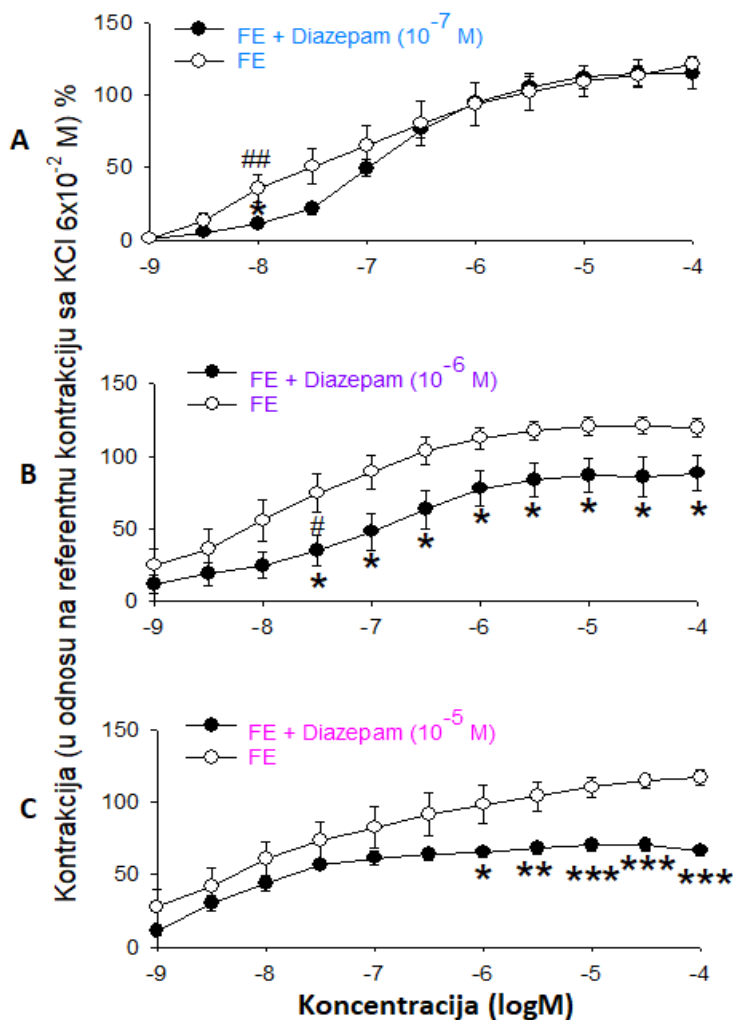
Ligandi	Efikasnost ( $E_{max}$ )								
	inkubacija sa $10^{-7}$ M	bez liganda	n	inkubacija sa $10^{-6}$ M	bez liganda	n	inkubacija sa $10^{-5}$ M	bez liganda	n
<b>Diazepam</b>	115.19 ± 10.6	121.19 ± 5.40	5	88.28 ± 11.93*	119.82 ± 6.56	9	66.62 ± 3.7***	117.24 ± 5.3	6
<b>SH-I-048A</b>	125.21 ± 9.9	128.91 ± 2.68	5	120.41 ± 16.01	126.36 ± 3.46	5	101.09 ± 11.9	128.80 ± 4.5	7
<b>Zolpidem</b>	124.73 ± 11.9	119.74 ± 5.90	6	123.12 ± 10.77	128.92 ± 9.04	5	109.42 ± 16.4	127.92 ± 8.1	5
<b>XHe-III-074</b>	123.34 ± 4.6	127.26 ± 7.54	5	122.85 ± 5.74	129.07 ± 5.48	6	96.33 ± 6.7***	133.59 ± 5.7	11
<b>MP-III-022</b>	129.03 ± 10.2	135.81 ± 6.85	8	115.57 ± 6.78	125.17 ± 7.45	7	89.05 ± 10.0*	124.21 ± 6.7	7
<b>MP-III-058</b>	131.11 ± 25.5*	139.49 ± 10.9	4	95.02 ± 20.3*	139.49 ± 10.9	11	118.70 ± 4.2**	139.4 ± 10.9	4
<b>XLi-093</b>	130.95 ± 25.4**	139.49 ± 10.9	7	80.59 ± 18.54**	139.49 ± 10.9	7			
<b>DK-I-56-1</b>	114.54 ± 8.4	126.63 ± 4.66	7	126.86 ± 7.54	129.84 ± 8.58	5	86.67 ± 8.8**	119.42 ± 4.2	7
<b>Vehikulum</b>							112.29 ± 16.27	139.4 ± 10.9	7

Podaci u obe tabele izraženi su kao srednja vrijednost ± S.E.M. za broj ispitivanih preparata (n), i to za Tabelu 9: u logM koncentracije koja izaziva 50% maksimalne efikasnosti, a za Tabelu 10: u procentima u odnosu na referentnu kontrakciju izazvanu KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M). Statističke značajnosti obilježene su zvjezdicama: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.3.3.2 Supresivni efekat diazepama na FE- indukovanu kontrakciju preparata

Diazepam primjenjen u najnižoj koncentraciji ( $10^{-7}$  M) nije ispoljio supresivni uticaj na efikasnost FE kontrakcije (osim pri koncentraciji FE od  $10^{-8}$  M) (Slika 36A), ali je značajno ( $P < 0,01$ ) smanjio njenu potentnost, na šta ukazuju  $pEC_{50}$  vrijednosti, predstavljene u Tabeli 9.

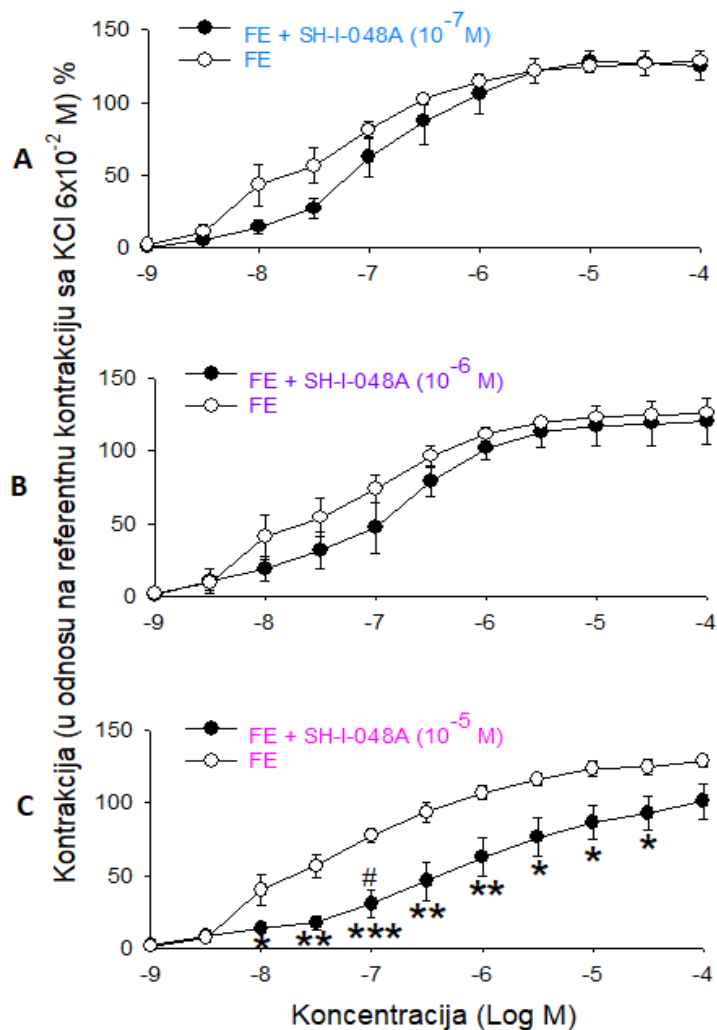
Pri koncentraciji od  $10^{-6}$  M, diazepam je ispoljio supresivni uticaj i na efikasnost i na potentnost FE kontrakcije (Slika 36B, Tabela 9,10). Međutim, najveća koncentracija diazepama ( $10^{-5}$  M) dovela je do značajnog slabljenja ( $P < 0,001$ ) maksimalnog kontraktilnog odgovora FE, bez uticaja na pomijeranje krive (Slika 36C, Tabela 10).



Slika 36. Uticaj diazepam na FE- krivu odnosa koncentracija-kontraktija, kada su preparati pacovske aorte prethodno inkubirani sa diazepamom u koncentracijama: (A)  $10^{-7}$  M (n=5), (B)  $10^{-6}$  M (n=9) i (C)  $10^{-5}$  M (n=6). Kontraktija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontraktiju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; #P < 0,05; ##P < 0,01 (# značajno različite pEC<sub>50</sub> vrijednosti).

#### 4.3.3.3 Supresivni efekat SH-I-048 na FE- indukovanu kontraktiju preparata

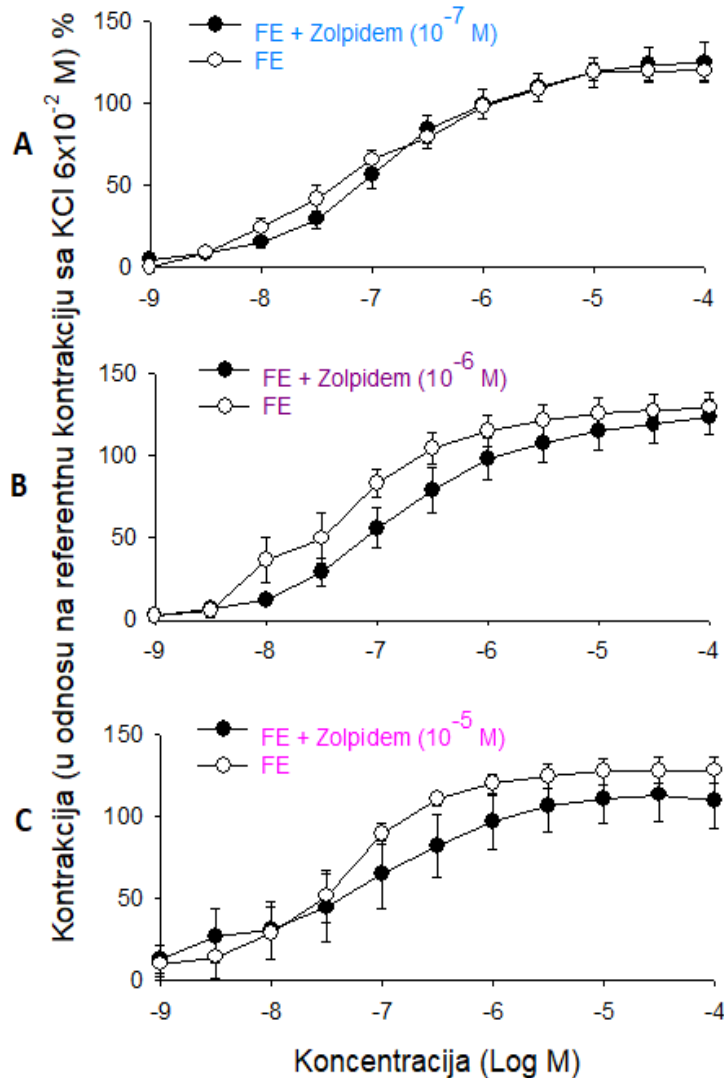
Na Slici 37 (A,B) vidljivo je da je supresivni efekat SH-I-048A izostao kada su preparati bili inkubirani nižim koncentracijama liganda ( $10^{-7}$  M ili  $10^{-6}$  M). Međutim, pri koncentraciji  $10^{-5}$  M, ligand SH-I-048A značajno je smanjio (P < 0,05) pEC<sub>50</sub> (Tabela 9) i Emax vrijednosti (Tabela 10) i tako uslovio pomijeranje FE krive udesno i naniže (Slika 37C).



Slika 37. Uticaj SH-I-048A na FE- krivu odnosa koncentracija-kontrakcija, kada su preparati pacovske aorte prethodno inkubirani sa SH-I-048A u koncentracijama: (A)  $10^{-7}$  M (n =5), (B)  $10^{-6}$  M (n = 5) i (C)  $10^{-5}$  M (n = 7). Kontrakcija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontrakciju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; #P <0.05 (# značajno različite pEC<sub>50</sub> vrijednosti).

#### 4.3.3.4 Efekat zolpidema na FE- indukovanu kontrakciju preparata

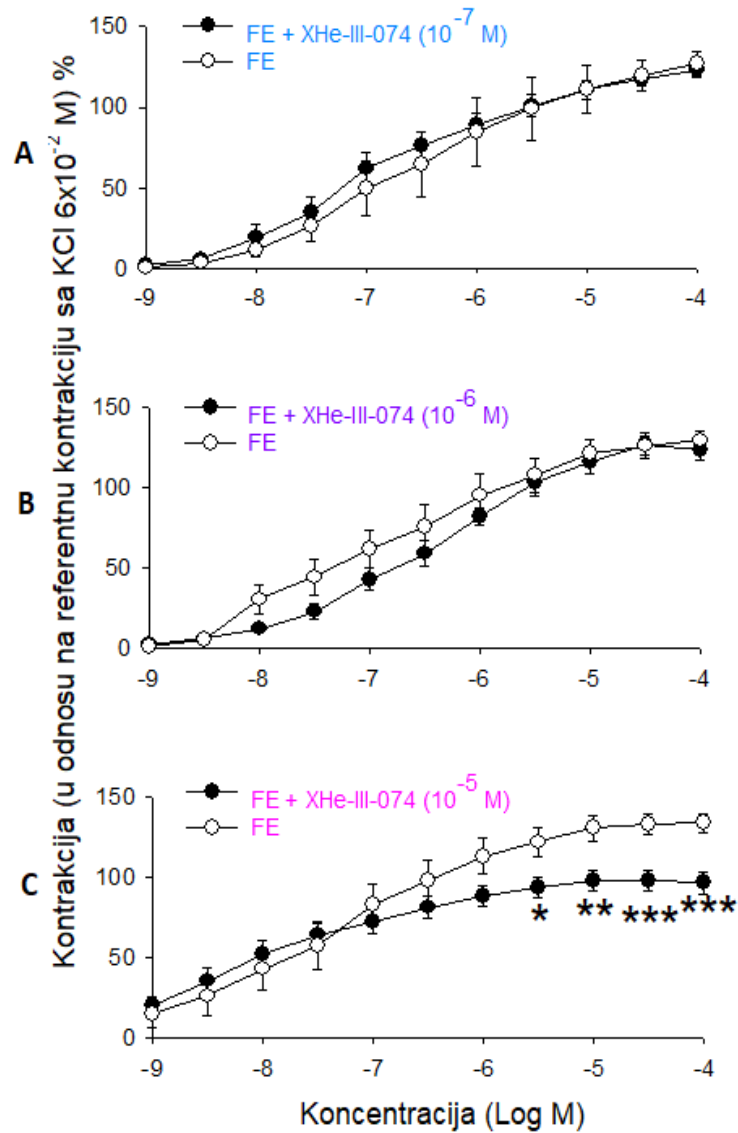
Za razliku od svih ostalih testiranih PAM-ova, jedino zolpidem nije ispoljio statistički značajne supresivne efekte na FE krivu, čak ni pri najvećoj koncentraciji ( $10^{-5}$  M) (Slika 38).



Slika 38. Uticaj zolpidema na FE- krivu odnosa koncentracija-kontrakcija, kada su preparati pacovske aorte prethodno inkubirani sa zolpidemom u koncentracijama: (A)  $10^{-7}$  M (n=6), (B)  $10^{-6}$  M (n=5) i (C)  $10^{-5}$  M (n=5). Kontrakcija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontrakciju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu.

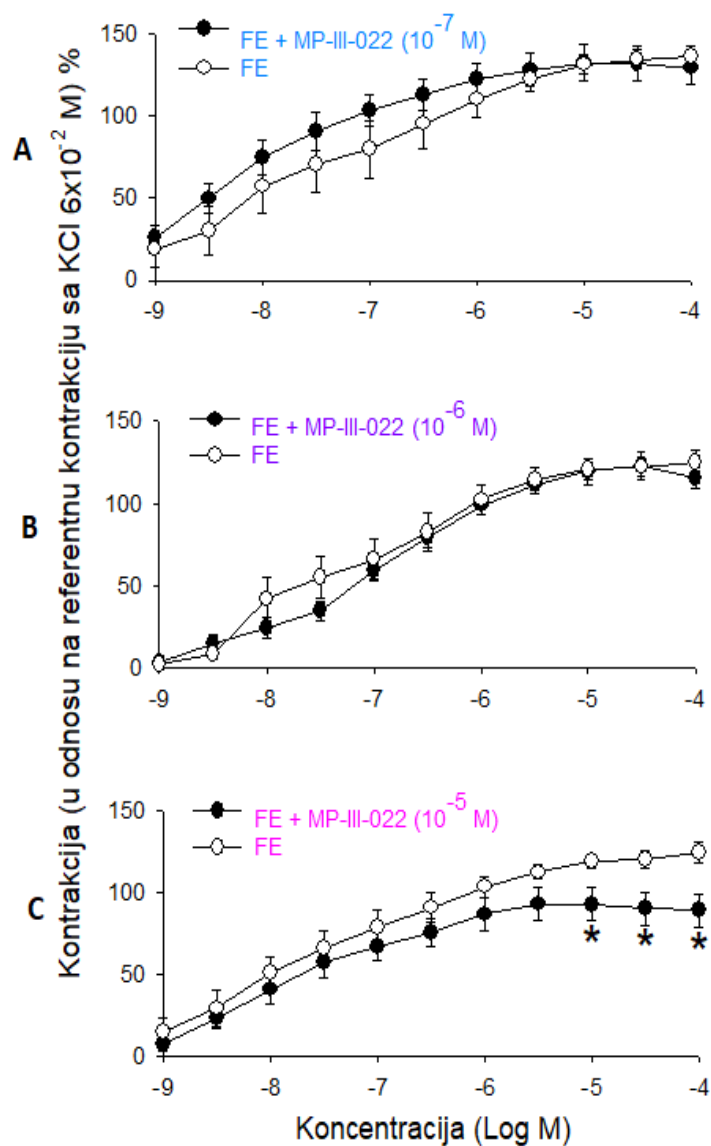
#### 4.3.3.5 Supresivni efekti XHe-III-074, MP-III-022 i DK-I-56-1 na FE- indukovanu kontrakciju preparata

U slučajevima kada su preparati bili inkubirani nižim koncentracijama ( $10^{-7}$  M ili  $10^{-6}$  M) liganada XHe-III-074 ( $\alpha_4$ - selektivni PAM) i MP-III-022 ( $\alpha_5$ - selektivni PAM) supresivni efekat nije postignut i FE kontrakcija u njihovom prisustvu nije se razlikovala od kontrolne FE kontrakcije (Slike 39A,B, 40A,B, respektivno). Međutim, kada su ligandi XHe-III-074 i MP-III-022, primjenjeni u najvećoj koncentraciji ( $10^{-5}$  M), njihov supresivni uticaj je ispoljen na FE efikasnost ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,05$ ; respektivno), te su tako doveli do pomijeranja FE krive naniže (Slike 39C; 40C).



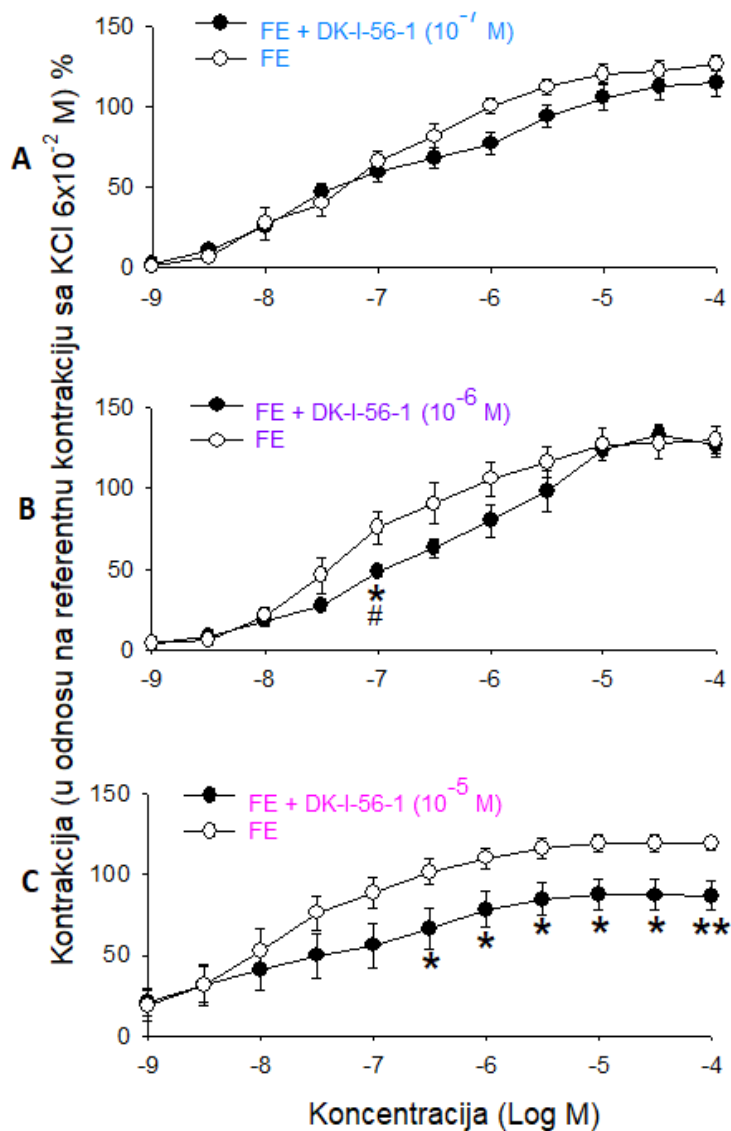
Slika 39. Uticaj XHe-III-074 na FE- krivu odnosa koncentracija-kontrakcija, kada su preparati pacovske aorte prethodno inkubirani sa XHe-III-074 u koncentracijama: (A)  $10^{-7}$  M (n =5), (B)  $10^{-6}$  M (n = 6) i (C)  $10^{-5}$  M (n = 11). Kontrakcija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontrakciju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.





Slika 40. Uticaj MP-III-022 na FE- krivu odnosa koncentracija-kontrakcija, kada su preparati pacovske aorte prethodno inkubirani sa MP-III-022 u koncentracijama: (A)  $10^{-7}$  M (n = 8), (B)  $10^{-6}$  M (n = 7) i (C)  $10^{-5}$  M (n = 7). Kontrakcija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontrakciju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu. \* $P < 0,05$ ; značajno različite  $E_{max}$  vrijednosti.

Ligand DK-I-56-1 nije uticao na FE krivu kada je primjenjen u koncentraciji  $10^{-7}$  M (Slika 41A). Slično diazepamu, DK-I-56-1 je pri koncentraciji  $10^{-6}$  M smanjio ( $P < 0,05$ )  $pEC_{50}$  vrijednost i tako uslovio pomijeranje FE krive udesno (Slika 41B, Tabela 9), dok je pri koncentraciji  $10^{-5}$  M smanjio  $E_{max}$  vrijednost i izazvao pomijeranje FE krive naniže (Slika 41C, Tabela 10).

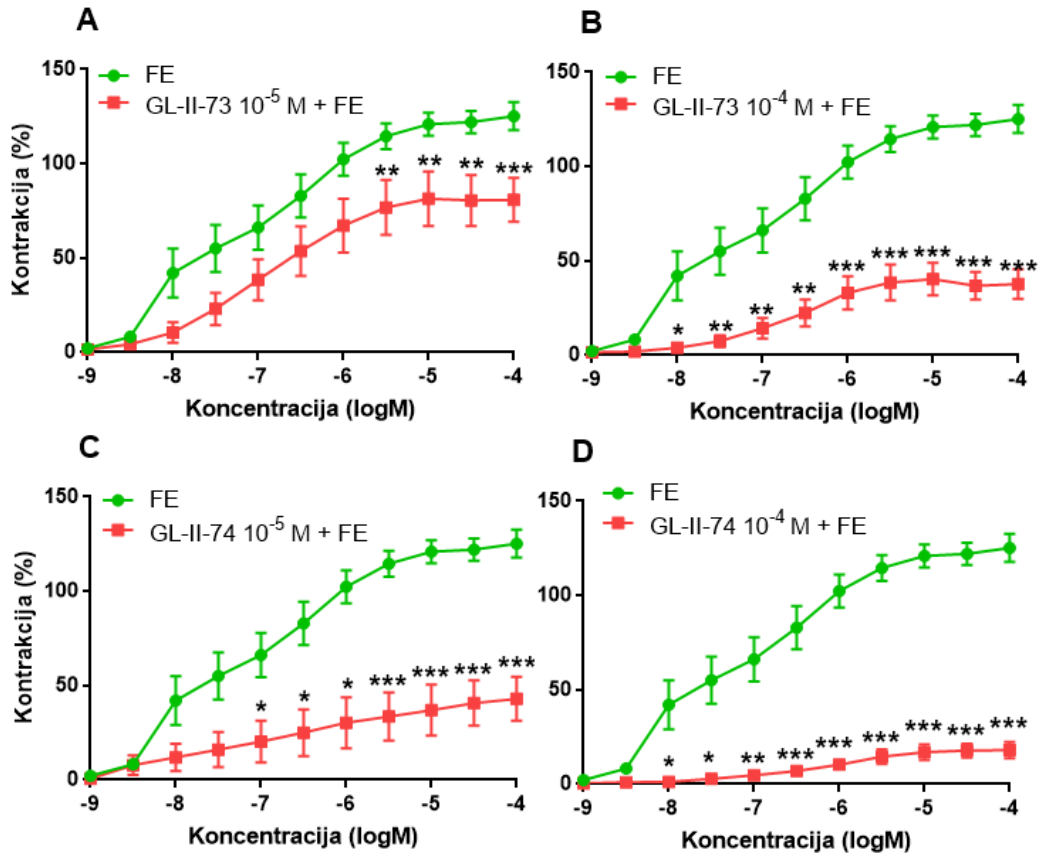


Slika 41. Uticaj DK-I-56-1 na FE- krivu odnosa koncentracija-odgovor, kada su preparati pacovske aorte prethodno inkubirani sa DK-I-56-1 u koncentracijama: (A)  $10^{-7}$  M (n = 7), (B)  $10^{-6}$  M (n = 5) i (C)  $10^{-5}$  M (n = 7). Kontrakcija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontrakciju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; #P < 0,05 (značajno različite pEC<sub>50</sub> vrijednosti).

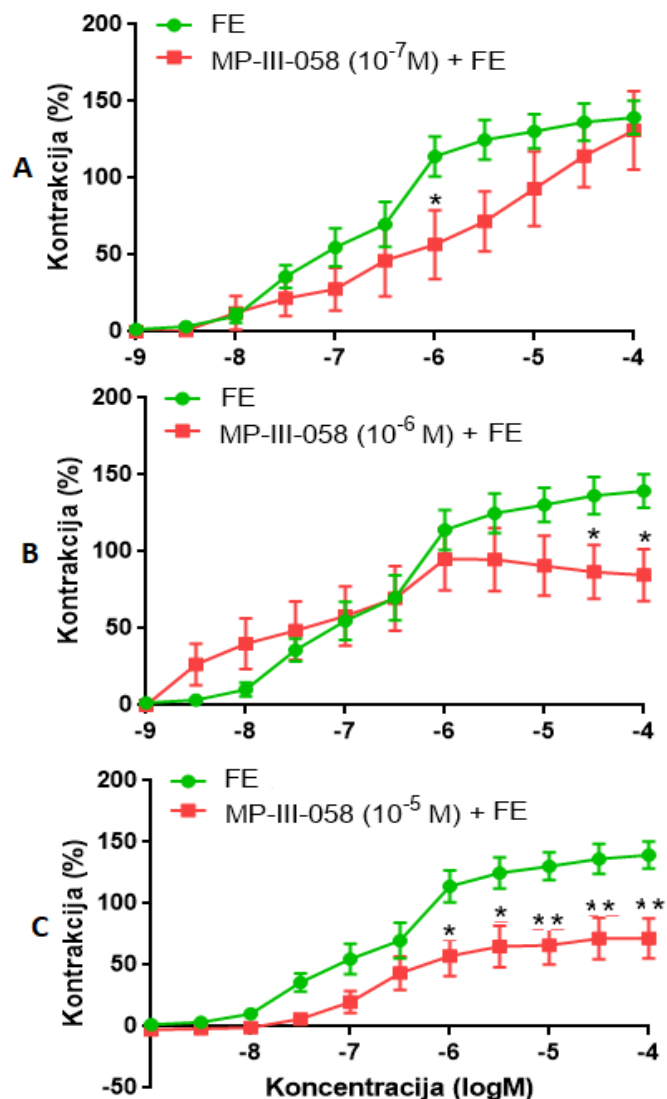
#### 4.3.3.6 Supresivni uticaj drugih $\alpha 5$ - selektivnih PAM-ova na FE- indukovanu kontrakciju preparata

Poseban fokus usmjeren je na efekte drugih  $\alpha 5$ - selektivnih PAM-ova: GL-II-73, GL-II-74 (Slika 42) i MP-III-058 (Slika 43). Slično efektima MP-III-022, i ovi ligandi ispoljili su značajan supresivni efekat na FE kontrakciju (pomijeranje krive naniže). Za ligande GL-II-73 i GL-II-74 ispitani su efekti pri visokim koncentracijama ( $10^{-5}$  i  $10^{-4}$  M), pri čemu je zabilježen snažan nekompetitivan antagonistični karakter (P < 0,001).

Supresivni efekat liganda MP-III-058 pokazao je dozno-zavisan karakter, jer kada je primjenjen u nižoj koncentraciji ( $10^{-7}$  M) MP-III-058 ispoljio je efekat kompetitivnog karaktera (Slika 43A), dok je pri 10 i 100 puta većoj koncentraciji ispoljio efekat nekompetitivnog karaktera (Slika 43B,C).



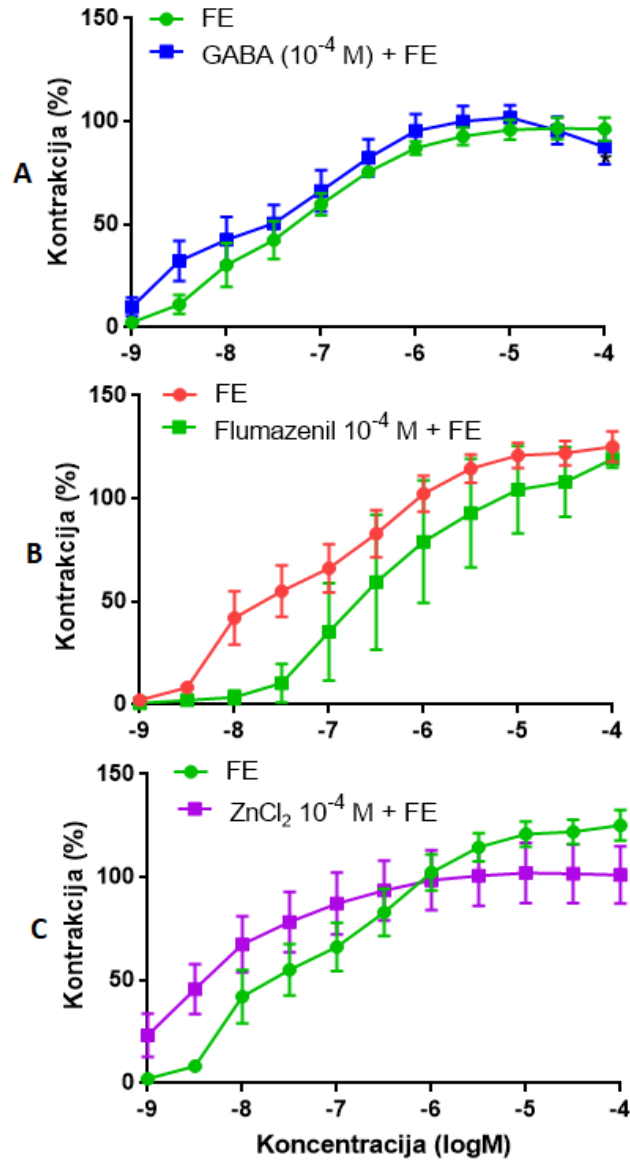
Slika 42. Uticaj GL-II-73 i GL-II-74 na FE- krivu odnosa koncentracija-kontrakcija, kada su preparati pacovske aorte prethodno inkubirani sa: (A) GL-II-73  $10^{-5}$  M (n = 4), (B) GL-II-73  $10^{-4}$  M (n = 6), (C) GL-II-74  $10^{-5}$  M (n = 4) i (D) GL-II-74  $10^{-4}$  M (n = 4). Kontrakcija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontrakciju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\* P < 0,01.



Slika 43. Uticaj MP-III-058 na FE- krivu odnosa koncentracija-odgovor, kada su preparati pacovske aorte prethodno inkubirani sa MP-III-058 u koncentracijama: (A)  $10^{-7}$  M (n =5), (B)  $10^{-6}$  M (n = 11) i (C)  $10^{-5}$  M (n = 6). Kontraktacija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontrakciju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

#### 4.3.3.7 Uticaji GABA-e, flumazenila i $ZnCl_2$ na FE- indukovanu kontrakciju preparata

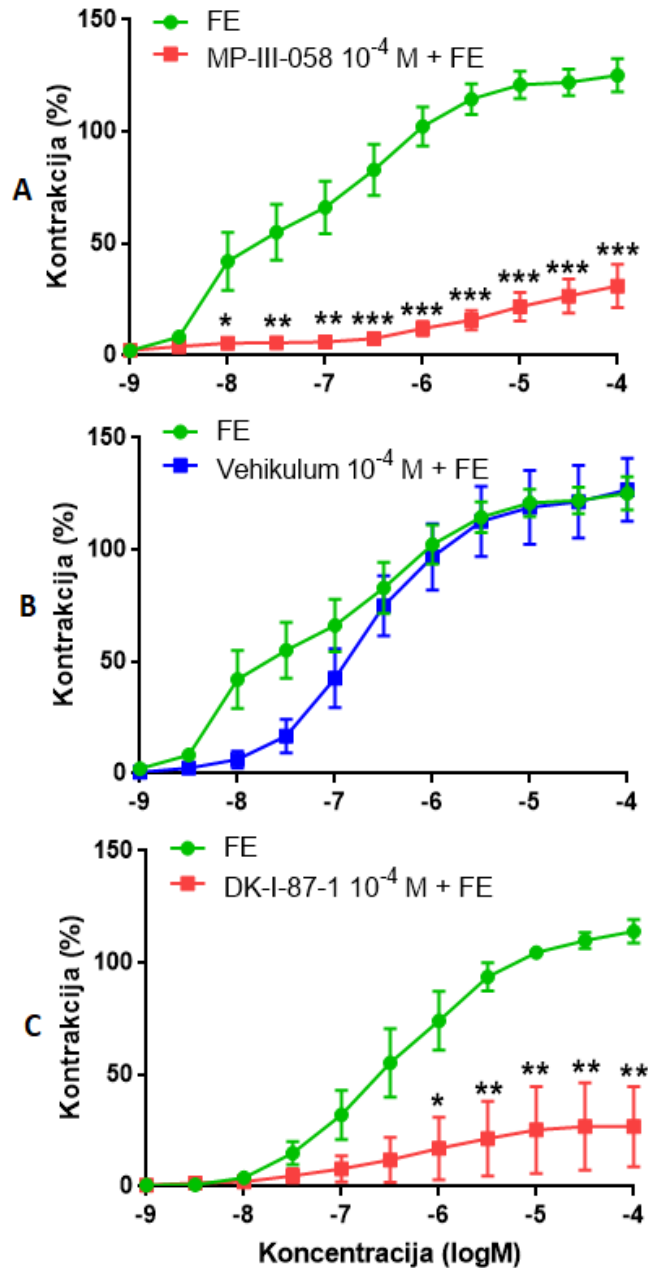
Na Slici 44 jasno je prikazano da testirani ligandi (GABA, flumazenil i  $ZnCl_2$ ), primjenjeni u visokoj koncentraciji ( $10^{-4}$  M) nemaju uticaj na FE kontrakciju. GABA nije pokazala vaskularnu aktivnost, slično kao u prethodnom protokolu (Slika 24, 44A), što je bio slučaj i sa flumazenilom (Slika 44B). Stimulativno dejstvo  $ZnCl_2$ , uočeno pri nižim koncentracijama FE nije bilo značajno i izostalo je pri višim koncentracijama FE (Slika 44C).



Slika 44. Uticaj ispitivnih supstanci u koncentraciji  $10^{-4}$  M na FE- krivu odnosa koncentracija-kontraktacija: (A) GABA ( $n = 6$ ), (B) flumazenil ( $n = 3$ ) i (C)  $ZnCl_2$  ( $n = 7$ ). Kontraktacija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontraktaciju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu.

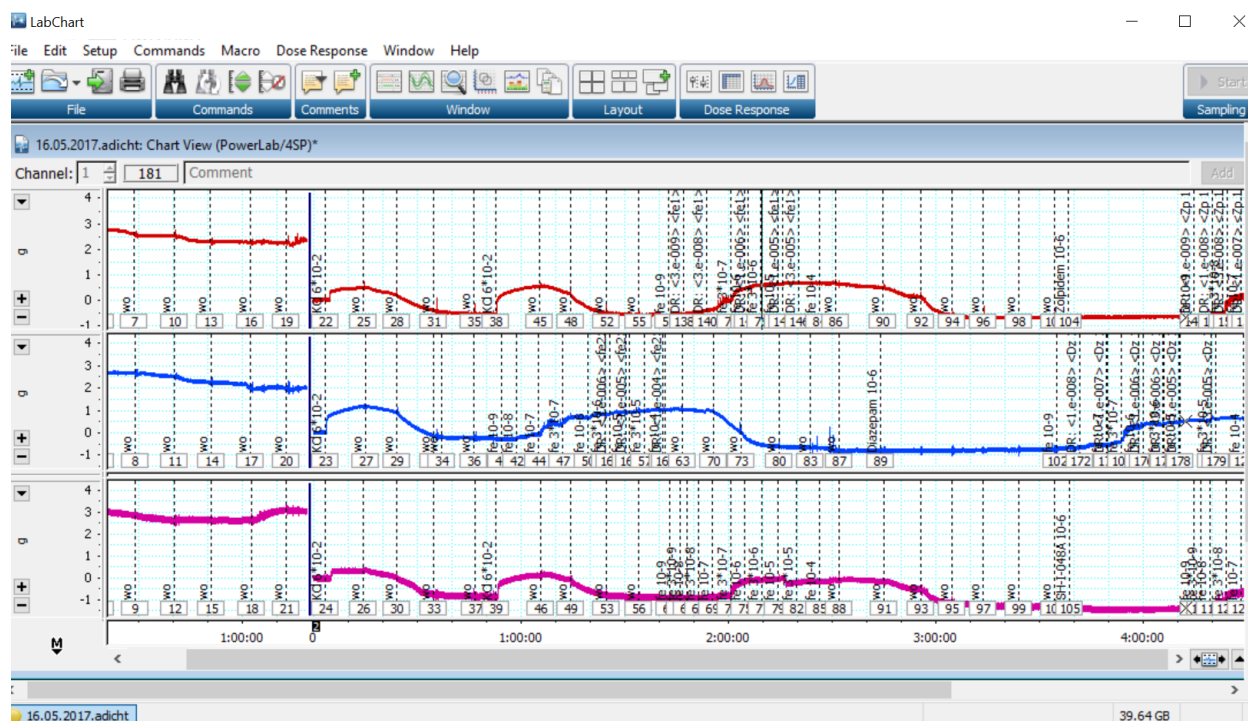
#### 4.3.3.8 Uticaj visoke koncentracije liganda ( $10^{-4}$ M) na FE- indukovanu kontraktaciju preparata

U cilju potvrde relevantnosti gore opisanih supresivnih efekata, izvršeno je dodatno testiranje uticaja visoke koncentracije liganda ( $10^{-4}$  M). Na Slici 45 predstavljeni su izraženi supresivni efekti  $\alpha 5$ - selektivnog MP-III-058 (Slika 45A), izostanak efekta rastvarača (Slika 45B) i manje izraženi supresivni efekti SAM-a DK-I-87-1 (Slika 45C).



Slika 45. Uticaj ispitivanih supstanci u koncentraciji  $10^{-4}$  M na FE- krivu odnosa koncentracija-kontrakcija: (A) MP-III-058 ( $n=5$ ), (B) vehikulum/rastvarač ( $n=4$ ) i (C) DK-I-87-1 ( $n=4$ ). Kontrakcija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontrakciju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Vremenski period u kojem su vršeni opisani eksperimentalni protokoli iznosio je najčešće između pet i šest časova (od momenta postavljanja preparata u kupatilo do završetka protokola, tj. posmatranja efekata testiranih supstanci), pri čemu je vijabilnost preparata bila očuvana (Slika 46), što je osiguralo relevantnost dobijenih rezultata.



Slika 46. Reprezentativni snimci izometrijske kontrakcije preparata pacovske aorte, registrovani softverom LabChart 7 Pro (dana 06.05.2017.), koji prikazuju efekte različitih liganada na FE- izazvanu kontrakciju preparata u tri simultana mjerenja, za svaki preparat u posebnom kupatilu.

## 4.4 Rezultati mjerenja izometrijske kontrakcije prstenova pacovske aorte u prisustvu različitih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R i specifičnih antagonista

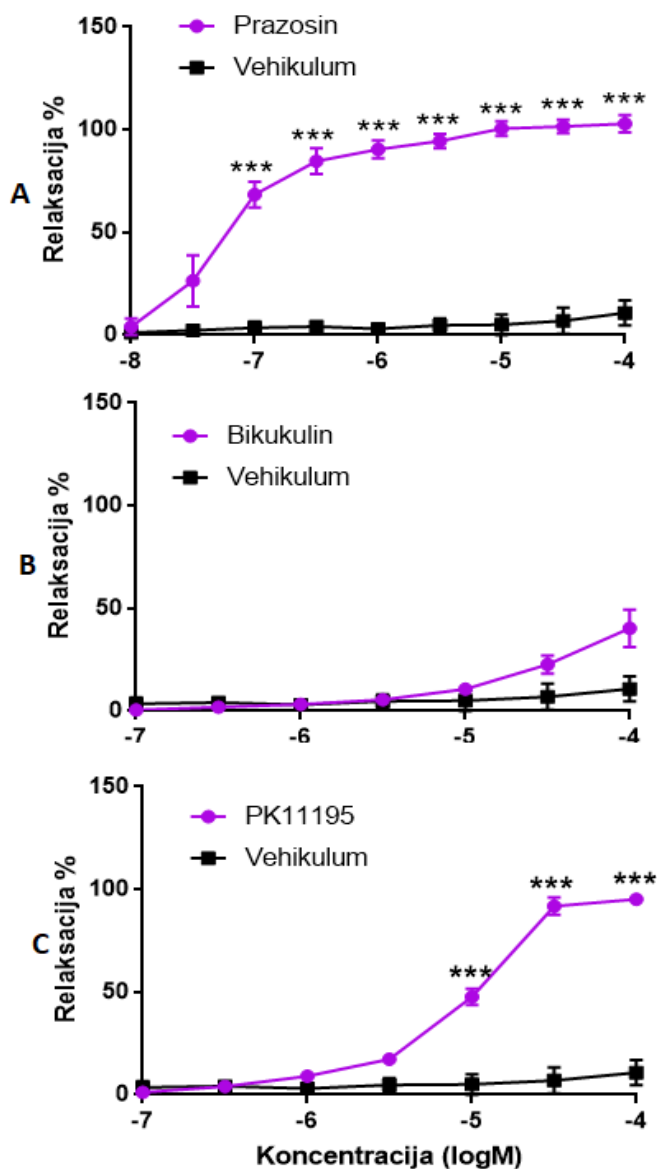
### 4.4.1 Vaskularni efekti prazosina, bikukulina, PK11195 i XLi-093

Svi ispitivani antagonisti pokazali su vazodilatacijske efekte, ali različite maksimalne efikasnosti. U Tabeli 11 predstavljeni su farmakološki parametri (pEC<sub>50</sub> i Emax) za ispitivane antagoniste.

Tabela 11. Vrijednosti pEC<sub>50</sub> i Emax za ispitivane ligande, dobijene iz krivih odnosa koncentracija-odgovor na FE- prekontrahovanim preparatima pacovske aorte.

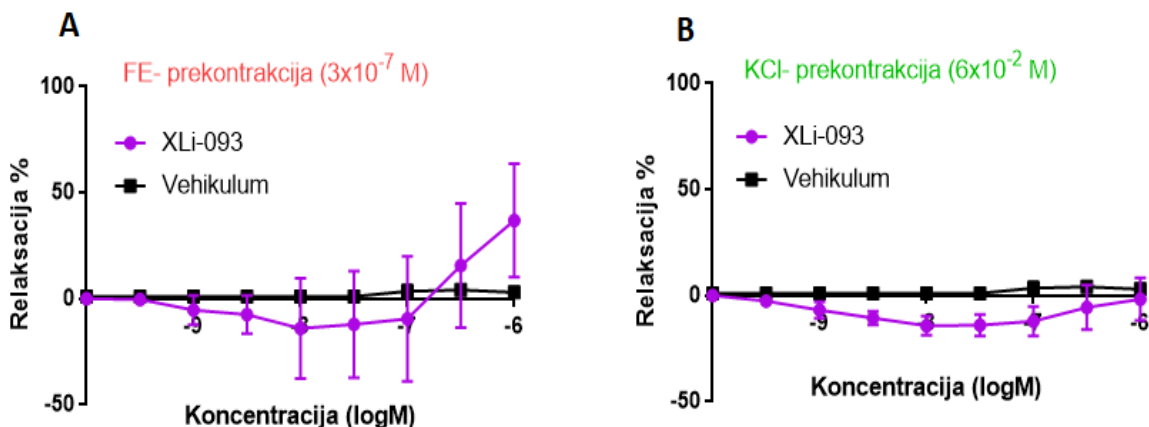
Ligand	pEC <sub>50</sub>	Emax (%)	n
Diazepam	5.57 ± 0.12	86.59 ± 6.13*	8
Midazolam	4.89 ± 0.073	77.55 ± 7.08	7
PK11195	4.09 ± 0.31	91.86 ± 4.32*	7
Bikukulin	3.91 ± 0.21	22.63 ± 4.47	7
Prazosin	7.18 ± 0.06	102.93 ± 4.33	5
Rastvarač (etanol + vodal)	1.72 ± 0.66	15.83 ± 4.23	6
Rastvarač (DMSO + vodal)	3.43 ± 00.99	6.32 3.39	4

Na Slikama 47 i 48 predstavljene su kumulativne krive odnosa koncentracija-odgovor, uporedno sa krivama odgovarajućeg rastvarača (DMSO + destilovana voda). Koncentracijski opseg za prazosin bio je od  $10^{-8}$  do  $10^{-4}$  M, dok je za antagoniste bikukulin i PK11195 bio je od  $10^{-7}$  do  $10^{-4}$  M, jer je rezultatima ranijih protokola, gdje su primjenjivani PAM-ovi u prisutvu antagonista, utvrđeno da je za koncentraciju  $10^{-8}$  M vezana zanemarljiva vaskularna aktivnost. Ipak, za supstancu XLi-093 primjenjene su značajno niže koncentracije od uobičajenih (u rasponu od  $10^{-10}$  M do  $10^{-6}$  M), jer je zbog njene izuzetno slabe rastvorljivosti bilo praktično nemoguće postići koncentraciju veću od  $10^{-6}$  M u uslovima kupatila.



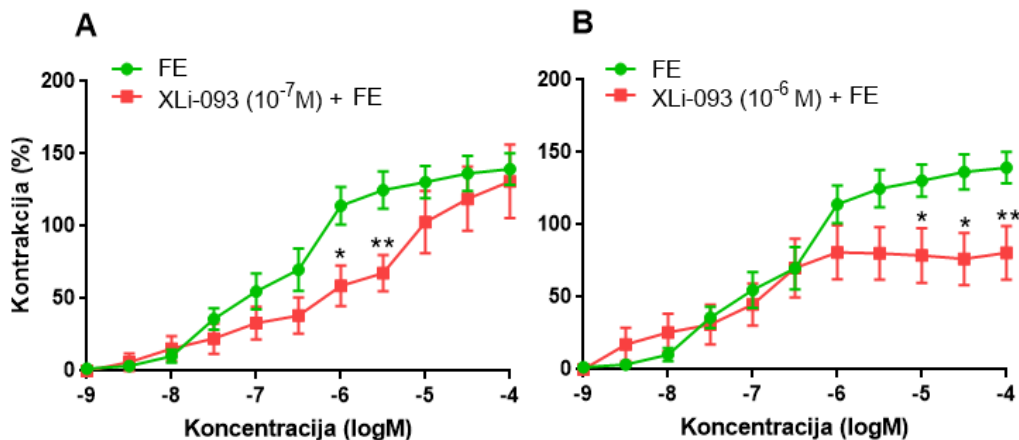
Slika 47. Kumulativne krive odnosa koncentracija-relaksacija za testirane antagoniste na FE- prekontrahovanim preparatima: (A) prazosin (n = 5) i rastvarač (n = 4), B) bikukulin (n = 7) i rastvarač (n = 4) i (C) PK11195 (n = 7) i rastvarač (n = 4). Relaksacija (srednja vrijednost ± S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontraksije. \*\*\*P < 0,001.





Slika 48. Kumulativne krive odnosa koncentracija-relaksacija za XLi-093: A) na FE- prekontrahevanim preparatima: XLi-093 (n = 6) i rastvarač (n = 4) i B) na KCl- prekontrahevanim preparatima: XLi-093 (n = 7) i rastvarač (n = 4). Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontrakcije (A), odnosno KCl- prekontrakcije (B).

Dodatno, u cilju procjene vaskularne aktivnosti modulatora XLi-093, ispitani su i njegovi efekti na FE krivu odnosa koncentracija-kontrakcija (Slika 49).



Slika 49. Uticaj XLi-093 na FE- krivu odnosa koncentracija-odgovor, kada su preparati pacovske aorte prethodno inkubirani sa XLi-093 u koncentracijama: (A)  $10^{-7}$  M (n = 7) i (B)  $10^{-6}$  M (n = 7). Kontrakcija FE (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u %, u odnosu na referentnu kontrakciju postignutu hipertoničnim rastvorom KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) na istom preparatu. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

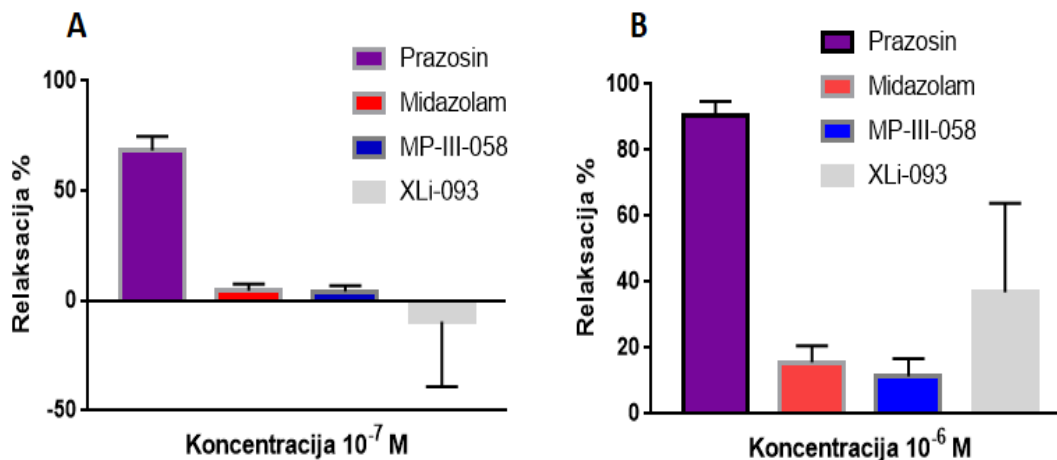
Vaskularni efekti prazosina važni su za procjenu vazoaktivnosti ostalih testiranih supstanci na FE- prekontrahevanim preparatima aorte, jer je prazosin farmakološki antagonista FE- prekontrakcije. Stoga su njegove referentne krive odnosa koncentracija-odgovor poređene sa krivama drugih

antagonista i PAM-ova. Na Slikama 50 i 51 simultano su prikazani relaksacijski odgovori ispitivanih antagonista i odabranih PAM-ova (diazepam, midazolam, MP-III-058).

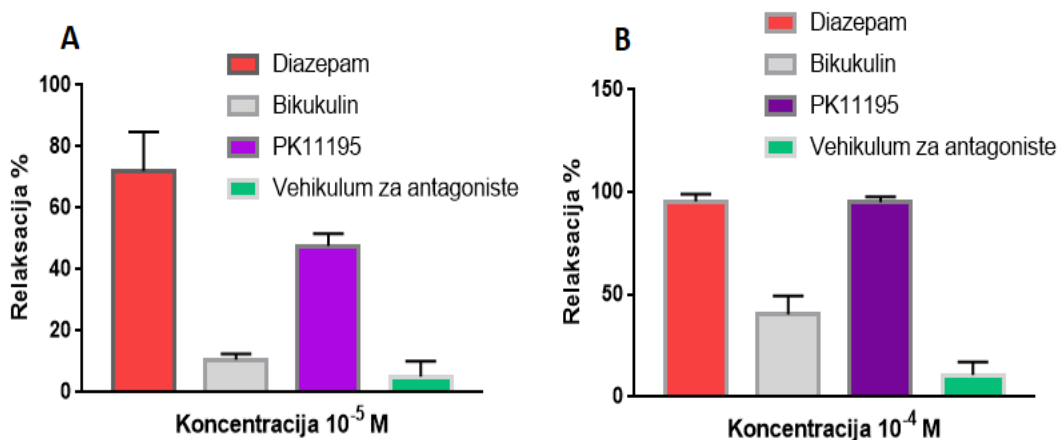
Jasno je uočljiva superiornost prazosina (u pogledu potentnosti i efikasnosti) u postignutim relaksacijskim odgovorima u odnosu na ostale ispitivane ligande, i to pri niskim koncentracijama ( $3 \times 10^{-7}$  M) (Slika 47A, 50).

Evidentan je relaksacijski potencijal antagoniste PK11195, uporediv sa diazepamom pri visokoj koncentraciji (Slika 47C, 51). Za razliku od PK11195, bikukulin i flumazenil ispoljili su slabije relaksacijske odgovore, koji čak i pri visokoj koncentraciji ( $10^{-4}$  M) nisu bili statistički značajni u odnosu na kontrolni vehikulum (Slika 47B, 51).

Iako primjenjen u nižim koncentracijama (zbog slabe rastvorljivosti), XLi-093 ispoljio je određenu vaskularnu aktivnost koja, zbog velikih devijacija, nije bila konzistentna, (Slika 48, 50). Ipak, ligand XLi-093 ispoljio je značajne supresivne efekte na FE- izazvanu kontrakciju preparata, uporedive sa efektima  $\alpha 5$ - selektivnih PAM-ova, kao što je MP-III-058 (Slika 49).

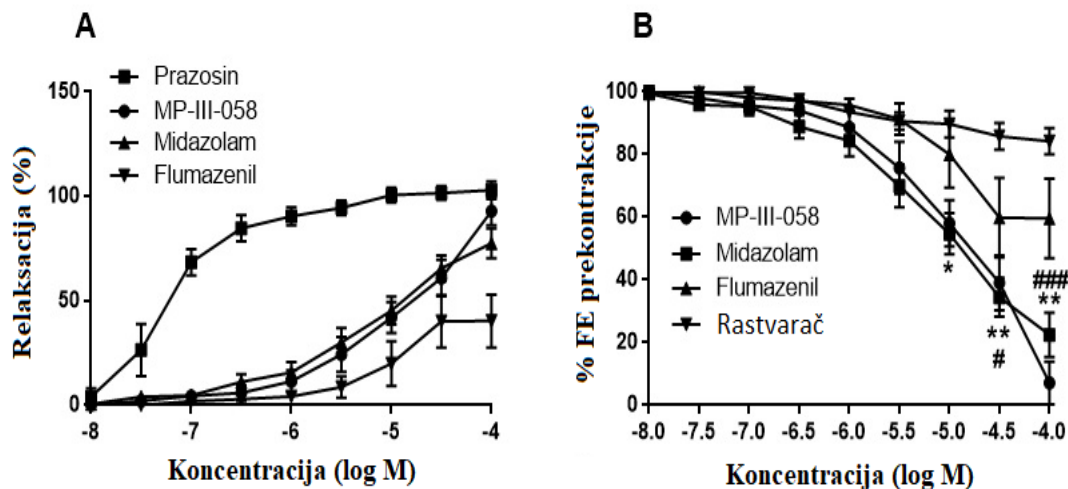


Slika 50. Relaksacijski odgovori (%) prazosina (n = 5), midazolama (n = 7), MP-III-058 (n = 7) i XLi-093 (n = 6) dobijeni na FE- prekontrahovanim preparatima pri koncentraciji: (A)  $10^{-7}$  M i (B)  $10^{-6}$  M. Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontrakcije.



Slika 51. Relaksacijski odgovori (%) diazepam (n = 7), bikukulina (n = 7), PK11195 (n = 7) i vehikuluma (za antagoniste) (n = 4) dobijeni na FE- prekontrahovanim preparatima pri koncentraciji: (A)  $10^{-5}$  M i (B)  $10^{-4}$  M. Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontraksije.

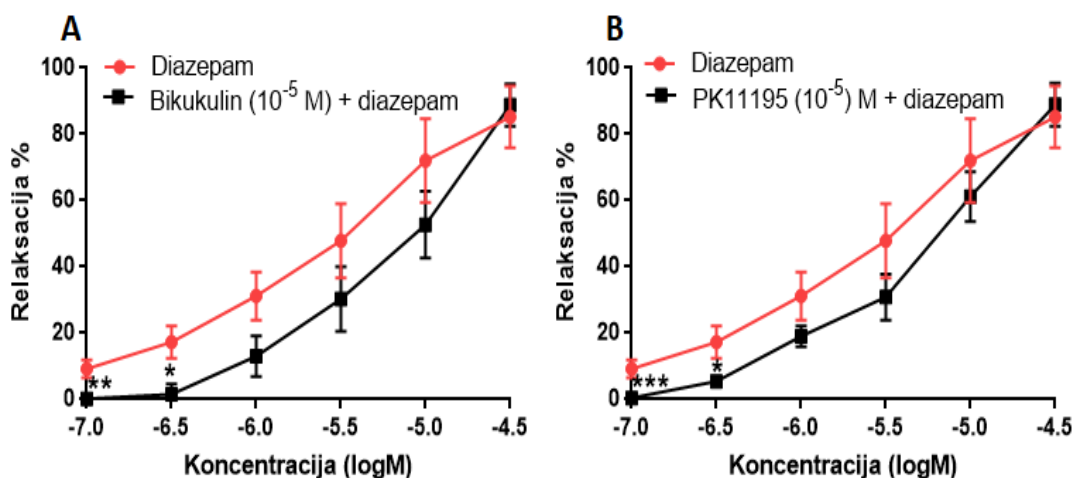
Na Slici 52 predstavljene su krive odnosa koncentracija-odgovor za midazolam, MP-III-058 i flumazenil i upoređene su sa kontrolnim krivama prazosina, odnosno rastvarača. Midazolam i MP-III-058 indukovali su dozno-zavisan vazodilatacijski odgovor, sa maksimalnom efikasnošću (77,5% i 92,8%, respektivno) sličnom prazosinu (102,9%), ali sa znatno slabijom jačinom, na šta ukazuju njihove  $pEC_{50}$  vrijednosti ( $4,89 \pm 0,07$  i  $4,86 \pm 0,07$  u odnosu na  $7,18 \pm 0,06$ , respektivno) (Tabela 11). Flumazenil nije ispoljio značajniju vaskularnu aktivnost u poređenju sa rastvaračem.



Slika 52. Kumulativne krive odnosa koncentracija-odgovor za midazolam (n = 7), flumazenil (n = 5) i MP-III-058 (n = 7) upoređene su sa krivama: (A) prazosina (n = 5) i (B) rastvarača (n = 5), dobijene u FE- prekontrahovanim preparatima pacovske aorte. Odgovori (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M) izraženi su kao: (A) procenat smanjenja FE prekontraksije; (B) procenat referentne (100%) FE prekontraksije. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; statistički različite  $E_{max}$  vrijednosti za midazolam u odnosu na kontrolu (rastvarač); #P < 0.05; ###P < 0.001; statistički različite  $E_{max}$  vrijednosti za MP-III-058 u odnosu na kontrolu (rastvarač).

#### 4.4.2 Procjena antagonističkog uticaja bikukulina i PK11195 na vaskularne efekte diazepam kod FE prekontrahovanih preparata pacovske aorte

Oba antagonista ispoljila su značajno supresivno dejstvo na efekte diazepama, ali samo pri nižim koncentracijama ( $10^{-7}$  i  $3 \times 10^{-7}$  M), što upućuje na kompetitivnu prirodu antagonizma, kako za GABA<sub>A</sub>R, tako i za TSPO receptore (Slika 53). U Tabeli 12 predstavljeni su farmakološki parametri ( $pEC_{50}$  i  $E_{max}$ ) za diazepam u prisustvu ispitivanih antagonista.



Slika 53. Relaksacijski efekti diazepama na FE-prekontrahovanim preparatima pacovske aorte u odsustvu ( $n = 5$ ) i prisustvu specifičnih antagonista ( $10^{-5}$  M): (A) bikukulina ( $n = 7$ ) i (B) PK11195 ( $n = 9$ ). Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontrakcije. Zgrade označavaju broj ispitivanih preparata. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Tabela 12. Vrijednost  $pEC_{50}$  i  $E_{max}$  dobijene iz krivih odnosa koncentracija-odgovor za diazepam, u odsustvu i prisustvu specifičnih antagonista, na FE-prekontrahovanim preparatima pacovske aorte.

Ligandi	$pEC_{50}$	$E_{max}$ (%)	n
<b>Bikukulin (<math>10^{-5}</math> M) + diazepam</b>	$4.79 \pm 0.29$	$88.78 \pm 6.46$	7
<b>PK11195 (<math>10^{-5}</math> M) + diazepam</b>	$5.32 \pm 0.14$	$88.90 \pm 6.50$	9
<b>Diazepam</b>	$4.62 \pm 0.79$	$85.20 \pm 9.35$	5

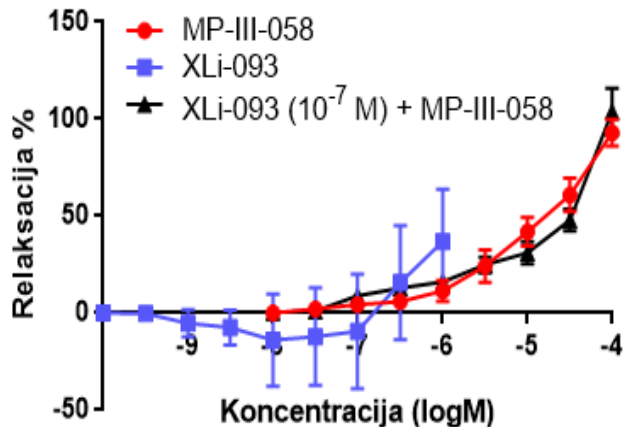
#### 4.4.3 Procjena antagonističkog uticaja XLi-093 na vaskularne efekte MP-III-058 kod FE-prekontrahovanih preparata pacovske aorte

Iako okarakterisan kao visoko-selektivan antagonist za  $\alpha 5\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ , XLi-093 nije uticao na vaskularne efekte  $\alpha 5$ - selektivnog MP-III-058 (Tabela 13, Slika 54). Za procjenu antagonističkog uticaja, XLi-093 je primjenjen u koncentraciji ( $10^{-7}$  M) kojom su se mogli postići optimalni uslovi za izvođenje eksperimenta. Naime, kada je u određenom broju eksperimenata XLi-093 primjenjen u 10 puta većoj koncentraciji ( $10^{-6}$  M), nakon predviđene inkubacije preparata (30 min), značajno je suprimirana FE- prekontrakcija i tako onemogućen dalji protokol.

Tabela 13. Vrijednosti  $\text{pEC}_{50}$  i  $\text{E}_{\text{max}}$  dobijene iz krivih odnosa koncentracija-odgovor za MP-III-058, u odsustvu i prisustvu XLi-093, na FE- prekontrahovanim preparatima pacovske aorte.

Ligand	$\text{pEC}_{50}$	$\text{E}_{\text{max}}$ (%)	n
MP-III-058	$4.86 \pm 0.07$	$92.88 \pm 6.82$	7
XLi-093 ( $10^{-7}$ M) + MP-III-058	$4.76 \pm 0.08$	$103.81 \pm 12.05$	11

Na Slici 54 predstavljena je uporedno i kriva odnosa koncentracija-odgovor samog antagoniste XLi-093, ali pri nižem opsegu koncentracija (zbog njegove izuzetno slabe rastvorljivosti).

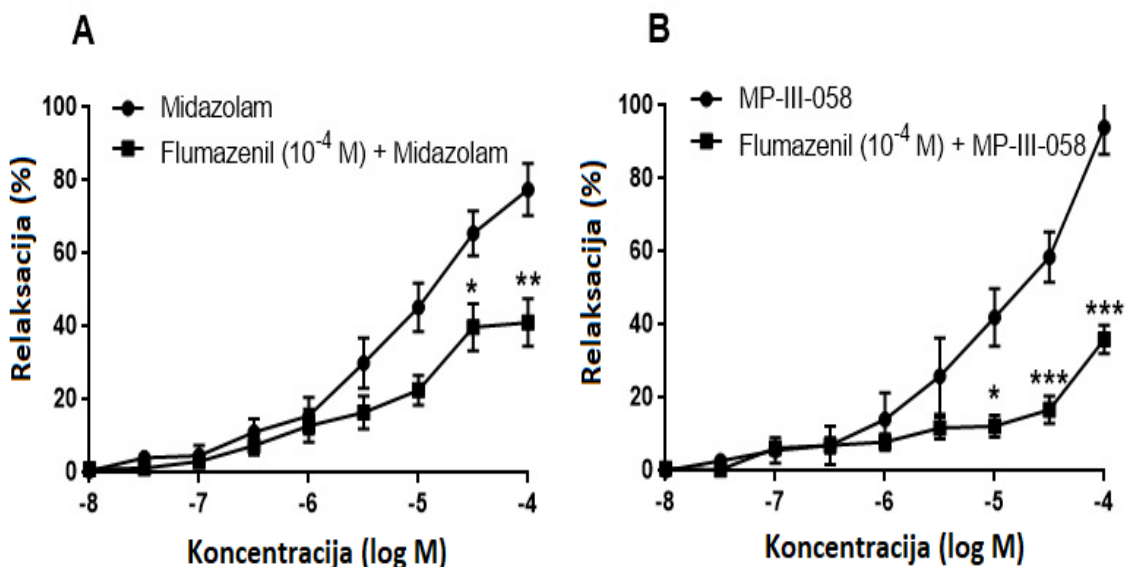


Slika 54. Kumulativne krive odnosa koncentracija-odgovor za XLi-093 ( $n = 6$ ), MP-III-058 u odsustvu ( $n = 7$ ) i prisustvu  $10^{-7}$  M XLi-093 ( $n = 11$ ) dobijene na FE- prekontrahovanim preparatima pacovske aorte. Relaksacija (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izražena je u procentima smanjenja FE- prekontrakcije.

#### 4.4.4 Procjena antagonističkog uticaja flumazenila na vaskularne efekte midazolama i MP-III-058 kod FE- prekontrahovanih preparata pacovske aorte

Kako bi se ispitali mehanizmi vaskularne aktivnosti testiranih PAM-ova (midazolama i MP-III-058), odnosno dobili dokazi da se modulacijom BZD veznog mjesta na vaskularnim  $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$

ostvaruju njihovi vazodilatacijski efekti, primjenjen je flumazenil kao standardni antagonist, selektivan za BZD vezno mjesto na GABA<sub>A</sub>R. Primjenjen u koncentraciji 10<sup>-4</sup> M, flumazenil je značajno smanjio relaksaciju izazvanu midazolamom (P < 0,01), kao i relaksaciju izazvanu MP-III-058 (P < 0,001), i tako uzrokovao pomijeranje njihovih krivih odnosa koncentracija-odgovor udesno i naniže (Slika 55). Na predstavljenim grafikonima, za obe koncentracije flumazenila, uočava se nekompetitivan karakter njegovog antagonističkog uticaja.



Slika 55. Kumulativne krive odnosa koncentracija-relaksacija za: (A) midazolam u odsustvu (n = 7) i prisustvu flumazenila 10<sup>-4</sup> M (n = 8); (B) MP-III-058 u odsustvu (n = 5) i prisustvu flumazenila 10<sup>-4</sup> M (n = 11), dobijene u FE (3x10<sup>-7</sup> M) prekontrahovanim preparatima pacovske aorte. Rezultati (srednja vrijednost ± S.E.M.) izraženi su kao procenat smanjenja FE- prekontraksije. Zagrade označavaju broj ispitivanih preparata. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Antagonistički uticaj flumazenila na vaskularnu aktivnost midazolama i MP-III-058 dodatno je predstavljen u Tabeli 14. Vrijednosti pEC<sub>50</sub> i Emax ukazuju da su vazodilatacijski efekti midazolama i MP-III-058 u odsustvu flumazenila veće potentnosti (veće vrijednosti pEC<sub>50</sub>) i veće efikasnosti (veće vrijednosti Emax) u odnosu na njihove efekte u prisustvu flumazenila.

Tabela 14. Farmakološki parametri ( $pEC_{50}$  i  $E_{max}$ ) za krive odnosa koncentracija-odgovor midazolama i MP-III-058 u odsustvu i prisustvu flumazenila, dobijene na FE- prekontrahovanim preparatima pacovske aorte.

<b>Ligand</b>	<b><math>pEC_{50}</math></b>	<b><math>E_{max}</math> (%)</b>	<b>n</b>
<b>Midazolam</b>	$4.89 \pm 0.073$	$77.55 \pm 7.08$	7
<b>MP-III-058</b>	$4.86 \pm 0.07$	$94.06 \pm 3.95$	7
<b>Flumazenil (<math>10^{-4}</math> M) + MP-III-058</b>	$3.19 \pm 0.26$	$36.05 \pm 3.68$	11
<b>Flumazenil (<math>10^{-5}</math> M) + MP-III-058</b>	$4.70 \pm 0.04$	$65.59 \pm 5.80$	11
<b>Flumazenil (<math>10^{-4}</math> M) + midazolam</b>	$3.78 \pm 0.12$	$41.16 \pm 6.56$	8

Rezultati (srednja vrijednost  $\pm$  S.E.M.) izraženi su kao procenat smanjenja FE- prekontraksije (FE,  $3 \times 10^{-7}$  M). n je broj ispitivanih preparata pacovske aorte.

## 5 Diskusija

Ligandi selektivni za određene podtipove GABA<sub>A</sub>R, a posebno oni selektivni za specifična BZD vezna mjesta na GABA<sub>A</sub>R, pokazali su se kao veoma koristan istraživački alat za ispitivanje vaskularnih efekata GABA-ergičke transmisije u perifernim krvnim sudovima (Drekler i sar., 2013, Sieghart, 2015). Interes za rasvjetljavanje periferne uloge GABA-e u krvnim sudovima porastao je posebno nakon otkrića da funkcionalni GABA<sub>A</sub>R koji sadrže  $\alpha 4$  i  $\alpha 5$  podjedinicu postoje u glatkim mišićima disajnih puteva kod ljudi i zamoraca, te da  $\alpha 4$ - i  $\alpha 5$ - selektivni PAM-ovi GABA<sub>A</sub>R-a preko njih ostvaruju bronhodilatacijsku i antiinflamatornu aktivnost (Gallos i sar., 2015, Forkuo i sar., 2016, Forkuo i sar., 2018, Yocum i sar., 2019).

Prvim *in vitro* studijama na humanoj omentalnoj arteriji Yim i sar. dokazali su postojanje funkcionalnih vaskularnih GABA<sub>A</sub>R-a koji sadrže  $\alpha 4$  podjedinicu, te ukazali na mogući mehanizam endogene vaskularne modulacije miogenog tonusa. Uzimajući u obzir da GABA slobodno cirkuliše u krvi i da mnoge periferne ćelije, uključujući ćelije pankreasa i endotela krvnih sudova (Sen i sar., 2016; Korol i sar., 2018), sintetišu GABA-u moguće je da GABA ispoljava lokalno, autokoidno dejstvo na susjedne glatko-mišićne ćelije krvnih sudova.

Za mjerenje vaskularne aktivnosti GABA-e, odnosno različitih PAM-ova GABA<sub>A</sub>R, zbog bolje dostupnosti uzoraka, te jednostavnijeg rukovanja i preparacije, u ovoj studiji korišćeni su segmenti torakalne pacovske aorte. Upravo zbog ovih prednosti najveći broj *in vitro* istraživanja rađen je na pacovskoj aorti, uprkos ograničenjima koja se odnose na činjenicu da protok krvi u glavnim organima, periferni otpor i vaskularnu permeabilnost kontrolišu mali krvni sudovi, male otporne arterije i arteriole (Martinez-Lemus, 2012).

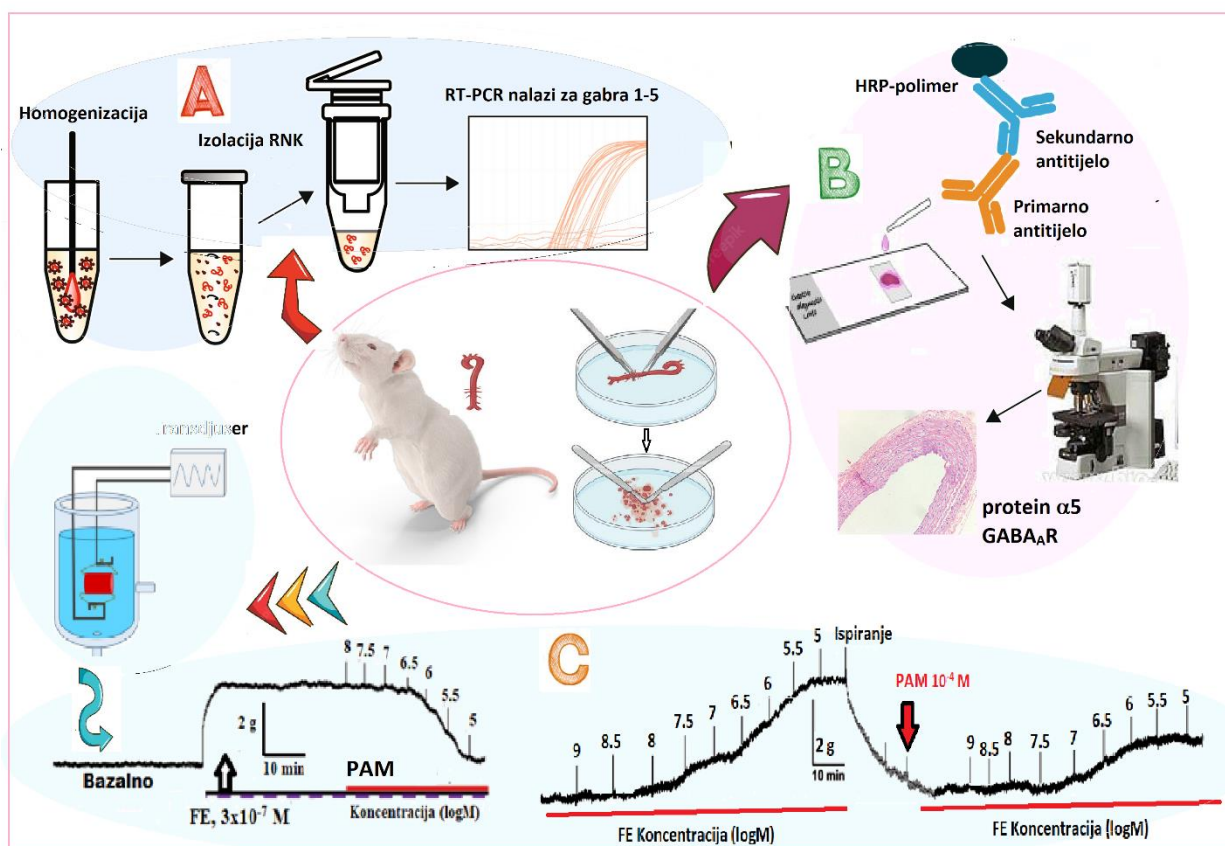
Primjena selektivnih PAM-ova za određene podtipove GABA<sub>A</sub>R u ovoj studiji doprinijela je farmakološkoj karakterizaciji modulacije vaskularnih GABA<sub>A</sub>R. Ipak, izražena homologija između šest  $\alpha$  podjedinica otežava sintezu visoko-selektivnih liganada za GABA<sub>A</sub>R (Rudolph i Mohler, 2014). Nakon *in silico* modelovanja, zasnovanog na poznatim receptorskim strukturama i sekvencama koje definišu "vezna" mjesta, novosintetisani ligandi prolaze *in vitro* karakterizaciju, pri čemu im se određuju profili afiniteta i efikasnosti. Kompetitivni testovi vezivanja liganda za humane rekombinantne  $\alpha \beta 3 \gamma 2$  GABA<sub>A</sub>R eksprimirane na humanim ćelijskim kulturama bubrega embriona (HEK-293), u prisustvu radio-obilježenog liganda ( $[^3\text{H}]$ flunitrazepam), koriste se kao zlatni standard za određivanje afiniteta. Vrijednosti afiniteta ( $K_i$ ) za novosintetisane ligande, korišćene u ovoj studiji, određene su u Milwaukee institutu za otkrivanje lijekova, u okviru Univerziteta u Viskonsinu (*University of Wisconsin, SAD*).

Elektrofiziološka metoda stezaljke za napon sa dvije elektrode (eng. *two-electrode voltage clamp electrophysiology*) primjenjena je za određivanje efikasnosti, odnosno vrijednosti potencijacije određenih podtipova GABA<sub>A</sub>R za korišćene ligande. Ovi *in vitro* eksperimenti urađeni su u saradničkoj laboratoriji prof. Margot Ernst (*Center for Brain Research, Medical University Vienna*), Austrija na  $\alpha \beta 3 \gamma 2$  GABA<sub>A</sub>R pacova dobijenim rekombinantnom tehnologijom i eksprimiranim na žabljim oocitima (*Xenopus laevis*). Vrijednosti potencijacije za određene podtipove receptora određene su pri različitim koncentracijama ispitivanih liganada, a izražene su kao % pojačavanja GABA-indukovanih struja (koristeći GABA koncentraciju koja izaziva 3-5% od maksimalnih struja).

Interesantno je naglasiti da "periferni" GABA<sub>A</sub>R mogu biti aktivirani različitim modulatorima, strukturno i farmakološki potpuno različitim od ranije ustanovljenih i dobro poznatih agonista "centralnih" GABA<sub>A</sub>R. Tako npr. poznato je da GABA<sub>A</sub>R na  $\beta$  ćelijama pankreasa aktiviraju



različiti metabolički hormoni, kao što je GLP peptid (eng. *glucagon like peptide*) (Korol i sar., 2015), kao i transmembranski protein  $\alpha$ -Kloto, poznat kao obligatoran ko-receptor za faktore rasta endokrinih fibroblasta (FGF) (Kuro-o, 2019). Poznato je da  $\alpha$ -Kloto u kompleksu sa FGF receptorom (FGFR) učestvuje u regulaciji različitih metaboličkih procesa, pa tako smanjenje nivoa ekspresije ovog proteina uzrokuje vaskularnu kalcifikaciju (Kuro-o, 2012). Stoga, efekat GABA-e na vaskularnu biologiju zahtjeva temeljan istraživački pristup i dalje studije kako bi se u potpunosti utvrdila uloga koju GABA igra u vaskularnoj fiziologiji i potencijalna terapijska vrijednost selektivne modulacije vaskularnih GABA<sub>A</sub>R.



Slika 56. Ilustracija primjenjenih metoda istraživačkog rada na izolovanoj pacovskoj aorti i izdvojenih rezultata studije: A) Identifikacija iRNK za  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 i  $\alpha$ 5 podjedinice GABA<sub>A</sub>R primjenom RT-PCR; B) Imunohistohemijska identifikacija proteina  $\alpha$ 1-5 i  $\gamma$ 2 podjedinice GABA<sub>A</sub>R; C) Registrovane traseje na softveru povezanom sa kupatilom za izolovane organe, i to krive odnosa koncentracija-relaksacija za ispitivane PAM-ove, te krive odnosa koncentracija-kontraktcija za FE u odsustvu/prisustvu ispitivanih PAM-ova.

## 5.1 Ekspresija vaskularnih GABA<sub>A</sub>R na pacovskoj aorti

Rezultati RT-PCR analize u ovoj studiji po prvi put ukazuju na ekspresiju  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 i  $\alpha$ 5 podjedinice GABA<sub>A</sub>R kod pacovske aorte. S obzirom da je ekspresija registrovana u homogenatu tkiva, ne možemo tvrditi je u pitanju glatko-mišićna ili endotelna lokalizacija identifikovanih podjedinica. Naime, prilikom pripreme uzorka za analizu izvršeno je pažljivo čišćenje aorte od okolnog vezivnog i masnog tkiva, ali nije izvršeno fino razvdajanje glatko-mišićnih od endotelnih

ćelija. Primjenom specifične metodologije za izolovanje ćelija od interesa, kao što je laserska mikrodisekcija (eng. *laser microdissection*, LMD), bilo bi omogućeno precizno razdvajanje ćelija i čišćenje tkiva, uz pomoć laserskog rezanja tkiva/organa.

Nalaz imunohistohemijske analize za identifikaciju  $\alpha$  podjedinica potvrdio je ranije opisani RT-PCR nalaz i dodatno dokazao ekspresiju proteina  $\gamma 2$  podjedinice. Ovom imunohistohemijskom potvrdom prisustva  $\alpha$  i  $\gamma 2$  podjedinica omogućeno je da vaskularne GABA<sub>A</sub>R okarakterišemo kao receptore sa BZD veznim mjestom i tako napravimo mali, ali značajan korak u rasvjetljavanju njihove strukture. Osim toga, imunohistohemijskim bojenjem na poprečnom presjeku aorte nedvosmisleno je ustanovljeno da se radi o glatko-mišićnoj lokalizaciji eksprimiranih podjedinica. Interesantno je da nalazi RT-PCR i imunohistohemijske analize za ekspresiju  $\alpha$  podjedinica u humanoj omentalnoj arteriji nisu pokazali ekspresiju  $\alpha 5$  podjedinice, već samo  $\alpha 4$  podjedinice (Yim i sar., 2020). RT-PCR i imunohistohemijski rezultati u ovoj studiji pokazali su da  $\alpha 6$  podjedinica nije identifikovana u ispitivanim uzorcima tkiva. Sličan nalaz ustanovljen je i kod različitih perifernih organa miša (želudac, pluća, srce, jetra, mokraćna bešika), kada su identifikovane sve  $\alpha$  podjedinice, osim  $\alpha 6$  (Everington i sar., 2018).

Nalazi o ekspresiji  $\alpha 1-5$  i  $\gamma 2$  podjedinica u ovoj studiji, zajedno sa imunohistohemijskim nalazom za identifikaciju  $\beta$  podjedinice (El Idrissi i sar., 2013), prvi ukazuju na postojanje vaskularnih GABA<sub>A</sub>R kod pacovske aorte. Treba imati na umu da se vaskularni GABA<sub>A</sub>R vjerovatno značajno razlikuju od poznatih centralnih GABA<sub>A</sub>R po svom afinitetu za GABA-u, ekspresionim mjestima u ćeliji, biofizičkim i farmakološkim svojstvima zasnovanim na sastavu podjedinica (Juvale i sar., 2021). Poznato je da se GABA<sub>A</sub>R, lokalizovani na postsinaptičkim mjestima u mozgu, uglavnom sastoje od  $\alpha 1-3$ ,  $\beta 1-3$  i  $\gamma 2$ , te da se vezivanjem GABA-e ostvaruje brza (milisekunde) fazna inhibicija (Sieghart, 2015). Za vaskularne GABA<sub>A</sub>R vjeruje se da su sastavljeni od podjedinica pretežno ekstrasinaptičke lokalizacije, kao što je  $\delta$  podjedinica, te da mogu biti duži period aktivirani niskim koncentracijama GABA-e. Stoga su neophodni dalji napor u karakterizaciji vaskularnih GABA<sub>A</sub>R, prije svega u pogledu molekularnih tehnika za identifikaciju strukture i rasporeda podjedinica.

Osim toga, karakterizaciji vaskularnih GABA<sub>A</sub>R može se doprinijeti i eksperimentima na genetski modifikovanim životinjama. Funkcije određenih podtipova "centralnih" GABA<sub>A</sub>R rasvjetljene su primjenom linija *knock in* miševa, sa  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  ili  $\alpha 5$  receptorima neosetljivim na dejstvo BZD (Olsen i Sieghart, 2009). Tada su farmakološki efekti koji su izostali u odgovarajućem testiranju, u odnosu na performanse kontrolnih životinja, pripisivani podtipu receptora koji je mutiran. U slučaju vaskularnih GABA<sub>A</sub>R od interesa bi bilo pratiti farmakološke efekte različitih PAM-ova na genetski modifikovanim životinjama za podjedinice značajne za vaskularnu aktivnost.

## 5.2 Vaskularna aktivnost GABA-e

S obzirom da dosadašnji *in vitro* nalazi o vaskularnoj aktivnosti GABA-e nisu bili konzistentni, željeli smo da u ovoj studiji utvrdimo da li GABA može da relaksira prekontrahovane preparate pacovske aorte i da li može da suprimira FE- izazvanu kontrakciju preparata pacovske aorte. Potvrdili smo ranije nalaze rađene na pacovskoj aorti (Perusquia i sar., 1996, Colussi i sar., 2011) i pokazali da je vaskularna aktivnost GABA-e *per se* zanemarljiva, jer GABA nije relaksirala FE-prekontrahovane preparate, niti je smanjila FE- izazvanu kontrakciju. Ranije opisana relaksacijska svojstva GABA-e odnose se na segmente mezenterične arterije pacova (Farsi i sar., 2011, Kamran i sar., 2013, Kharazmi i sar., 2015), te bi bilo korisno, u nekim narednim studijama, utvrditi njenu vaskularnu aktivnost na manjim arterijama od aorte. Postoji mogućnost da je njena vazoaktivnost

izraženija kad manjih arterija, koje su nosioci perifernog otpora, te da morfološke razlike između arterija prate i funkcionalne specifičnosti i različiti obrasci ekspresije receptora i ćelijskih signalnih puteva.

U literaturi je ranije predložen koncept da GABA porijeklom iz endotela (Sen i sar., 2016), difunduje u intersticijsku tečnost, gdje postiže konstantnu ambijentalnu koncentraciju (Brandes, 2016). U slučaju relaksacije izazvane modulatorima GABA<sub>A</sub>R, pretpostavljamo da je ambijentalna koncentracija GABA-e u intersticijskom dovoljna za toničku aktivaciju vaskularnih GABA<sub>A</sub>R, nakon čega dolazi do ulaska Cl<sup>-</sup> jona u ćeliju i hiperpolarizacije membrane. Poznato je da kod vaskularnih glatko-mišićnih ćelija hiperpolarizacija koja uzrokuje relaksaciju takođe dopinosi održavanju vaskularne homeostaze (Schinzari i sar., 2017). U tom smislu, postoji mogućnost da se fiziološka uloga vaskularnih GABA<sub>A</sub>R ogleda u kompenzatornim mehanizmima održavanja vaskularne homeostaze, posebno u uslovima smanjene koncentracije azot monoksida. Ovi potencijalni kompenzatorni vaskularni efekti mogli bi se dovesti u vezu sa antihipertenzivnom primjenom GABA-e. Na tržištima Kanade i Sjedinjenih Američkih Država sve više su zastupljeni proizvodi za snižavanje krvnog pritiska koji sadrže GABA-u. Rezultati brojnih kliničkih studija potvrđuju opravdanost takve primjene, sugerišući da je antihipertenzivan efekat GABA-e prolazan i umjeren (vrijednosti snižene manje od 10%) (Yamakoshi i sar., 2007, Inoue i sar., 2003, Shimada i sar., 2009). GABA je u Kanadi registrovana kao medicinski sastojak, a u Sjedinjenim Državama uvrštena je u monografiju kvaliteta dijetetskih suplemenata. U većini evropskih zemalja, GABA ima status sastojka za dijetetske suplemente, a preporučeni dnevni unos za većinu proizvođača iznosi 100 mg u podjeljenim dozama (Oketch-Rabah i sar., 2021).

### 5.3 Vaskularna aktivnost neselektivnih PAM-ova

Diazepam, pozitivan modulator sa visokim afinitetom za  $\alpha 1,2,3,5$  GABA<sub>A</sub>R, bio je najefikasniji PAM u ovoj studiji, kako u pogledu postignute relaksacije, tako i u pogledu preventivnih efekata na kontrakciju izazvanu FE. Međutim, uočeni vaskularni efekti ukazali su na složenost mehanizama diazepam-indukovane relaksacije. Očigledno paradoksalno, diazepam je pri nižoj koncentraciji ( $10^{-6}$  M, ali ne i pri  $10^{-5}$  M) uzrokovao značajno pomijeranje FE krive odnosa koncentracija-odgovor udesno, dok je pri višoj koncentraciji ( $10^{-5}$  M) uzrokovao pomijeranje iste krive naniže. Naime, sposobnost kompetitivnog antagoniste ogleda se u pomijeranju krive odnosa doza-odgovor za agonistu udesno, dok se u prisustvu nekompetitivnog antagoniste pomijeranje krive dešava naniže, tj ona se smanjuje, bez pomijeranja udesno. Dobijeni rezultati mogu se protumačiti tako da se diazepam pri većim koncentracijama ponaša kao nekompetitivan, a ne kompetitivan antagonista. Ova konstatacija nije nužno zasnovana na interakciji sa istim strukturama supstrata i uključuje mogućnosti interakcije sa drugim receptorskim/kanalnim/enzimskim/transportnim supstratom, pored vaskularnih GABA<sub>A</sub>R. Stoga je neophodan temeljan i sveobuhvatan pristup kako bi se razjasnila priroda receptorskih i molekularnih interakcija diazepam, kako sa vaskularnim GABA<sub>A</sub>R, tako i sa brojnim drugim mogućim ciljevima u vaskularnim glatko-mišićnim ćelijama.

Rezultati ove studije pokazuju da su vaskularni efekti diazepam izraženiji od efekata midazolama i SH-I-048A. Iako se generalno smatra da klasični BZD, kao što je midazolam, stupaju u interakciju sa GABA<sub>A</sub>R vezivanjem za  $\alpha + \gamma^-$  stranu receptora koji sadrže  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$  ili  $\alpha 5$  i  $\gamma 2$  podjedinice, brojne *in silico* studije ukazuju na postojanje najmanje dva načina vezivanja i tako dovode u pitanje osnovu "zajedničkog" načina vezivanja BZD (Elgarf i sar., 2018). Ranije utvrđena vaskularna aktivnost midazolama na humanim krvnim sudovima (Moriyama i sar., 2011)

potvrđena je rezultatima u ovoj studiji gdje se, slično ranijim nalazima, značajni relaksacijski efekti postižu pri suprakliničkim koncentracijama ( $10^{-5}$  i  $10^{-4}$  M).

Za razumijevanje razlika u vaskularnoj aktivnosti diazepama i midazolama potrebno je poznavati prirodu njihove interakcije i načina vezivanja na vaskularnim GABA<sub>A</sub>R. Ako su razlike u načinu vezivanja BZD ustanovljene za "klasične" centralne GABA<sub>A</sub>R, onda možemo pretpostaviti da interakcije sa vaskularnim GABA<sub>A</sub>R nisu manje složene, posebno nakon što je u ovoj studiji dokazano da ovi periferni agregati takođe sadrže  $\gamma 2$  podjedinicu, koja je okarakterisana kao neophodna za vezno mjesto BZD. Interesantno je da je u humanoj arteriji omentuma deklarirana ekspresija iRNK koja kodira ekstrasinaptičku  $\delta$ , a ne  $\gamma$  podjedinicu (Yim i sar., 2020).

Ligand SH-I-048A, okarakterisan kao jači  $\alpha 1/2/3/5\beta 3\gamma 2$  pozitivni modulator, sa znatno većim afinitetom i efikasnošću od diazepama na sva četiri podtipa GABA<sub>A</sub>R (Obradović i sar., 2014) nije pokazao veću vazoaktivnost od diazepama. Ova neočekivanost rezultata vaskularne nadmoći diazepama nad SH-I-048A može se djelimično objasniti ranije prijavljenim neslaganjima u *in vivo* profilima i relativnim razlikama u približnoj receptorskoj aktivnosti diazepama i SH-I-048A (Obradović i sar., 2014).

Uklanjanje endotela u ovoj studiji nije poništilo vazodilatacijske efekte diazepama. Ipak, ti efekti bili su značajno smanjeni kod preparata sa oštećenim endotelom, što je ukazalo na djelimično endotel-zavisne mehanizme relaksacije, sugerisane i ranijim sličnim studijama na izolovanim krvnim sudovima (Chang i sar., 1994; Colussi i sar., 2011).

Rezultati ove studije pokazuju da je diazepam najpotentniji PAM jer je jedini u koncentraciji  $10^{-7}$  M smanjio FE izazvanu kontrakciju preparata. Ova vaskularna aktivnost diazepama značajna je jer je postignuta pri koncentraciji koja je sedam puta niža od njegove terapijske (pri uslovima sa 96,8% vezivanja za proteine plazme) (Klotz i sar., 1976).

#### 5.4 Vaskularna aktivnost $\alpha 5$ - selektivnih PAM-ova

S obzirom da je  $\alpha 5$  podjedinica lokalizovana na glatko-mišićnom sloju pacovske aorte, primjena  $\alpha 5$  selektivnih PAM-ova doprinosi funkcionalnoj karakterizaciji vaskularnih GABA<sub>A</sub>R. U ovoj studiji primjenjeno je ukupno pet  $\alpha 5$ - selektivnih liganada. Primjenom elektrofizioloških i testova vezivanja, dodijeljeni su im *in vitro* profili značajne preferencije za  $\alpha 5\beta 3\gamma 2$  u odnosu na ostale  $\alpha 1/2/3/\beta 3\gamma 2$  receptore. Četiri liganda su okarakterisana kao  $\alpha 5$  selektivni PAM-ovi (MP-III-022, MP-III-058, GL-II-73 i GL-II-74), dok je jedan (XLI-093) klasifikovan kao  $\alpha 5$ - selektivnan NAM. Njihova vaskularna aktivnost na izolovanim segmentima pacovske aorte bila je značajna i uporediva sa drugim neselektivnim PAM-ovima (poput SH-I-048A i midazolama). Ostvareni procenti relaksacije prekontrahovanih preparata nisu bili veći od drugih testiranih PAM-ova (sa izuzetkom zolpidema), a supresivni efekti na FE- izazvanu kontrakciju pokazali su sličan obrazac djelovanja (pri nižim koncentracijama nisu ispoljene značajnosti, dok je pri najvećoj testiranoj koncentraciji ( $10^{-5}$  M) ispoljen snažan supresivni efekat nekompetitivnog karaktera). Štaviše, ligandi GL-II-73 i GL-II-74, primjeni u 10 puta većoj koncentraciji ( $10^{-4}$  M), skoro potpuno su suzbili FE kontrakciju. Ovaj fenomen primjećen je i kod drugih neselektivnih i selektivnih PAM-ova, kao što su diazepam, midazolam, SH-I-048A, XHe-III-074 i DK-I-56-1. Međutim, snažan supresivni efekat na FE kontrakciju nije posljedica visoke koncentracije testiranih liganada u biološkom sistemu u kupatilu (nije "artefakt" u eksperimentalnom značenju), što je razjašnjeno naknadnim nalazima sa ligandima koji u istoj koncentraciji ( $10^{-4}$  M) nisu ispoljili supresivni efekat (zolpidem, GABA-u, flumazenil i ZnCl<sub>2</sub>). Interesantno je da su supresivni efekti  $\alpha 5$ - selektivnih liganada MP-III-058 i XLI-093 na FE- izazvanu kontrakciju preparata pokazali dvostuku prirodu,

slično efektima diazepama. Naime, u nižoj koncentraciji ( $10^{-7}$  M) uzrokovano je pomijeranje udesno FE krive odnosa koncentracija-odgovor (kompetitivni karakter), dok je pri većim koncentracijama ( $10^{-6}$  i  $10^{-5}$  M) uzrokovano pomijeranje krive naniže (nekompetitivni karakter). Diazepamu slična vaskularna aktivnost vjerovatno je posljedica specifične interakcije sa receptorskim supstratom u okviru glatko-mišićne ćelije, koja pored modulacije GABA<sub>A</sub>R može da uključuje i drugi signalni put, povezan sa  $\alpha$ -adrenergičkom aktivacijom.

Najmanje očekivana vaskularna aktivnost liganda XLi-093 dodatno je pojačala osnov za tvrdnju da se radi o drugačijim efektima modulacije vaskularnih GABA<sub>A</sub>R u odnosu na dobro poznate neuralne. Iako je XLi-093 okarakterisan kao visoko selektivan antagonist  $\alpha 5$  podtipa GABA<sub>A</sub>R, bez značajnije aktivnosti u elektrofiziološkim testovima na  $\alpha 1, 2, 3\beta 3\gamma 2$  GABA<sub>A</sub>R (Li i sar., 2003), njegova vazoaktivnost ispoljena i pri niskim koncentracijama (jedinim mogućim zbog izuzetno slabe rastvorljivosti supstance) ukazuje da je XLi-093 prije pozitivan nego neutralan modulator vaskularnih GABA<sub>A</sub>R.

## 5.5 Vaskularna aktivnost $\alpha 1$ -, $\alpha 4$ - i $\alpha 6$ - selektivnih PAM-ova

Zolpidem, visoko efikasan modulator GABA<sub>A</sub>R koji sadrže  $\alpha 1$  podjedinicu, pokazao je najslabiju vaskularnu aktivnost od svih testiranih PAM-ova. Moguće objašnjenje za ovu slabu vazoaktivnost zolpidema može biti povezano sa odsustvom njegove efikasnosti ili slabom efikasnošću na GABA<sub>A</sub>R koji sadrže druge  $\alpha$  podjedinice (Savić i sar., 2010). Na bazi RT-PCR i imunohistohemijskih nalaza iz ove studije, pretpostavljamo da  $\alpha 1$  podjedinica, zajedno sa drugim  $\alpha$  podjedinicama učestvuje u izgradnji agregara vaskularnog GABA<sub>A</sub>R. Iako visoko zastupljena, poznato je da u takvoj kombinaciji podjedinica,  $\alpha 1$  ne učestvuje u veznom mjestu BZD (del Rio i sar., 2001), te vjerovatno zato zolpidem ne ispoljava očekivanu modulatornu aktivnost na vaskularnom GABA<sub>A</sub>R. Dakle, rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji ukazuju da u prisustvu zolpidema nije postignuta visoko efikasna modulaciju  $\alpha 1$ -vaskularnih GABA<sub>A</sub>R. Međutim, rezultati ranije studije na izolovanim segmentima pacovske aorte ukazuju na izražena vazodilatacijska svojstva zolpidema, veća čak i od diazepama (Kagota i sar., 2021).

XHe-III-074, PAM sa funkcionalnom preferencijom prema  $\alpha 4$ GABA<sub>A</sub>R, pokazao je izražene vazodilatacijske efekte, uporedive sa efektima diazepama. Uočena vazoaktivnost ovog PAM-a može se objasniti ekspresijom proteina i iRNK za  $\alpha 4$  podjedinicu u tkivu aorte pacova. Sličan pristup farmakološkoj karakterizaciji  $\alpha 4$ - i  $\alpha 5$ - selektivnih PAM-ova započet je nakon identifikacije  $\alpha 4$  i  $\alpha 5$  podjedinica u glatkim mišićima traheje i bronhijama kod ljudi i zamoraca (Mizuta i sar., 2008, Gallos i sar., 2015, Forkuo i sar., 2016). Terapijski značaj  $\alpha 4$ -selektivnih PAM-ova prepoznat je nakon što su njihovi bronhodilatacijski efekti povezani sa modulacijom funkcionalnih GABA<sub>A</sub>R u disajnim putevima (Gallos i sar., 2012, Forkuo i sar., 2016). Od tada se predano radi na optimizaciji selektivnih PAM-ova, kako bi se postigla što veća farmakološka selektivnost, a smanjila neželjena dejstva potencijalno novih bronhodilatatora.

DK-I-56-1 je jedini PAM, pored diazepama, koji je pri nižim koncentracijama ( $10^{-7}$  M i  $10^{-6}$  M) smanjio FE-indukovanu kontrakciju preparata. Uzimajući u obzir da u ovoj studiji nije utvrđena ekspresija  $\alpha 6$  podjedinice, ova vazoaktivnost DK-I-56-1, koji je okarakterisan kao  $\alpha 6$ - selektivan PAM (Knutson i sar., 2018), od posebnog je interesa, a može biti posljedica različitih mogućnosti. Naime, moguće je da je ligand DK-I-56-1 ostvario svoju vaskularnu aktivnost modulacijom vaskularnih GABA<sub>A</sub>R koji ipak sadrže  $\alpha 6$  podjedinicu. Složenost regulacije genske ekspresije, uključujući mogućnost alternativnog splajsovanja (eng. *alternative splicing*), može usloviti

formiranje takvih varijanti transkripta *gabrac* u tkivu aorte pacova koje se ne mogu otkriti pomoću primjenjenih prajmera. Naime, u literaturi su već opisane različite varijante, i to kratke i dugačke "splajsovane" varijante  $\alpha 6$  podjedinice (Korpi i sar., 1994). Osim toga, moguće je da je nivo ekspresije mRNA  $\alpha 6$  podjedinice mnogo niži u poređenju sa drugim podjedinicama, posebno ako je ova podjedinica eksprimirana samo u određenim, diskretnim ćelijama torakalne aorte. Poređenja radi, ekspresija  $\alpha 6$  podjedinice u mozgu usmjerena je na strukture malog mozga, dok ostatak mozga pokazuje manju, veoma nisku ili nikakvu ekspresiju *gabrac* (Lein i sar., 2007). Takođe, postoji mogućnost ispoljavanja vaskularne aktivnosti DK-I-56-1 preko nekog drugog ćelijskog supstrata, koji ne uključuje vaskularne GABA<sub>A</sub>R. S obzirom da je DK-I-56-1 antagonista visokog afiniteta na klasičnom BZD veznom mjestu GABA<sub>A</sub>R (Knutson i sar., 2018), njegove interakcije sa prisutnim BZD receptorskim strukturama na krvnim sudovima mogu na određen način usloviti njegovu vazoaktivnost, pri čemu priroda takve interakcije ne mora biti neutralna.

Ligand DK-I-87-1, za koga se očekivalo da neće biti vazoaktivan, budući da je prilikom elektrofiziološkog testiranja bio neaktivan na receptorima koji sadrže  $\alpha 6$  podjedinicu, te je samo slabo modulirao druge testirane GABA<sub>A</sub>R (Knutson i sar., 2018), ipak je pokazao značajan supresivni efekat na FE krivu odnosa koncentracija-odgovor. Iako je ova vaskularna aktivnost uočena pri visokoj koncentraciji liganda ( $10^{-4}$  M), ona je značajna u pogledu mehanizama ostvarene interakcije, jer ni GABA, ni flumazenil, niti zolpidem nisu pokazali takvu aktivnost pri istoj koncentraciji ( $10^{-4}$  M).

## 5.6 Zajedničke odlike vaskularne aktivnosti testiranih PAM-ova

Rezultati mjerenja vazodilatatornih efekata kod svih testiranih PAM-ova pokazali su da su relaksacijski efekti zavisni od vrste kontraktinog agensa. Naime, nalazi da su maksimalni relaksacijski odgovori za sve testirane PAM-ove veći kod FE- prekontrahovanih nego kod KCl- prekontrahovanih preparata odgovaraju ranije utvrđenim *in vitro* rezultatima vazoaktivnosti različitih BZD (Chang i sar., 1994; Yamaguchi i sar., 1997; Colussi i sar., 2011). Pretpostavka je da kontraktilni agensi ispoljavaju različite interakcije sa supstratima odgovornim za toničku inhibiciju na nivou vaskularnih glatko-mišićnih ćelija. FE- izazvane kontrakcije uključuju intracelularno oslobađanje Ca<sup>2+</sup> jona uzrokovano aktivacijom  $\alpha$  adrenergičkih receptora, te priliv Ca<sup>2+</sup> jona u ćeliju aktivacijom Ca<sup>2+</sup> kanala kojima upravljaju receptori (eng. *receptor-operated Ca<sup>2+</sup> channels*, ROC), dok su kontrakcije izazvane KCl prvenstveno posljedica ekstralcelularnog priliva Ca<sup>2+</sup> jona kroz voltažo-zavisne Ca<sup>2+</sup> kanale (Yamaguchi i sar., 1997; Hussain i Marshall, 1997).

Značajna vaskularna aktivnost kod svih ispitivanih PAM-ova (sa izuzetkom zolpidema) ispoljena je pri koncentraciji  $10^{-5}$  M. Slične mikromolarne koncentracije BZD prijavljene su u ranijim *in vitro* studijama na izolovanim krvnim sudovima (French i sar., 1989; Galindo i sar., 2001; Park i sar., 2006; Colussi i sar., 2011, Kagota i sar., 2021). Pri deset mikromolarnoj koncentraciji ( $10^{-5}$  M), svi vazoaktivni PAM-ovi ostvarili su relaksaciju prekontrahovanih preparata preko 50%, te suzbili su FE- izazvanu kontrakciju preparata na nekompetitivan način. Iako se radi o suprakliničkoj koncentraciji za većinu BZD (Park i sar., 2006), ovakvi vaskularni efekti mogu biti značajni u hitnim stanjima kao što su hipertenzivne krize, predoziranje ili zloupotreba lijekova (Colussi i sar., 2011). Ipak treba naglasiti da, iako su opisanim vaskularnim efektima testiranih PAM-ova potvrđena ranije poznata vaskularna, hipotenzivna svojstva kliničkih BZD, njihov relaksacijski potencijal značajno je niži u poređenju sa referentnim prazosinom, na šta ukazuju

pEC<sub>50</sub> vrijednosti u ovoj studiji. Pored toga, vaskularni efekti testiranih PAM-ova odnose se na bazalne uslove, odnosno određeni su na izolovanim aortama normotenzivnih pacova. S obzirom da je miogeni tonus krvnih sudova povećan u patološkim stanjima, kao što je hipertenzija (Falcone i sar., 1993; Garcia i sar., 1997) važno je utvrditi vazoaktivnost PAM-ova na različitim animalnim modelima hipertenzije. Poznato je da su relaksacijski efekti propofola, koji je takođe PAM GABA<sub>A</sub>R, bili izraženiji na izolovanim aortnim prstenovima spontano hipertenzivnih u odnosu na normotenzivne pacove, što ukazuje na strukturne i funkcionalne razlike arterijskog zida u hipertenziji (Samain i sar., 2002). Vaskularni efekti PAM-ova GABA<sub>A</sub>R receptora zahtjevaju dalja istraživanja sa većim translacijskim kapacitetom, u drugim vaskularnim tkivima sa većim doprinosom ukupnom vaskularnom otporu (kao što su mezenterične i bubrežne arterije), kao i na animalnim modelima hipertenzije. Neophodni su dalji koraci u rasvjetljavanju strukture i funkcije vaskularnih GABA<sub>A</sub>R, posebno u patološkim stanjima, poput hipertenzije, kako bi se dobio bolji uvid u potencijalnu terapijsku primjenu nosivih sintetičkih PAM-ova. Za dalju optimizaciju liganada koji ciljaju populacije vaskularnih receptora, važno je razjasniti tačan sastav i raspored podjedinica, kao i vezna mjesta pomoću kojih BZD ligandi ostvaruju vazodilatacijske efekte.

## 5.7 Vaskularna aktivnost specifičnih antagonista za PAM-ove GABA<sub>A</sub>R

Vaskularna aktivnost antagonista (PK11195, bikukulina i flumazenila) određena je prije procjene njihovog antagonističkog uticaja na vaskularne efekte testiranih PAM-ova. Kao visoko selektivan ligand za TSPO receptore, PK11195 ispoljio je značajnu relaksacijsku aktivnost, uporedivu sa efektima ovdje testiranih PAM-ova, čime su potvrđena njegova ranije opisana vazodilatacijska svojstva (French i sar., 1989). Poznato je da TSPO reguliše širok spektar bioloških funkcija, uključujući kontrolu sinteze steroida, regulaciju potencijala mitohondrijalne membrane i respiratornog lanca, kontrolu imunološkog odgovora, apoptozu i oksidativni stres (Al-Kuraishy i sar., 2021). Međutim, TSPO ima veliki fiziološki značaj u regulaciji kardiovaskularnog sistema. Protein je najčešće lokalizovan na spoju između unutrašnje i spoljašnje mitohondrijalne membrane, a pored brojnih drugih tkiva i organa, široko je eksprimiran u ćelijama periferne krvi, srcu i endotelnim i glatko-mišićnim ćelijama krvnih sudova (Qi i sar., 2020). S obzirom da TSPO, kao protein sa pet transmembranskih domena, može da formira komplekse sa voltažno-zavisnim anjonskim kanalima na spoljašnjoj membrani i translokatorima adenin nukleotida (eng. *adenine nucleotide translocator*, ANT) na unutrašnjoj membrani mitohondrija (Qi i sar., 2020), moguće je da se interakcijom sa ovim kompleksima od strane PK11195 postižu mehanizmi ostvarene relaksacije. S obzirom na ustanovljene preferencije vezivanja poznatih liganada, vaskularni GABA<sub>A</sub>R i TSPO bi mogli biti mete istih liganada, tako da su njihove interakcije u homeostazi vaskularnih glatko-mišićnih ćelija vrlo izvjesne (Denora i Natile, 2017).

Relaksacijski efekat bikukulina, kompetitivnog antagoniste GABA<sub>A</sub>R, nije bio značajan u poređenju sa kontrolnim rastvaračem, te su tako efekti bikukulina i GABA-e u pogledu vaskularne aktivnosti bili izjednačeni. Vaskularna aktivnost liganada XLi-093 diskutovana je u dijelu koji se odnosi na vaskularnu aktivnost  $\alpha 5$ - selektivnih PAM-ova. Relaksacijski odgovori prazosina, kao referentnog antagoniste  $\alpha 1$ - adrenergičke aktivacije, poslužili su za kvalifikaciju vazodilatacijskih efekata svih ispitivanih liganada. Ustanovljeno je da se za postizanje "prazosinske" efikasnosti moraju primijeniti visoke koncentracije testiranih liganada, teško dostižne za biološki sistem.

Rezultati iz ove studije ukazuju na skromnu vaskularnu aktivnost flumazenila, koji ni pri visokoj koncentraciji ( $10^{-4}$  M) nije značajno uticao na FE krivu odnosa koncentracija-odgovor. Ipak, flumazenil je ispoljio određena vazodilatacijska svojstva (maksimalna efikasnost iznosila je oko 40%), vjerovatno zato što djeluje kao pun antagonist samo na  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ , ali ne i na druge podtipove GABA<sub>A</sub>R (Sieghart i Savić, 2018). Djelimična agonistička aktivnost flumazenila potvrđena je pomijeranjem FE krive odnosa koncentracija-kontraktacija udesno.

Slično flumazenilu skromne vaskularne efekte i uticaj na FE kontrakciju pokazao je i ZnCl<sub>2</sub>, koji je ovdje testiran kao potencijalni antagonist vaskularnim efektima PAM-ova, jer je ranije utvrđeno da Zn<sup>2+</sup> joni ispoljavaju nekompetitivnu antagonističku aktivnost na GABA<sub>A</sub>R (Carver i sar, 2016, Ghit i sar., 2021).

## **5.8 Antagonistički uticaj specifičnih antagonista na vaskularne efekte PAM-ova GABA<sub>A</sub>R**

Galindo i sar. (2001) su relaksacijske efekte diazepama na izolovanoj pacovskoj aorti okarakterisali kao nezavisne od aktivacije GABA<sub>A</sub>R i TSPO, s obzirom da relaksacije FE-prekontrahovanih preparata nisu bile antagonizovane u prisustvu flumazenila i PK11195.

Rezultati ove studije ukazuju da su relaksacije dobijene pri nižim koncentracijama diazepama ( $10^{-7}$  M i  $3 \times 10^{-7}$  M) značajno smanjene u prisustvu antagonista, ali ni bikukulin ni PK11195 nisu značajno pomjerali krivu odnosa koncentracija-odgovor udesno ili smanjili maksimalni efekat diazepama.

Ranije sugerisano angažovanje drugih ciljnih supstrata, i/ili promjena kvaliteta interakcije diazepama sa primarnim vaskularnim veznim mjestom(ima) može djelimično objasniti činjenicu da bikukulin i PK11195 nisu uticali na vazodilataciju izazvanu diazepamom u koncentraciji od  $10^{-6}$  M ili više. Pored toga, treba uzeti u obzir i složene interakcije vaskularnih GABA<sub>A</sub>R sa pretpostavljenim ćelijskim putevima, uključenim u relaksaciju izazvanu BZD, kao što je povećanje sadržaja cikličnog AMP (Collado i sar., 1998; Galindo i sar., 2001), blokada priliva Ca<sup>2+</sup> jona (Chang i sar., 1994; Perusquia i sar., 1996) ili aktivacija K<sup>+</sup> kanala (Jacob i White, 2000; Klockgether-Radke i sar., 2005). Na moguće interakcije između vaskularnih GABA<sub>A</sub>R i TSPO ukazuju slični profili vaskularne aktivnosti PAM-ova i PK11195. Pretpostavljamo da različiti ćelijski putevi, koji vode ka relaksaciji glatko-mišićne ćelije, mogu biti posljedica aktivacije nekoliko vaskularnih veznih ("target") mjesta, od kojih su vaskularni GABA<sub>A</sub>R primarni za ispitivane PAM-ove.

Jedan od najvažnijih nalaza ove studije jeste antagonistički uticaj flumazenila na vazodilatacijske efekte midazolama i MP-III-058. Funkcionalnim testovima na kupatilu sa izolovanim pacovskim aortama dokazano je da se vaskularna aktivnost testiranih PAM-ova ostvaruje modulacijom BZD veznog mjesta na vaskularnom GABA<sub>A</sub>R. Ovu tvrdnju potkrepljuju nalazi imunohistohemijske analize, s obzirom da identifikovane  $\alpha$  i  $\gamma 2$  podjedinice formiraju vezno mjesto BZD.

S druge strane, interesantan i neočekivan nalaz vazoaktivnosti liganda XLi-093, pojačao je ranije iznjete tvrdnje o drugačijim efektima modulacije vaskularnih GABA<sub>A</sub>R. Naime, ovaj bivalentni ligand sposoban je da dozno-zavisno i potpuno inhibira elektrofiziološke struje stimulisane diazepamom kod GABA<sub>A</sub>R koji sadrže  $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ , dok je jedva uticao na stimulaciju indukovanu diazepamom drugih testiranih podtipova GABA<sub>A</sub>R (Li i sar., 2003, Clayton i sar., 2015). Razumno je očekivati da, ako su uočeni vazodilatacijski efekti  $\alpha 5$ - selektivnih PAM-ova (poput MP-III-058) izazvani pozitivnom modulacijom fluksa Cl<sup>-</sup> jona indukovano GABA-om preko  $\alpha 5/\gamma 2$  mjesta,



onda bi XLi-093, kao  $\alpha 5$ - selektivan antagonista, trebao da potisne takve relaksacijske efekte. Međutim, u testovima za ispitivanje relaksacijskih efekata MP-III-058 u prisustvu XLi-093, nije zabilježen antagonistički uticaj. Naprotiv, XLi-093 ne samo da nije smanjio efekte MP-III-058, već je pokazao i značajnu vazoaktivnost, uporedivu sa MP-III-058. U stvari, procenat relaksacije postignut sa XLi-093 sam po sebi vjerovatno bi bio veći od onog ostvarenog sa MP-III-058, ali zbog izuzetno loše rastvorljivosti ovog dvovalentnog liganda, nije bilo moguće postići koncentracije veće od  $10^{-6}$  M u uslovima kupatila. Slično diazepamu i MP-III-058, ligand XLi-093 ispoljio je dozno-zavisne supresivne efekte na FE kontrakciju. Naime, kada je primjenjen u nižoj koncentraciji ( $10^{-7}$  M), ligand je izazvao značajno pomijeranje udesno na FE krivoj odnosa koncentracija-odgovor, pokazujući na taj način kompetitivni karakter, dok je u deset puta većoj koncentraciji ( $10^{-6}$  M) ispoljio nekompetitivnu prirodu interakcije sa signalnim putevima  $\alpha 1$ -adrenergičke aktivacije.

S obzirom da u prisustvu XLi-093 nije došlo do promjene u vazodilatacijskim efektima MP-III-058, pretpostavljamo da oba liganda ispoljavaju svoju vazoaktivnost kroz različita mjesta vezivanja na vaskularnim  $GABA_A$ R, što omogućava svakom od njih da slobodno ispolji svoj odgovarajući efekat u prisustvu drugog. Stoga je vjerovatno da XLi-093 djeluje kao pozitivan modulator vaskularnih  $GABA_A$ R koji sadrže  $\alpha 5$  podjedinicu, za razliku od centralnih  $\alpha 5\beta 3\gamma 2$  receptora gdje djeluje kao tihi, neutralni modulator (SAM).

## 6 Zaključak

Na osnovu ispitivanja ekspresije  $\alpha$  podjedinica GABA<sub>A</sub>R u torakalnoj aorti pacova, te ispitivanja vaskularne aktivnosti neselektivnih i selektivnih PAM-ova BZD mjesta vezivanja GABA<sub>A</sub>R na izolovanoj pacovskoj aorti, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Utvrđena je ekspresija iRNK za podjedinice  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  i  $\alpha 5$  GABA<sub>A</sub>R u homogenatu pacovske aorte, te ekspresija proteina  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  i  $\gamma 2$  podjedinice na glatko-mišićnom sloju pacovske aorte. U ispitivanim uzorcima tkiva nije utvrđena ekspresija iRNK, niti proteina  $\alpha 6$  podjedinice.
2. GABA nije pokazala vaskularnu aktivnost na izolovanim preparatima pacovske aorte.
3. Neselektivni PAM-ovi (diazepam, midazolam, SH-I-048A) ispoljili su značajnu vaskularnu aktivnost, i to: relaksacije FE- prekontrahovanih preparata (oko 70-90%) i KCl-prekontrahovanih preparata (oko 50-60%), te smanjenje FE kontrakcije (na nekompetitivan način u koncentraciji  $10^{-5}$  M).
4. Zolpidem, kao  $\alpha 1$ - selektivan PAM, nije pokazao značajnu vaskularnu aktivnost na izolovanim preparatima pacovske aorte (osim vazodilatacijskog efekta na KCl-prekontrahovanim preparatima).
5. Ostali ( $\alpha 4$ -,  $\alpha 5$ - i  $\alpha 6$ ) selektivni PAM-ovi ispoljili su značajnu vaskularnu aktivnost, uporedivu sa efektima neselektivnih PAM-ova.
6. Za sve ispitivane PAM-ove vazodilatacijski efekti bili su izraženiji kod FE-prekontrahovanih u odnosu na KCl- prekontrahovane preparate, a značajniji procenti relaksacije za većinu PAM-ova ostvareni su pri koncentracijama  $10^{-5}$  M i većim.
7. Diazepam je, za razliku od većine drugih selektivnih PAM-ova, pri koncentraciji nižoj od terapijske ( $10^{-7}$  M) ispoljio kompetitivni, dok je pri većim, suprakliničkim koncentracijama ( $10^{-6}$  i  $10^{-5}$  M) ispoljio nekompetitivni supresivni efekat na FE krivoj "koncentracija-odgovor". Sličnu aktivnost na FE kontrakciju ispoljili su i  $\alpha 5$ - selektivni ligandi (MP-III-058 i XLi-093), te  $\alpha 6$ - selektivan DK-I-56-1.
8. Vazodilatacijski efekti diazepamata nisu smanjeni u prisustvu antagonista (bikukulina, odnosno PK11195), osim onih ostvareni pri nižim koncentracijama diazepamata ( $10^{-7}$  M i  $3 \times 10^{-7}$  M). Antagonista PK11195 ispoljio je vazodilatacijske efekte na FE-prekontrahovanim preparatima, uporedive sa efektima diazepamata, što nije bio slučaj sa antagonistima bikukulinom i flumazenilom.
9. Vazodilatacijski efekti midazolama i MP-III-058 značajno su smanjeni u prisustvu flumazenila. Primjenjen u koncentraciji od  $10^{-4}$  M, flumazenil je značajno smanjio relaksaciju izazvanu midazolamom i MP-III-058, ukazujući da je BZD vezno mjesto na vaskularnom GABA<sub>A</sub>R odgovorno za njihovu vazoaktivnost.

10. Za većinu ispitivanih PAM-ova izražena vaskularna aktivnost (uporediva sa aktivnošću prazosina) ostvarena je pri koncentracijama koje odgovaraju suprakliničkim koncentracijama BZD ( $10^{-5}$  M i veće). Ipak, ove koncentracije dostižne su u različitim hitnim stanjima kao što su hipertenzivne krize, predoziranje ili zloupotreba lijekova, gdje opisana vaskularna aktivnost može biti značajna.
11. Vaskularni efekti PAM-ova GABA<sub>A</sub>R receptora zahtjevaju dalja istraživanja sa većim translacijskim kapacitetom, u drugim vaskularnim tkivima sa većim doprinosom ukupnom vaskularnom otporu, kao i na animalnim modelima hipertenzije.

## ZNAČAJ REZULTATA

Dobijeni rezultati doprinose rasvjetljavanju strukture i efekata modulacije vaskularnih GABA<sub>A</sub>R, te ukazuju na značajne vaskularne efekte različitih PAM-ova BZD mjesta vezivanja GABA<sub>A</sub>R. Osim toga, rezultati potkrepljuju opravdanost primjene visoko-selektivnih liganada u fenotipizaciji receptora, te ohrabruju izvođenje daljih istraživanja na polju GABA-ergičke transmisije u perifernim krvnim sudovima.

## 7 Literatura

1. Akinci MK, Schofield PR. Widespread expression of GABA(A) receptor subunits in peripheral tissues. *Neurosci Res.* 1999;35(2):145-53. doi: 10.1016/s0168-0102(99)00078-4.
2. Alam S, Laughton DL, Walding A, Wolstenholme AJ. Human peripheral blood mononuclear cells express GABAA receptor subunits. *Mol Immunol.* 2006;43(9):1432-42. doi: 10.1016/j.molimm.2005.07.025.
3. Al-Kuraishy HM, Hussian NR, Al-Naimi MS, Al-Gareeb AI, Al-Mamorri F, Al-Buhadily AK. The potential role of pancreatic  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in diabetes mellitus: a critical reappraisal. *Int J Prev Med.* 2021;12:19. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM\_278\_19.
4. Awapara J, Landua AJ, Fuerst R, Seale B. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem.* 1950;187(1):35-9. PMID: 14794686.
5. Beck M, Brickley K, Wilkinson HL, Sharma S, Smith M, Chazot PL, Pollard S, Stephenson FA. Identification, molecular cloning, and characterization of a novel GABAA receptor-associated protein, GRIF-1. *J Biol Chem.* 2002;277(33):30079-90. doi: 10.1074/jbc.M200438200.
6. Bedford FK, Kittler JT, Muller E, Thomas P, Uren JM, Merlo D, Wisden W, Triller A, Smart TG, Moss SJ. GABA(A) receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nat Neurosci.* 2001;4(9):908-16. doi: 10.1038/nn0901-908.
7. Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci.* 2009;29(41):12757-63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3340-09.2009.
8. Bjurstöm H, Wang J, Ericsson I, Bengtsson M, Liu Y, Kumar-Mendu S, Issazadeh-Navikas S, Birnir B. GABA, a natural immunomodulator of T lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 2008;205(1-2):44-50. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.08.017.
9. Bollan KA, Baur R, Hales TG, Sigel E, Connolly CN. The promiscuous role of the epsilon subunit in GABAA receptor biogenesis. *Mol Cell Neurosci.* 2008;37(3):610-21. doi: 10.1016/j.mcn.2007.12.011.
10. Bootman MD. Calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(7):a011171. doi: 10.1101/cshperspect.a011171.
11. Brandes RP. A buttery taste to vascular biology: endothelial cells generate and release  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Circ Res.* 2016;119(5):577-9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309444.
12. Brandon NJ, Jovanovic JN, Colledge M, Kittler JT, Brandon JM, Scott JD, Moss SJ. A-kinase anchoring protein 79/150 facilitates the phosphorylation of GABA(A) receptors by cAMP-dependent protein kinase via selective interaction with receptor beta subunits. *Mol Cell Neurosci.* 2003;22(1):87-97. doi: 10.1016/s1044-7431(02)00017-9.
13. Brickley K, Smith MJ, Beck M, Stephenson FA. GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. *J Biol Chem.* 2005;280(15):14723-32. doi: 10.1074/jbc.M409095200.
14. Carver CM, Chuang SH, Reddy DS. Zinc selectively blocks neurosteroid-sensitive extrasynaptic  $\delta$ GABAA receptors in the hippocampus. *J Neurosci.* 2016;36(31):8070-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3393-15.2016.
15. Chang KS, Feng MG, Davis RF. Midazolam produces vasodilation by mixed endothelium-dependent and -independent mechanisms. *Anesth Analg.* 1994;78(4):710-7. doi: 10.1213/00000539-199404000-00017.

16. Charych EI, Yu W, Miralles CP, Serwanski DR, Li X, Rubio M, De Blas AL. The brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2, a protein involved in vesicular trafficking, interacts with the beta subunits of the GABA receptors. *J Neurochem.* 2004;90(1):173-89. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02481.x.
17. Clayton T, Poe MM, Rallapalli S, Biawat P, Savić MM, Rowlett JK, Gallos G, Emala CW, Kaczorowski CC, Stafford DC, Arnold LA, Cook JM. A review of the updated pharmacophore for the alpha 5 GABA(A) benzodiazepine receptor model. *Int J Med Chem.* 2015;2015:430248. doi: 10.1155/2015/430248.
18. Collado MC, Beleta J, Martinez E, Miralpeix M, Domènech T, Palacios JM, Hernández J. Functional and biochemical evidence for diazepam as a cyclic nucleotide phosphodiesterase type 4 inhibitor. *Br J Pharmacol.* 1998;123(6):1047-54. doi: 10.1038/sj.bjp.0701698.
19. Colussi G, Catena C, Darsiè D, Sechi LA. Benzodiazepines: an old class of new antihypertensive drugs? *Am J Hypertens.* 2018;31(4):402-404. doi: 10.1093/ajh/hpx205.
20. Colussi GL, Di Fabio A, Catena C, Chiuch A, Sechi LA. Involvement of endothelium-dependent and -independent mechanisms in midazolam-induced vasodilation. *Hypertens Res.* 2011 ;34(8):929-34. doi: 10.1038/hr.2011.62.
21. Denora N, Natile G. An Updated View of Translocator Protein (TSPO). *Int J Mol Sci* 2017;18(12):2640. [https://doi: 10.3390/ijms18122640](https://doi.org/10.3390/ijms18122640).
22. del Río JC, Araujo F, Ramos B, Ruano D, Vitorica J. Prevalence between different alpha subunits performing the benzodiazepine binding sites in native heterologous GABA(A) receptors containing the alpha2 subunit. *J Neurochem.* 2001;79(1):183-91. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00551.x.
23. Edvinsson L, Krause DN. Pharmacological characterization of GABA receptors mediating vasodilation of cerebral arteries in vitro. *Brain Res.* 1979;173(1):89-97.
24. El Idrissi A, Okeke E, Yan X, Sidime F, Neuwirth LS. Taurine regulation of blood pressure and vasoactivity. *Adv Exp Med Biol.* 2013;775:407-25. doi: 10.1007/978-1-4614-6130-2\_31.
25. Elgarf AA, Siebert DCB, Steudle F, Draxler A, Li G, Huang S, Cook JM, Ernst M, Scholze P. Different benzodiazepines bind with distinct binding modes to GABA<sub>A</sub> receptors. *ACS Chem Biol.* 2018;13(8):2033-2039. doi: 10.1021/acscchembio.8b00144.
26. Elliott KA, Hobbiger F.  $\gamma$  Aminobutyric acid; circulatory and respiratory effects in different species; re-investigation of the anti-strychnine action in mice. *J Physiol.* 1959;146(1):70-84. doi: 10.1113/jphysiol.1959.sp006178.
27. Everington EA, Gibbard AG, Swinny JD, Seifi M. Molecular characterization of GABA-A receptor subunit diversity within major peripheral organs and their plasticity in response to early life psychosocial stress. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:18. doi: 10.3389/fnmol.2018.00018.
28. Falcone JC, Granger HJ, Meininger GA. Enhanced myogenic activation in skeletal muscle arterioles from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1993;265(6 Pt 2):H1847-55. [https://doi: 10.1152/ajpheart.1993.265.6.H1847](https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.265.6.H1847).
29. Fang C, Deng L, Keller CA, Fukata M, Fukata Y, Chen G, Lüscher B. GODZ-mediated palmitoylation of GABA(A) receptors is required for normal assembly and function of GABAergic inhibitory synapses. *J Neurosci.* 2006;26(49):12758-68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4214-06.2006
30. Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(3):215-29. doi: 10.1038/nrn1625.

31. Farsi L, Keshavarz M, Soltani N. Relaxatory effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by same pathway in diabetic and normal rat mesenteric bed vessel. *Iran J Bas Med Sci.* 2011;14(1):94-8.
32. Faseleh Jahromi M, Shokryazdan P, Idrus Z, Ebrahimi R, Bashokouh F, Liang JB. Modulation of immune function in rats using oligosaccharides extracted from palm kernel cake. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2576921. doi: 10.1155/2017/2576921.
33. Forkuo GS, Guthrie ML, Yuan NY, Nieman AN, Kodali R, Jahan R, Stephen MR, Yocum GT, Treven M, Poe MM, Li G, Yu OB, Hartzler BD, Zahn NM, Ernst M, Emala CW, Stafford DC, Cook JM, Arnold LA. Development of GABAA receptor subtype-selective imidazobenzodiazepines as novel asthma treatments. *Mol Pharm.* 2016;13(6):2026-38. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00159.
34. Forkuo GS, Nieman AN, Kodali R, Zahn NM, Li G, Rashid Roni MS, Stephen MR, Harris TW, Jahan R, Guthrie ML, Yu OB, Fisher JL, Yocum GT, Emala CW, Steeber DA, Stafford DC, Cook JM, Arnold LA. A novel orally available asthma drug candidate that reduces smooth muscle constriction and inflammation by targeting GABA<sub>A</sub> receptors in the lung. *Mol Pharm.* 2018;15(5):1766-1777. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01013.
35. French JF, Rapoport RM, Matlib MA. Possible mechanism of benzodiazepine-induced relaxation of vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;14(3):405-11. doi: 10.1097/00005344-198909000-00008.
36. Fujiwara M, Muramatsu I.  $\gamma$  Aminobutyric acid receptor on vascular smooth muscle of dog cerebral arteries. *Br J Pharmacol.* 1975;55(4):561-2. doi: 10.1111/j.1476-5381.1975.tb07434.x.
37. Galindo A, Vargas ML, García Estañ J, Fuentes T, Hernández J. Synergistic interaction of diazepam with 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-elevating agents on rat aortic rings. *Eur J Pharmacol.* 2001;428(2):269-75. doi: 10.1016/s0014-2999(01)01335-8.
38. Gallos G, Yim P, Chang S, Zhang Y, Xu D, Cook JM, Gerthoffer WT, Emala CW Sr. Targeting the restricted  $\alpha$ -subunit repertoire of airway smooth muscle GABAA receptors augments airway smooth muscle relaxation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(2):L248-56. doi: 10.1152/ajplung.00131.2011.
39. Gallos G, Yocum GT, Siviski ME, Yim PD, Fu XW, Poe MM, Cook JM, Harrison N, Perez-Zoghbi J, Emala CW Sr. Selective targeting of the  $\alpha$ 5-subunit of GABAA receptors relaxes airway smooth muscle and inhibits cellular calcium handling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(9):L931-42. doi: 10.1152/ajplung.00107.2014.
40. Gao Y, Ye LH, Kishi H, Okagaki T, Samizo K, Nakamura A, Kohama K. Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction. *IUBMB Life.* 2001;51(6):337-44. doi: 10.1080/152165401753366087.
41. Garcia SR, Izzard AS, Heagerty AM, Bund SJ. Myogenic tone in coronary arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 1997;34(2):109-16. [https://doi: 10.1159/000159208](https://doi.org/10.1159/000159208).
42. Ghit A, Assal D, Al-Shami AS, Hussein DEE. GABA<sub>A</sub> receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *J Genet Eng Biotechnol.* 2021;19(1):123. doi: 10.1186/s43141-021-00224-0.
43. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology.* 11th edition, 2006. Elsevier Inc. Philadelphia.Pannsylvania.

44. Hamel E, Krause DN, Roberts E. Specific cerebrovascular localization of glutamate decarboxylase activity. *Brain Res.* 1981;223(1):199-204. doi: 10.1016/0006-8993(81)90824-6.
45. Hayakawa K, Kimura M, Kamata K. Mechanism underlying gamma-aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2002;438(1-2):107-13. doi: 10.1016/s0014-2999(02)01294-3. PMID: 11906718
46. Herring D, Huang R, Singh M, Dillon GH, Leidenheimer NJ. PKC modulation of GABAA receptor endocytosis and function is inhibited by mutation of a dileucine motif within the receptor beta 2 subunit. *Neuropharmacology.* 2005;48(2):181-94. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.09.015.
47. Hilf RJ, Dutzler R. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature.* 2008;452(7185):375-9. doi: 10.1038/nature06717.
48. Hong SJ, Damron DS, Murray PA. Benzodiazepines differentially inhibit phenylephrine-induced calcium oscillations in pulmonary artery smooth muscle cells. *Anesthesiology.* 1998;88(3):792-9. doi: 10.1097/00000542-199803000-00032.
49. Houston CM, Smart TG. CaMK-II modulation of GABA(A) receptors expressed in HEK293, NG108-15 and rat cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci.* 2006;24(9):2504-14. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05145.x.
50. Huang Q, He X, Ma C, Liu R, Yu S, Dayer CA, Wenger GR, McKernan R, Cook JM. Pharmacophore/receptor models for GABA(A)/BzR subtypes (alpha1beta3gamma2, alpha5beta3gamma2, and alpha6beta3gamma2) via a comprehensive ligand-mapping approach. *J Med Chem.* 2000;43(1):71-95. doi: 10.1021/jm990341r.
51. Hussain MB, Marshall I. Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 1997;122(5):849-58. doi: 10.1038/sj.bjp.0701461.
52. Inoue K, Shirai T, Ochiai H, Kasao M, Hayakawa K, Kimura M, Sansawa H. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57(3):490-5. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601555.
53. Jacob MK, White RE. Diazepam, gamma-aminobutyric acid, and progesterone open K(+) channels in myocytes from coronary arteries. *Eur J Pharmacol.* 2000;403(3):209-19. doi: 10.1016/s0014-2999(00)00598-7.
54. Jin L, Lipinski A, Conklin DJ. A simple method for normalization of aortic contractility. *J Vasc Res.* 2018;55(3):177-186. doi: 10.1159/000490245.
55. Jovanovic JN, Thomas P, Kittler JT, Smart TG, Moss SJ. Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *J Neurosci.* 2004;24(2):522-30. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3606-03.2004
56. Juvale IIA, Hassan Z, Has ATC. The emerging roles of  $\pi$  subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptors in different cancers. *Int J Med Sci.* 2021;18(16):3851-3860. doi: 10.7150/ijms.60928.
57. Kagota S, Morikawa K, Ishida H, Chimoto J, Maruyama-Fumoto K, Yamada S, Shinozuka K. Vasorelaxant effects of benzodiazepines, non-benzodiazepine sedative-hypnotics, and tandospirone on isolated rat arteries. *Eur J Pharmacol.* 2021;892:173744. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173744.
58. Kamran M, Bahrami A, Soltani N, Keshavarz M, Farsi L. GABA-induced vasorelaxation mediated by nitric oxide and GABAA receptor in non diabetic and streptozotocin-induced diabetic rat vessels. *Gen Physiol Biophys.* 2013;32(1):101-6. doi: 10.4149/gpb\_2013013.



59. Kanematsu T, Fujii M, Mizokami A, Kittler JT, Nabekura J, Moss SJ, Hirata M. Phospholipase C-related inactive protein is implicated in the constitutive internalization of GABAA receptors mediated by clathrin and AP2 adaptor complex. *J Neurochem.* 2007;101(4):898-905. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04399.x.
60. Keller CA, Yuan X, Panzanelli P, Martin ML, Alldred M, Sassoè-Pognetto M, Lüscher B. The gamma2 subunit of GABA(A) receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ. *J Neurosci.* 2004;24(26):5881-91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1037-04.2004.
61. Kharazmi F, Soltani N, Rezaei S, Keshavarz M, Farsi L (2015). Role of GABAB receptor and L-Arg in GABA-induced vasorelaxation in non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rat vessels. *Iran Biomed J.* 2015;19(2):91-5.
62. Kim DC. Malignant hyperthermia. *Korean J Anesthesiol.* 2012;63(5):391-401. doi: 10.4097/kjae.2012.63.5.391. Epub 2012 Nov 16.
63. Kitajima T, Kanbayashi T, Saito Y, Takahashi Y, Ogawa Y, Sugiyama T, Kaneko Y, Aizawa R, Shimizu T. Diazepam reduces both arterial blood pressure and muscle sympathetic nerve activity in human. *Neurosci Lett.* 2004;355(1-2):77-80. doi: 10.1016/j.neulet.2003.10.054.
64. Kittler JT, Arancibia-Carcamo IL, Moss SJ. Association of GRIP1 with a GABA(A) receptor associated protein suggests a role for GRIP1 at inhibitory synapses. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(8):1649-54. doi: 10.1016/j.bcp.2004.07.028.
65. Klockgether-Radke AP, Pawlowski P, Neumann P, Hellige G. Mechanisms involved in the relaxing effect of midazolam on coronary arteries. *Eur J Anaesthesiol.* 2005;22(2):135-9. doi: 10.1017/s0265021505000256.
66. Klotz U, Antonin KH, Bieck PR. Pharmacokinetics and plasma binding of diazepam in man, dog, rabbit, guinea pig and rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1976;199(1):67-73.
67. Knutson DE, Kodali R, Divović B, Treven M, Stephen MR, Zahn NM, Dobričić V, Huber AT, Meirelles MA, Verma RS, Wimmer L, Witzigmann C, Arnold LA, Chiou LC, Ernst M, Mihovilovic MD, Savić MM, Sieghart W, Cook JM. Design and synthesis of novel deuterated ligands functionally selective for the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor (GABA<sub>A</sub>R)  $\alpha 6$  subtype with improved metabolic stability and enhanced bioavailability. *J Med Chem.* 2018;61(6):2422-2446. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01664.
68. Korol SV, Jin Z, Babateen O, Birnir B. GLP-1 and exendin-4 transiently enhance GABAA receptor-mediated synaptic and tonic currents in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Diabetes.* 2015;64(1):79-89. doi: 10.2337/db14-0668.
69. Korol SV, Jin Z, Jin Y, Bhandage AK, Tengholm A, Gandasi NR, Barg S, Espes D, Carlsson PO, Laver D, Birnir B. Functional characterization of native, high-affinity GABA<sub>A</sub> receptors in human pancreatic  $\beta$  cells. *EBioMedicine.* 2018;30:273-282. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.014.
70. Korpi ER, Gründer G, Lüddens H. Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol.* 2002;67(2):113-59. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00013-8.
71. Korpi ER, Kuner T, Kristo P, Köhler M, Herb A, Lüddens H, Seeburg PH. Small N-terminal deletion by splicing in cerebellar alpha 6 subunit abolishes GABAA receptor function. *J Neurochem.* 1994 ;63(3):1167-70. doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.63031167.x.
72. Krause DN, Wong E, Degener P, Roberts E. GABA receptors in bovine cerebral blood vessels: binding studies with [3H]muscimol. *Brain Res.* 1980;185(1):51-7. doi: 10.1016/0006-8993(80)90669-1.
73. Kuo IY, Ehrlich BE. Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(2):a006023. doi: 10.1101/cshperspect.a006023.

74. health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012;21(4):362-8. doi: 10.1097/MNH.0b013e32835422ad.
75. Kuro-o, M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15,27-44. doi.org/10.1038/s41581-018-0078-3.
76. Leil TA, Chen ZW, Chang CS, Olsen RW. GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *J Neurosci.* 2004;24(50):11429-38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3355-04.2004.
77. Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramee AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivasay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature.* 2007;445(7124):168-76. doi: 10.1038/nature05453.
78. Lijekovi koji imaju dozvolu za promet na tržištu BiH (2023, Septembar). Agencija za lijekove i medicinska sredstva Bosne i Hercegovine. Preuzeto 29.septembra 2023., sa <http://>
79. Li X, Cao H, Zhang C, Furtmueller R, Fuchs K, Huck S, Sieghart W, Deschamps J, Cook JM. 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(26):5567-70. doi: 10.1021/jm034164c.
80. Loeblich S, Bähring R, Katsuno T, Tsukita S, Kneussel M. Activated radixin is essential for GABAA receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton. *EMBO J.* 2006;25(5):987-99. doi: 10.1038/sj.emboj.7600995.
81. Löscher W. GABA in plasma and cerebrospinal fluid of different species. Effects of gamma-acetylenic GABA, gamma-vinyl GABA and sodium valproate. *J Neurochem.* 1979;32(5):1587-91. doi: 10.1111/j.1471-4159.1979.tb11104.x.
82. Luu T, Gage PW, Tierney ML. GABA increases both the conductance and mean open time of recombinant GABAA channels co-expressed with GABARAP. *J Biol Chem.* 2006;281(47):35699-708. doi: 10.1074/jbc.M605590200.
83. Ma X, Sun Q, Sun X, Chen D, Wei C, Yu X, Liu C, Li Y, Li J. Activation of GABA<sub>A</sub> receptors in colon epithelium exacerbates acute colitis. *Front Immunol.* 2018;9:987. doi: 10.3389/fimmu.2018.00987.
84. MarketWatch. GABA market size. Regions will have the highest revenue, which will emerge in importance in the market 2026. 2021. Available online: <https://www.marketwatch.com/press-release/gaba-market-size-2021-regions-will-have-the-highest-revenue-which-will-emerge-in-importance-in-the-market-2026-2021-04-25> (accessed on 10 May 2021).

85. Martinez-Lemus LA. The dynamic structure of arterioles. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110(1):5-11. doi: 10.1111/j.1742 7843.2011.00813.x.
86. McDonald BJ, Amato A, Connolly CN, Benke D, Moss SJ, Smart TG. Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat Neurosci*. 1998;1(1):23-8. doi: 10.1038/223.
87. McDonald BJ, Moss SJ. Differential phosphorylation of intracellular domains of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunits by calcium/calmodulin type 2-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1994 ;269(27):18111-7.
88. Mele M, Costa RO, Duarte CB. Alterations in GABAA-Receptor Trafficking and Synaptic Dysfunction in Brain Disorders. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:77. doi: 10.3389/fncel.2019.00077.
89. Mendu SK, Bhandage A, Jin Z, Birnir B. Different subtypes of GABA-A receptors are expressed in human, mouse and rat T lymphocytes. *PLoS One*. 2012;7(8):e42959. doi: 10.1371/journal.pone.0042959.
90. Minuk GY, Zhang M, Gong Y, Minuk L, Dienes H, Pettigrew N, Kew M, Lipschitz J, Sun D. Decreased hepatocyte membrane potential differences and GABAA-beta3 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007;45(3):735-45. doi: 10.1002/hep.21562. PMID: 17326191.
91. Mizuta K, Xu D, Pan Y, Comas G, Sonett JR, Zhang Y, Panettieri RA Jr, Yang J, Emala CW Sr. GABAA receptors are expressed and facilitate relaxation in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(6):L1206-16. doi: 10.1152/ajplung.00287.2007.
92. Monasterolo LA, Trumper L, Elías MM. Reversal of benzodiazepine-induced renal vasculature relaxation with flumazenil. *Eur J Pharmacol*. 2002;449(1-2):155-8. doi: 10.1016/s0014-2999(02)01942-8.
93. Moriyama T, Tsuneyoshi I, Kanmura Y. Effects of a novel benzodiazepine derivative, JM-1232(-), on human gastroepiploic artery in vitro. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2011;25(1):72-7. doi: 10.1053/j.jvca.2010.03.013.
94. Mortensen M, Smart TG. Extrasynaptic alphabeta subunit GABAA receptors on rat hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol*. 2006;577(Pt 3):841-56. doi: 10.1113/jphysiol.2006.117952.
95. Ngo DH, Vo TS. An updated review on pharmaceutical properties of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Molecules*. 2019;24(15):2678. doi: 10.3390/molecules24152678.
96. Nusser Z, Sieghart W, Mody I. Differential regulation of synaptic GABAA receptors by cAMP-dependent protein kinase in mouse cerebellar and olfactory bulb neurones. *J Physiol*. 1999;521 Pt 2(Pt 2):421-35. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.00421.x.
97. Obradović ALj, Joksimović S, Poe MM, Ramerstorfer J, Varagic Z, Namjoshi O, Batinić B, Radulović T, Marković B, Roth BL, Sieghart W, Cook JM, Savić MM. Sh-I-048A, an in vitro non-selective super-agonist at the benzodiazepine site of GABAA receptors: the approximated activation of receptor subtypes may explain behavioral effects. *Brain Res*. 2014;1554:36-48. doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.036.
98. Oketch-Rabah HA, Madden EF, Roe AL, Betz JM. United States pharmacopeia (USP) safety review of  $\gamma$  -aminobutyric acid (GABA). *Nutrients*. 2021;13(8):2742. doi: 10.3390/nu13082742.
99. Olsen RW, Sieghart W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):1418.doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.

100. 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(3):243-60. doi: 10.1124/pr.108.00505.
101. O'Sullivan GA, Kneussel M, Elazar Z, Betz H. GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *Eur J Neurosci.* 2005;22(10):2644-8. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04448.x.
102. Park SE, Sohn JT, Kim C, Chang KC, Shin IW, Park KE, Lee HK, Chung YK. Diazepam attenuates phenylephrine-induced contractions in rat aorta. *Anesth Analg.* 2006;102(3):682-9. doi: 10.1213/01.ane.0000196521.62806.43.
103. Perusquía M, Hernández R, Morales MA, Campos MG, Villalón CM. Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol.* 1996;27(1):181-5. doi: 10.1016/0306-3623(95)00091-7.
104. 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(4):815-50. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00442-5.
105. Prevot TD, Li G, Vidojevic A, Misquitta KA, Fee C, Santrac A, Knutson DE, Stephen MR, Kodali R, Zahn NM, Arnold LA, Scholze P, Fisher JL, Marković BD, Banasr M, Cook JM, Savic M, Sibille E. Novel benzodiazepine-like ligands with various anxiolytic, antidepressant, or pro-cognitive profiles. *Mol Neuropsychiatry.* 2019;5(2):84-97. doi: 10.1159/000496086.
106. Qi X, Xu J, Wang F, Xiao J. Translocator protein (18 kDa): a promising therapeutic target and diagnostic tool for cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:162934. doi: 10.1155/2012/162934.
107. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Pharmacology 5th edition.* data status; Beograd; 2005.
108. Rathenberg J, Kittler JT, Moss SJ. Palmitoylation regulates the clustering and cell surface stability of GABAA receptors. *Mol Cell Neurosci.* 2004;26(2):251-7. doi: 10.1016/j.mcn.2004.01.012.
109. Ríos JL, Schinella GR, Moragrega I. Phenolics as GABAA Receptor Ligands: An Updated Review. *Molecules.* 2022;27(6):1770. doi: 10.3390/molecules27061770.
110. Rizvić E, Janković G, Savić MM. Elucidation of the profound antagonism of contractile action of phenylephrine in rat aorta effected by an atypical sympathomimetic decongestant. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2017;21(4):385-395. doi: 10.4196/kjpp.2017.21.4.385.
111. Roberts E, Frankel S. Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem.* 1950;187(1):55-63. PMID: 14794689.
112. Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9):685-97. doi: 10.1038/nrd3502.
113. 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. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121429.
114. Samain E, Clichet A, Bouillier H, Chamiot-Clerc P, Safar M, Marty J, Renaud JF. Propofol differently alters vascular reactivity in normotensive and hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29(11):1015-7. [https://doi: 10.1046/j.1440-1681.2002.03760.x](https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03760.x).
115. Savić MM, Majumder S, Huang S, Edwankar RV, Furtmüller R, Joksimović S, Clayton T Sr, Ramerstorfer J, Milinković MM, Roth BL, Sieghart W, Cook JM. Novel positive allosteric modulators of GABAA receptors: do subtle differences in activity at alpha1 plus alpha5 versus

- alpha2 plus alpha3 subunits account for dissimilarities in behavioral effects in rats? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(2):376-86. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.01.004.
116. Schinzari F, Tesauro M, Cardillo C. Vascular hyperpolarization in human physiology and cardiovascular risk conditions and disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(1):124-137. doi: 10.1111/apha.12630.
  117. Sen S, Roy S, Bandyopadhyay G, Scott B, Xiao D, Ramadoss S, Mahata SK, Chaudhuri G.  $\gamma$ -Aminobutyric acid is synthesized and released by the endothelium: potential implications. *Circ Res*. 2016;119(5):621-34. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308645.
  118. Serwanski DR, Miralles CP, Christie SB, Mehta AK, Li X, De Blas AL. Synaptic and nonsynaptic localization of GABAA receptors containing the alpha5 subunit in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2006;499(3):458-70. doi: 10.1002/cne.21115.
  119. Shen X, Xu KF, Fan Q, Pacheco-Rodriguez G, Moss J, Vaughan M. Association of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 (BIG2) with recycling endosomes during transferrin uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(8):2635-40. doi: 10.1073/pnas.0510599103.
  120. Shimada M, Hasegawa T, Nishimura C, Kan H, Kanno T, Nakamura T, Matsubayashi T. Anti-hypertensive effect of gamma-aminobutyric acid (GABA)-rich *Chlorella* on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clin Exp Hypertens*. 2009;31(4):342-54. doi: 10.1080/10641960902977908.
  121. Siebert DCB, Bampali K, Puthenkalam R, Varagic Z, Sarto-Jackson I, Scholze P, Sieghart W, Mihovilovic MD, Schnürch M, Ernst M. Engineered flumazenil recognition site provides mechanistic insight governing benzodiazepine modulation in GABAA receptors. *ACS Chem Biol*. 2018;13(8):2040-2047. doi: 10.1021/acscchembio.8b00145.
  122. Sieghart W. Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. *Adv Pharmacol*. 2015;72:53-96. doi: 10.1016/bs.apha.2014.10.002.
  123. Sieghart W, Savić M.M. International union of basic and clinical pharmacology. CVI: GABAA receptor subtype- and function-selective ligands: key issues in translation to humans. *Pharmacol. Rev*. 2018;70, 836–878. doi:10.1124/pr.117.014449.
  124. Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem*. 2002;2(8):795-816. doi: 10.2174/1568026023393507.
  125. Sigel E, Stephenson FA, Mamalaki C, Barnard EA. A gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex. *J Biol Chem*. 1983;258(11):6965-71. PMID: 6304068.
  126. Sperk G, Kirchmair E, Bakker J, Sieghart W, Drexel M, Kondova I. Immunohistochemical distribution of 10 GABAA receptor subunits in the forebrain of the rhesus monkey *Macaca mulatta*. *J Comp Neurol*. 2020;528(15):2551-2568. doi: 10.1002/cne.24910.
  127. Stamenić TT, Poe MM, Rehman S, Santrač A, Divović B, Scholze P, Ernst M, Cook JM, Savić MM. Ester to amide substitution improves selectivity, efficacy and kinetic behavior of a benzodiazepine positive modulator of GABA<sub>A</sub> receptors containing the  $\alpha$ 5 subunit. *Eur J Pharmacol*. 2016;791:433-443. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.09.016.
  128. Sweeney HL, Hammers DW. Muscle contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(2):a023200. doi: 10.1101/cshperspect.a023200.
  129. Takahashi H, Sumi M, Koshino F. Effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) on normotensive or hypertensive rats and men. *Jpn J Physiol*. 1961;11:89-95. doi: 10.2170/jjphysiol.11.89.

130. Takano K, Yatabe MS, Abe A, Suzuki Y, Sanada H, Watanabe T, Kimura J, Yatabe J. Characteristic expressions of GABA receptors and GABA producing/transporting molecules in rat kidney. *PLoS One*. 2014;9(9):e105835. doi: 10.1371/journal.pone.0105835.
131. Tanaka C.  $\gamma$ -Aminobutyric acid in peripheral tissues. *Life Sci*. 1985;37(24):2221-35. doi: 10.1016/0024-3205(85)90013-x.
132. Terunuma M, Jang IS, Ha SH, Kittler JT, Kanematsu T, Jovanovic JN, Nakayama KI, Akaike N, Ryu SH, Moss SJ, Hirata M. GABAA receptor phospho-dependent modulation is regulated by phospholipase C-related inactive protein type 1, a novel protein phosphatase 1 anchoring protein. *J Neurosci*. 2004;24(32):7074-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1323-04.2004.
133. Tretter V, Moss SJ. GABA(A) receptor dynamics and constructing GABAergic synapses. *Front Mol Neurosci*. 2008;1:7. doi: 10.3389/neuro.02.007.2008. PMID: 18946540;
134. Tyagi N, Lominadze D, Gillespie W, Moshal KS, Sen U, Rosenberger DS, Steed M, Tyagi SC. Differential expression of gamma-aminobutyric acid receptor A (GABA(A)) and effects of homocysteine. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(12):1777-84. doi: 10.1515/CCLM.2007.342.
135. Upchurch WJ, Iaizzo PA. In vitro contractile studies within isolated tissue baths: Translational research from Visible Heart Laboratories. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2022;247(7):584-597. doi: 10.1177/15353702211070535.
136. Varagić VM, Milošević MP. *Farmakologija, dvadeseto izdanje*. Elit medica; 2005. Beograd.
137. Vasović D, Divović B, Treven M, Knutson DE, Steudle F, Scholze P, Obradović A, Fabjan J, Brković B, Sieghart W, Ernst M, Cook JM, Savić MM. Trigeminal neuropathic pain development and maintenance in rats are suppressed by a positive modulator of  $\alpha 6$  GABAA receptors. *Eur J Pain*. 2019;23(5):973-984. doi: 10.1002/ejp.1365.
138. Wang J, Liu S, Haditsch U, Tu W, Cochrane K, Ahmadian G, Tran L, Paw J, Wang Y, Mansuy I, Salter MM, Lu YM. Interaction of calcineurin and type-A GABA receptor gamma 2 subunits produces long-term depression at CA1 inhibitory synapses. *J Neurosci*. 2003;23(3):826-36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-03-00826.2003.
139. Watanabe M, Maemura K, Oki K, Shiraishi N, Shibayama Y, Katsu K. Gamma-aminobutyric acid (GABA) and cell proliferation: focus on cancer cells. *Histol Histopathol*. 2006;21(10):1135-41. doi: 10.14670/HH-21.1135.
140. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*. 2003;27(1-4):201-6. doi: 10.1152/advan.00025.2003.
141. Yamaguchi S, Kanmura Y, Yoshimura N. Effects of midazolam on contractions in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *Anesth Analg*. 1997;84(1):199-205. doi: 10.1097/00000539-199701000-00036.
142. Yamakoshi J, Fukuda S, Satoh T, Tsuji R, Saito M, Obata A, Matsuyama A, Kikuchi M, Kawasaki T. Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71(1):165-73. doi: 10.1271/bbb.60424.
143. Yilmaz S, Pekdemir M, Tural U, Uygun M. Comparison of alprazolam versus captopril in high blood pressure: a randomized controlled trial. *Blood Press*. 2011;20(4):239-43. doi: 10.3109/08037051.2011.553934.
144. Yim PD, Gallos G, Lee-Kong SA, Dan W, Wu AD, Xu D, Berkowitz DE, Emala CW. Novel expression of GABAA receptors on resistance arteries that modulate myogenic tone. *J Vasc Res*. 2020;57(3):113-125. doi: 10.1159/000505456.

145. Yocum GT, Gallos G, Zhang Y, Jahan R, Stephen MR, Varagic Z, Puthenkalam R, Ernst M, Cook JM, Emala CW. Targeting the  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor  $\alpha 4$  subunit in airway smooth muscle to alleviate bronchoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(4):546-53. doi: 10.1165/rcmb.2015-0176OC.
146. Yocum GT, Perez-Zoghbi JF, Danielsson J, Kuforiji AS, Zhang Y, Li G, Rashid Roni MS, Kodali R, Stafford DC, Arnold LA, Cook JM, Emala CW Sr. A novel GABA<sub>A</sub> receptor ligand MIDD0301 with limited blood-brain barrier penetration relaxes airway smooth muscle ex vivo and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019;316(2):L385-L390. doi: 10.1152/ajplung.00356.2018.

## Biografija

Milica Gajić Bojić rođena je 26.11.1989. godine u Banjaluci. Osnovnu školu "Đura Jakšić" završila je 2004. godine u Banjaluci, sa odličnim uspjehom, a Srednju medicinsku školu - smjer farmaceutski tehničar, završila je u Banjaluci, 2008. godine sa odličnim uspjehom. Studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjaluci, odsjek farmacija, upisala je školske 2008/2009. godine, a diplomirala je 15. jula 2013. godine sa prosječnom ocjenom 9,53. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvjete i kulture Republike Srpske, a po završetku studija proglašena je za studenta genetacije na odsjeku farmacija, kao i za najboljeg studenta na Medicinskom fakultetu u Banjaluci za akademsku 2012/2013 godinu. Dobitnik je Zlatne plakete za postignut uspjeh i završetak studija u roku, od strane Univerziteta u Banjaluci. Nakon obavljenog pripravničkog staža, položila je stručni ispit i stekla licencu za obavljanje djelatnosti magistra farmacije. Od februara 2014. godine bila je zaposlena u Fondu zdravstvenog osiguranja Republike Srpske (FZO RS), na poslovima višeg stručnog saradnika za kontrolu troškova lijekova, u okviru Sektora za zdravstvo i kontrolu. Akademske 2014/2015. godine upisala je doktorske studije na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu - modul Farmakologija, te položila sve ispite predviđene programom studija. U novembru 2018. godine imenovana je za rukovodioca Odjeljenja za kliničku farmakologiju FZO RS, gdje je radila na poslovima centralizovane tenderske nabavke lijekova za bolnice i domove zdravlja u Republici Srpskoj. U periodu od 2018-2020. bila je član Komisije za Listu citotoksičnih, bioloških i pratećih lijekova FZO RS, kao i član Radne grupe Ministarstva zdravlja i socijalne zaštite Republike Srpske za reviziju svih važećih listi lijekova u Republici Srpskoj.

Od marta 2019. godine zaposlena je u Centru za biomedicinska istraživanja, u okviru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjaluci, na poslovima stručnog saradnika u Laboratoriji za farmakologiju i toksikologiju, gdje je angažovana u izvođenju farmakoloških ispitivanja na izolovanim tkivima i organima. U septembru 2023. godine izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Farmakologija i toksikologija i zaposlena je na Katedri za farmakologiju sa toksikologijom Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjaluci, gdje učestvuje u izvođenju praktične nastave.

Doktorsku disertaciju pod nazivom "Vaskularna aktivnost pozitivnih alosternih modulatora GABA<sub>A</sub> receptora kod pacova" odbranila je 01.02.2024. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Do sada je bila ko-autor 7 naučnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima i 16 saopštenja sa međunarodnih i domaćih skupova. Bila je više puta dobitnik nagrade za najbolju poster prezentaciju koja se dodjeljuje na prestižnim međunarodnim naučnim skupovima, te dobitnik nagrade za mlade istraživače u oblasti biomedicinskih nauka, koju dodjeljuje Internacionalna akademija za kardiovaskularne nauke. U septembru 2023. godine učestvovala je na skupu Sjeverno Američke sekcije pomentute akademije, te na Kongesu farmakologa Srbije sa međunarodnim učešćem, gdje je u svojstvu predavača predstavila rezultate istraživanja opisane u ovoj disertaciji. Udata je i majka je jednog djeteta.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Милица Гајић Бојић

Број индекса: 28/14

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Васкуларна активност позитивних алостерних модулятора ГАБА<sub>A</sub> рецептора код пацова

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

**Потпис аутора**

У Београду, 01.02.2024.

---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Милица Гајић Бојић

Број индекса: 28/14

Студијски програм: Докторске академске студије, модул Фармакологија

Наслов рада: Васкуларна активност позитивних алостерних модулатора ГАБА<sub>A</sub> рецептора код пацова

Ментор: проф. др Мирослав Савић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, 01.02.2024.

---

## Изјава о коришћењу

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

Васкуларна активност позитивних алостерних модулятора ГАБА<sub>A</sub> рецептора код пацова

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 01.02.2024.

---

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.