

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Katarina D. Nastić

**VORTIOKSETIN U INFLAMATORNIM
MODELIMA BOLA: MEHANIZAM
DEJSTVA, UTICAJ NA KOGNITIVNE
SPOSObNOSTI I OKSIDO-REDUKCIONI
STATUS KARDIOMIOCITA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Katarina D. Nastić

**VORTIOXETINE IN INFLAMMATORY
PAIN MODELS: MECHANISM OF ACTION,
EFFECT ON COGNITIVE ABILITIES AND
REDOX STATUS OF CARDIOMYOCYTES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

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

MENTOR:

Dr Radica Stepanović-Petrović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Maja Tomić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Uroš Pecikoza, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Sonja Vučković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Miroslav Dinić, viši naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo – Univerzitet u Beogradu

U Beogradu, _____

Vortioksetin u inflamatornim modelima bola: mehanizam dejstva, uticaj na kognitivne sposobnosti i oksido-redukциони status kardiomiocita

SAŽETAK

Bol je kompleksno, multidimenzionalno iskustvo koje oblikuju biološki, psihološki i socijalni faktori. Među najčešćim bolnim stanjima izdvajaju se inflamatorni bolovi, uključujući osteoartritis.

Ciljevi ovog rada su bili ispitivanje efekata i mehanizama dejstva vortioksetina u modelima inflamatornog bola, kao i uticaja leka na kognitivne performanse, opštu dobrobit, redoks status i histološke promene kardiomiocita kod mužjaka i ženki pacova sa osteoartritisom.

Efekti vortioksetina su ispitani u modelima akutnog inflamatornog trigeminalnog, visceralnog i somatskog bola, kao i u modelu osteoartritisa. Mehanizam dejstva vortioksetina u modelu trigeminalnog bola je ispitivan primenom odgovarajućih receptorskih antagonista. U modelu osteoartritisa, praćen je uticaj leka na molekularne markere bolne preosetljivosti, parametre oksidativnog stresa u kolenu pacova, kognitivne performanse i opštu dobrobit životinja, kao i na parametre redoks statusa i histološke promene kardiomiocita.

Vortioksetin je ostvario značajne efekte u svim ispitivanim modelima bola. U modelu trigeminalnog bola je pokazano učešće serotonergičkih 5-HT_{1B/1D}, α_2/β_1 adrenergičkih, muskarinskih, α_7 nikotinskih, kanabinoidnih CB₁/CB₂, adenozijskih A₁ receptora. Vortioksetin je smanjio ekspresiju *Ngf* i nivo markera oksidativnog stresa u kolenu pacova oba pola; smanjio je ekspresiju iRNK za markere neuroinflamacije u spinalnim ganglijima i kičmenoj moždini mužjaka, ali ne i ženki pacova. Dodatno, vortioksetin je poboljšao kognitivne performanse životinja sa osteoartritisom bez štetnog uticaja na opštu dobrobit životinja i redoks status i histološke promene kardiomiocita.

Rezultati ukazuju da bi vortioksetin mogao biti efikasan u terapiji inflamatornih bolnih stanja, sa korisnim efektima na kognitivnu funkciju.

Ključne reči: vortioksetin, inflamatorni bol, osteoartritis, duloksetin, nervni faktor rasta, kognitivna disfunkcija, kardiovaskularna bezbednost, oksidativni stres, polno-specifične razlike

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

Vortioxetine in inflammatory pain models: mechanism of action, effect on cognitive abilities and redox status of cardiomyocytes

ABSTRACT

Pain is a complex, multidimensional experience shaped by biological, psychological, and social factors. Among the most prevalent pain conditions are inflammatory pain conditions, including osteoarthritis.

The aim of this study was to investigate the effects and mechanisms of action of vortioxetine in models of inflammatory pain, as well as the drug's impact on cognitive performance, general well-being, redox status, and histological changes in cardiomyocytes in male and female rats with osteoarthritis.

Vortioxetine's effects were evaluated in models of acute inflammatory trigeminal, visceral, and somatic pain, as well as in a model of osteoarthritis. In the trigeminal pain model, its mechanism of action was assessed using selective receptor antagonists. In the osteoarthritis model, the drug's influence was monitored on molecular markers of pain hypersensitivity, oxidative stress parameters in the rat knee, cognitive performance, general well-being, as well as on redox status and histological alterations in cardiomyocytes.

Vortioxetine achieved significant effects in all pain models tested. In the trigeminal pain model, involvement of serotonergic 5-HT_{1B/1D}, α_2/β_1 -adrenergic, muscarinic, α_7 -nicotinic, cannabinoid CB₁/CB₂, and adenosine A₁ receptors was demonstrated. Vortioxetine reduced *Ngf* expression and oxidative stress markers in the knees of both sexes; it also decreased mRNA expression of neuroinflammatory markers in the spinal ganglia and spinal cord of male, but not female rats. Additionally, vortioxetine improved cognitive performance in osteoarthritic animals without negative effects on general well-being, redox status, or cardiomyocyte histology.

The results suggest that vortioxetine may be effective in treating inflammatory pain conditions, with beneficial effects on cognitive function.

Key words: vortioxetine, inflammatory pain, osteoarthritis, duloxetine, nerve growth factor, cognitive dysfunction, cardiovascular safety, oxidative stress, sex-specific differences

Academic expertise: Pharmacy

Major in: Pharmacology

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Bol – osnovna terminologija, klasifikacija i epidemiološki značaj	1
1.2. Osnovi neurobiologije bola.....	2
1.3. Descendentna modulacija bola.....	5
1.4. Modulacija bola: neurotransmiterski sistemi uključeni u inhibiciju bolne senzacije	5
1.4.1. Uloga monoamina u modulaciji bola	5
1.4.2. Uloga acetilholina u modulaciji bola.....	6
1.4.3. Uloga kanabinoida u modulaciji bola	7
1.4.4. Uloga adenzina u modulaciji bola.....	8
1.5. Mehanizam nastanka bola kod osteoartritisa	8
1.5.1. Lokalna inflamacija zglobova: doprinos nastanku bola kod osteoartritisa	9
1.5.2. Nervni faktor rasta (engl. <i>nerve growth factor</i> , <i>NGF</i>): doprinos nastanku bola kod osteoartritisa	10
1.5.3. Neuroinflamacija: doprinos nastanku bola kod osteoartritisa.....	13
1.6. Hronični bol i komorbiditeti.....	16
1.6.1. Hronični bol i kognitivna disfunkcija: neurobiološka osnova.....	16
1.7. Hronični bol: uticaj pola.....	19
1.8. Vortiooksetin – mehanizam dejstva, prokognitivni potencijal i antinociceptivni efekti	20
2. Ciljevi rada	23
3. Materijal i metode.....	25
3.1. Eksperimentalne životinje	25
3.2. Eksperimentalne supstance i njihova primena.....	25
3.3. Eksperimentalni modeli akutnog inflamatornog bola i protokol eksperimenata	26
3.3.1. Model inflamatornog trigeminalnog bola	26
3.3.2. Model akutnog visceralnog bola	28
3.3.3. Model akutnog somatskog inflamatornog bola	29
3.3.4. Rotarod test	30
3.4. Eksperimentalni model hroničnog inflamatornog bola (model osteoartritisa) i protokol eksperimenata.....	31
3.4.1. Praćenje bolnog ponašanja u modelu osteoartritisa.....	34
3.4.2. Test kopanja	35
3.4.3. Rotarod test	35
3.4.4. Test prepoznavanja novog objekta (engl. novel object recognition test, NORT)	35

3.4.5.	Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)	36
3.4.6.	Parametri oksidativnog stresa u kolenu	37
3.4.7.	Parametri redoks statusa u srčanom mišiću	38
3.4.8.	Histološka analiza kardiomiocita	40
3.5.	Statistička analiza	40
4.	Rezultati.....	41
4.1.	Efikasnost vortiooksetina u modelima akutnog inflamatornog bola i mehanizam dejstva vortiooksetina u animalnom modelu trigeminalnog bola.....	41
4.1.1.	Efekat vortiooksetina u modelu inflamatornog trigeminalnog bola.....	41
4.1.2.	Efekat vortiooksetina u modelu inflamatornog visceralnog bola	43
4.1.3.	Efekat vortiooksetina u modelu somatskog inflamatornog bola	43
4.1.4.	Ispitivanje mehanizama dejstva vortiooksetina u modelu inflamatornog trigeminalnog bola	44
4.1.5.	Uticaj vortiooksetina na motoriku životinja u akutnim modelima inflamatornog bola	49
4.2.	Efekti vortiooksetina u modelu osteoartritisa	51
4.2.1.	Uticaj vortiooksetina na bolno ponašanje životinja sa osteoartritisom.....	51
4.2.2.	Uticaj vortiooksetina na opštu dobrobit životinja sa osteoartritisom u testu kopanja	57
4.2.3.	Uticaj vortiooksetina na motorne performanse životinja sa osteoartritisom	59
4.3.	Uticaj vortiooksetina na kognitivne performanse životinja sa osteoartritisom.....	61
4.4.	Mehanizam dejstva vortiooksetina u animalnom modelu osteoartritisa	63
4.4.1.	Uticaj vortiooksetina na gensku ekspresiju markera bolne presetljivosti u kolenu životinja sa osteoartritisom.....	63
4.4.2.	Uticaj vortiooksetina na parametre oksidativnog stresa u kolenu životinja sa osteoartritisom...	65
4.4.3.	Uticaj vortiooksetina na ekspresiju medijatora bolne preosetljivosti u L3-L5 spinalnim ganglijama i kičmenoj moždini životinja sa osteoartritisom	67
4.5.	Uticaj vortiooksetina na parametre redoks statusa i histološke promene kardiomiocita u modelu osteoartritisa	70
4.5.1.	Uticaj vortiooksetina na parametre oksidativnog stresa u srčanom mišiću životinja sa osteoartritisom.....	70
4.5.2.	Uticaj vortiooksetina na histološke promene kardiomiocita životinja sa osteoartritisom.....	72
5.	Diskusija	74
5.1.	Antnociceptivni efekti vortiooksetina u akutnim modelima inflamatornog bola i mehanizam dejstva vortiooksetina u animalnom modelu trigeminalnog bola.....	74
5.1.1.	Mehanizam dejstva vortiooksetina u modelu trigeminalnog bola	75
5.2.	Efekti vortiooksetina u modelu osteoartritisa	78

5.2.1.	Antinociceptivni efekti vortiooksetina u modelu osteoartritisa	78
5.2.2.	Uticaj vortiooksetina na opštu dobrobit životinja u testu kopanja.....	79
5.3.	Uticaj vortiooksetina na kognitivne performanse životinja sa osteoartritisom.....	80
5.4.	Mehanizam dejstva vortiooksetina u modelu osteoartritisa	82
5.4.1.	Uticaj vortiooksetina na markere bolne preosetljivosti u kolenu životinja sa osteoartritisom	82
5.4.2.	Uticaj vortiooksetina na markere oksidativnog oštećenja u kolenu životinja sa osteoartritisom	83
5.4.3.	Uticaj vortiooksetina na markere bolne preosetljivosti ipsilateralno u spinalnim ganglijama i kičmenoj moždini u predelu L3-L5 kod životinja sa osteoartritisom	84
5.5.	Uticaj vortiooksetina i duloksetina na parametre redoks statusa u srcu životinja sa osteoartritisom..	85
6.	Zaključak	87
7.	Literatura	89

1. Uvod

1.1. Bol – osnovna terminologija, klasifikacija i epidemiološki značaj

Bol je jedan od najčešćih razloga koji nas dovodi kod lekara. Iako bolna stanja ne predstavljaju vodeći uzrok mortaliteta i nisu u vezi sa neposrednom životnom opasnošću, bol, posebno hronični, predstavlja glavni uzrok ljudske patnje i onesposobljenosti u svetu (GBD 2021 Diseases and Injuries Collaborators, 2024; Treede i sar., 2019). Epidemiološka studija *The Global Burden of Disease Study 2021* je pokazala da se među pet vodećih uzroka onesposobljenosti na globalnom nivou, nalaze i tri bolna stanja (bol u donjem delu leđa, glavobolje i drugi muskuloskeletni poremećaji), dok se na proširenoj listi, nalaze i osteoartritis, kao i bol u vratu (GBD 2021 Diseases and Injuries Collaborators, 2024). Značaj hroničnog bola je poslednjih godina prepoznat od strane medicinske javnosti, pa je u poslednjoj reviziji Međunarodne klasifikacije bolesti (MKB 11), hronični bol prepoznat kao zaseban entitet (primarni bol), bolest sama po sebi, a ne nužno simptom bolesti (sekundarni hronični bol) (Nicholas i sar., 2019).

Etimološki, reč bol potiče od anglo-francuske reči *peine* (bol, patnja), latinske reči *poena* što se prevodi kao kazna, grčke *poinë* (isplata, kazna, nadoknada) (Raja i sar., 2020). U samoj etimologiji reči je verovatno konceptualno sadržana veza između bola i patnje, odnosno kazne koju pacijent oseća.

Prema definiciji Međunarodne asocijacije za proučavanje bola (engl. *International Association for the Study of Pain - IASP*), bol se definiše kao neprijatno senzorno i emocionalno iskustvo povezano sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva ili nalik na ono povezano sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva. Pored toga, *IASP* ističe nekoliko ključnih napomena u vezi sa senzacijom bola (Raja i sar., 2020):

- Bol je uvek lično iskustvo na koje u različitom stepenu utiču biološki, psihološki i socijalni faktori.
- Bol i nocicepcija su različiti fenomeni. Bol se ne može objasniti samo aktivnošću senzornih neurona. Ovim se ističe da je nocicepcija objektivni fenomen, dok je bol uvek subjektivnog karaktera. Pojedinaac može da doživi bol i u odsustvu nocicepcije, isto kao što i nocicepcija ne dovodi uvek do senzacije bola.
- Kroz svoja životna iskustva, pojedinci se upoznaju sa konceptom bola.
- Treba poštovati nečiji doživljaj bola. Mnogi ljudi doživljavaju bol i u odsustvu oštećenja tkiva.
- Iako evolutivno bol ima adaptivnu ulogu, bol može negativno uticati na funkcionisanje, socijalno i psihološko blagostanje pojedinca (engl. *well-being*).
- Verbalna komunikacija je samo jedan od načina da se izrazi bol; nesposobnost komunikacije ne isključuje mogućnost da čovek ili životinja mogu da osećaju bol.

Akutni bol neupitno ima adaptivnu ulogu i esencijalan je za preživljavanje i proces izlečenja, obično nastaje kao odgovor na oštećenje i povredu tkiva i posledični zapaljenski proces. Međutim, po prestanku opasnosti, bol gubi adaptivnu ulogu i postaje bolest sama po sebi (Cohen i sar., 2021).

Za razliku od akutnog bola, hronični bol ima mali evolutivni značaj i predstavlja vodeći uzrok ljudske patnje. Iako ne postoji jasna granica kada akutni bol prelazi u hronični, opšte je prihvaćeno da je to bol koji traje nakon očekivanog perioda zarastanja (3 meseca prema MKB-11) (Cohen i sar., 2021).

Prema mehanizmu nastanka, bol se danas kategorizuje u tri grupe: nociceptivni, neuropatski i nociplastični bol. Važno je istaći da ova podela nije apsolutna i da je prepoznato da mnoga bolna stanja

mogu imati mešoviti fenotip tj. ne pripadaju samo jednoj kategoriji (npr. pacijent istovremeno može imati i nociceptivni i nociplastični bol) (Cohen i sar., 2021).

- **Nociceptivni bol** se javlja kao odgovor na stvarno ili potencijalno oštećenje tkiva i posledica je aktivacije nociceptora. Ovoj grupi pripadaju najprevalentnija bolna stanja, koja se sreću u kliničkoj praksi i uključuju (ali se ne ograničavaju na) bol kod različitih artitisa, kao i različite forme bola u leđima.
- **Neuropatski bol** se definiše kao bol izazvan oštećenjem ili bolešću somatosenzornog nervnog sistema. Procenjuje se da između 15-25% ljudi koji pati od hroničnog bola, ima neuropatski bol, među kojima su najčešći dijabetesna neuropatija, postherpetična neuralgija i radikulopatija. Za razliku od mnogih oblika nociceptivnog bola, hronični neuropatski bol je uvek maladaptivan (Cohen i sar., 2021).
- **Nociplastični bol** je bol koji se javlja kao posledica izmenjene nocicepcije, iako ne postoje jasni dokazi koji ukazuju na stvarno ili potencijalno oštećenje tkiva, koje bi dovelo do aktivacije nociceptora, kao ni oštećenje somatosenzornog sistema. Nociplastična bolna stanja su se ranije nazivala disfunkcionalnim bolnim sindromima i uključuju fibromijalgiju, sindrom iritabilnog creva, hronični primarni pelvični bolni sindrom, kao i neke oblike nespecifičnog bola u leđima (Fitzcharles i sar., 2021).

1.2. Osnovi neurobiologije bola

Nociceptivni put se sastoji od serije senzornih neurona koji informacije o dejstvu noksičnog (lat. *noxa* – povreda) stimulusa prenose sa periferije preko kičmene moždine do mozga (**Slika 1.1**). **Nocicepcija** je proces kojim se aktiviraju **nociceptori** (lat. *nocere* – oštetiti, povrediti), specijalizovani aferentni nervni završeci koji inervišu periferna tkiva i specijalizovani su da detektuju stimuluse mehaničke, hemijske ili termičke prirode koji imaju potencijal da oštete tkivo (Dubin i Patapoutian 2010). Nociceptori imaju visok prag aktivacije čime se osigurava da se u normalnim okolnostima blagi stimulusi (npr. dodir) ne percipiraju kao bolni (Cao i sar., 2024; Motzkin i sar., 2024; Basbaum i sar., 2009). Čelijska tela nociceptora su lokalizovana na nivou spinalnih ganglija (inervacija tela) i trigeminalnih ganglija (inervacija glave i lica). Primarni senzorni neuroni su pseudounipolarni, sa perifernim (inervišu periferna tkiva/organ) i centralnim (inervišu neurone zadnjih rogova kičmene moždine/trigeminalnog *nucleus caudalis*-a) aksonskim završetkom. Postoje dve glavne grupe nociceptora, mijelinizovana A δ vlakna srednjeg dijametra (prenose akutni, dobro lokalizovani, „brzi” bol) i nemijelinizovana C vlakna malog dijametra (prenose informacije o slabo lokalizovanom, „sporom” bolu) (Basbaum i sar., 2009; Motzkin i sar., 2024).

Nocicepcija počinje **transdukcijom** – proces kojim specijalizovani membranski proteini lokalizovani na perifernim završecima primarnog senzornog neurona detektuju noksični stimulus i generišu promenu potencijala membrane. Odgovarajući stimulus će dovesti do snižavanja potencijala membrane (depolarizacije) dovoljnog intenziteta za aktivaciju voltažno-zavisnih Na⁺ kanala i generisanja akcionog potencijala čime se informacija prenosi do centralnih terminala primarnog senzornog neurona (Basbaum i sar., 2009; Motzkin i sar., 2024).

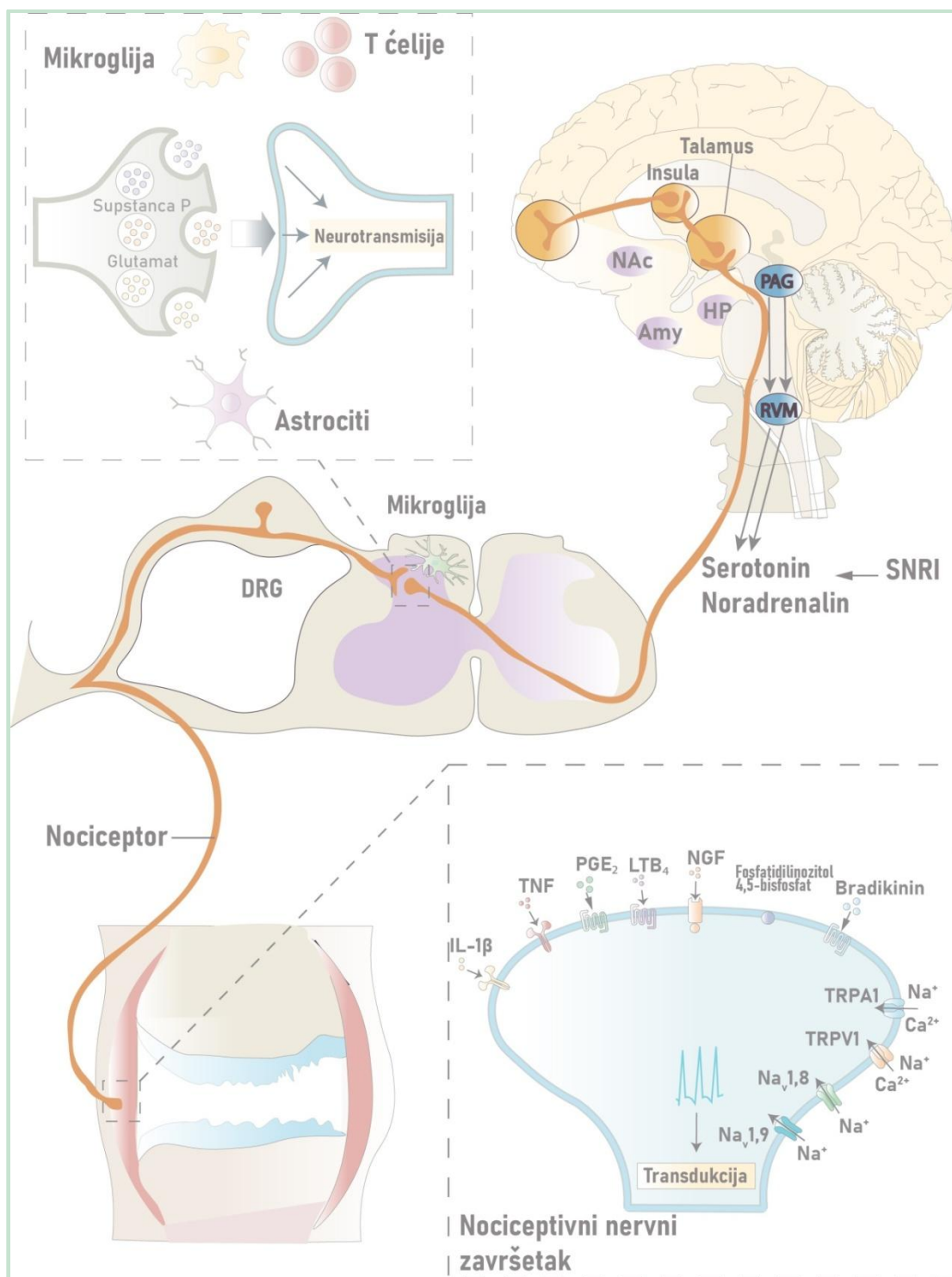
Za proces transdukcije su odgovorni specifični receptori i jonski kanali eksprimirani na membrani nociceptora. Među njima, najreprezentativniji su **TRP kanali** (engl. *Transient receptor potential channels*), koji pripadaju grupi ligand-zavisnih jonskih kanala. Ovi kanali funkcionišu kao molekularni senzori, koje aktiviraju fizički, termički i hemijski stimulusi. Pored toga, nociceptori eksprimiraju i brojne druge kanale koji doprinose pretvaranju noksičnog stimulusa u električni signal (Cao i sar., 2024; Murthy i sar., 2018).

Nociceptivni signali se sa periferije prenose preko spinalnih/trigeminalnih ganglija do centralnog aksonskog terminala u zadnjim rogovima kičmene moždine/trigeminalnog *nucleus caudalis*-a. Nociceptivna A δ vlakna se projektuju do lamine I i dubljih slojeva dorzalnog roga, lamine V, dok se C vlakna uglavnom projektuju do površinskih lamina I i II. Sekundarni neuroni nociceptivnog puta su upravo lokalizovani na nivou različitih lamina dorzalnog roga kičmene moždine i *nucleus caudalis*-a (Basbaum i sar., 2009; Woller i sar., 2017).

Glavni neurotransmiter na nivou primarne sinapse nociceptivnog puta je **glutamat** i u manjoj meri brojni neuropeptidi, uključujući **supstancu P** i **peptid sličan kalcitoninu** (engl. *calcitonin-gene-related peptide*). Nakon prolaznog akutnog stimulusa, transmisija nociceptivnih informacija je posredovana dominantno preko jonotropnih AMPA receptora za glutamat što rezultuje nastankom oštrog, lokalizovanog bola. S druge strane, kada bolni stimulus perzistira ili se njegov intenzitet povećava, aktiviraju se i NMDA receptori za glutamat (otklanja se Mg²⁺ koji blokira kanal u stanju mirovanja) (Basbaum i sar., 2009; Dickenson 2019). Aktivacija glutamatnih NMDA receptora dovodi do porasta intracelularnog Ca²⁺ i aktivacije različitih kalcijum-zavisnih signalnih puteva i drugih glasnika, što dovodi do povećane ekscitabilnosti sekundarnog neurona i olakšava transmisiju nociceptivnih informacija ka mozgu (**Slika 1.1**).

Informacija se dalje sa sekundarnog neurona sistema za transmisiju nociceptivnih signala prenosi preko spinotalamičkog i spinoretikulotalamičkog puta do talamusa i moždanog stabla, redom. Informacije iz moždanog stabla i talamusa se dalje prenose preko tercijarnog neurona do kortikalnih struktura, kao što je somatosenzorni korteks (odgovoran za **senzorno-diskriminativne aspekte bola**, gde je lokalizovan bol i koliko je intenzivan) i anteriorni cingulatni i insularni korteks (odgovorni za **afektivno-motivacionu dimenziju** bola tj. averzivnu komponentu bola i istovremeno motivaciju za bekstvo ili izbegavanje izloženosti štetnom stimulusu kako bi se minimiziralo dalje oštećenje) (Apkarian i sar., 2011; Basbaum i sar., 2009; Motzkin i sar., 2024). Pored toga, važno je spomenuti i **kognitivno-evaluativnu dimenziju bola**, koju čine neuronska kola koja nisu specifična samo za bol, i uključuju medijalni i lateralni prefrontalni korteks, orbitofrontalni korteks i lateralni parijetalni korteks, kao i afektivno-motivacione regije mozga poput anteriornog cingulatnog i anteriornog insularnog korteksa (Motzkin i sar., 2024). Način na koji pojedinac doživljava bol može se razlikovati ne samo interindividualno, već i unutar iste osobe. Brojni faktori, uključujući emocionalno stanje, pažnju, distrakciju, kao i sećanja na prethodna bolna iskustva mogu da promene iskustvo bola (Felice i Ossipov 2016; Fillingim 2017; Garcia-Larrea i Peyron 2013; Motzkin i sar., 2024).

Važno je istaći da su u normalnim okolnostima bolni stimulus i posledični neuronski odgovor relativno prolazne prirode. Međutim, kod hroničnih bolnih stanja, put za transmisiju nociceptivnih informacija prolazi kroz brojne promene koje dovode do razvoja bolne preosetljivosti. Ovaj fenomen se zove **senzitivizacija** i javlja se i u perifernom i u centralnom nervnom sistemu. Posledično, bol može da se javi spontano, može biti izazvan stimulusima koji u normalnim okolnostima ne dovode do bola (**alodinija**), može biti pojačan (**hiperalgezija**) i može zahvatiti mesta van inicijalne povrede (**sekundarna hiperalgezija/alodinija**). Na primer, hronični muskuloskeletni bol je povezan sa razvojem neuroplastičnosti perifernog i centralnog nervnog sistema što se klinički manifestuje kvantitativnim senzornim promenama poput sniženog praga za bol u zahvaćenim i udaljenim regijama. Stoga, fenomeni periferne i centralne senzitivizacije mogu objasniti nesklad između radiografskog oštećenja zglobova kod pacijenata sa osteoartritisom i bola koji pacijenti opisuju (Malfait i sar., 2021).



Slika 1.1. Osnovna neuroanatomija puta bola u osteoartritisu. Amy, amigdala; DRG, ganglije dorzalnih korenova kičmene moždine (engl. *dorsal root ganglion*); HP, hipokampus; NAc, nucleus akumbens; LTB₄, leukotrien B₄; NGF, nervni faktor rasta; PAG, periakveduktalna siva masa; PG, prostaglandin; RVM, rostroventralna medula; SNRI, inhibitor ponovnog preuzimanja serotonina i noradrenalina (engl. *serotonin–noradrenaline reuptake inhibitor*) (Preuzeto i prilagođeno prema Malfait i Schnitzer 2013).

1.3. Descendentna modulacija bola

Veza između perifernog stimulusa i percepcije bola nije linearna i zavisi od kognitivnih, emocionalnih i patoloških faktora, kao i konteksta (naših verovanja, očekivanja, placebo efekta) (Damien i sar., 2018; De Felice i Ossipov 2016; Tracey i Mantyh 2007). Kontekst je važan za iskustvo bola i objašnjava zašto pojedinci različito percipiraju bol u slučaju sličnih povreda (Felice i Ossipov 2016). Ekstremni primeri uključuju traumatske povrede dobijene tokom sportskog takmičenja ili kod vojnika u ratu koje su inicijalno okarakterisane kao bezbolne, iako su u drugim okolnostima slične povrede izuzetno bolne (Heinricher i Fields 2013). Stoga, mozak nije samo lokus percepcije bola, već angažovanjem moćnog sistema descendentne modulacije koji može da inhibira ili facilitira transmisiju nociceptivnih informacija, više moždane strukture regulišu iskustvo bola (Chen i Heinricher 2019; Hoegh i Bannister 2024; Rosa-Casillas i Basbaum 2025). U uslovima akutnog bola, obično postoji dinamička ravnoteža između dva procesa. Međutim, **disfunkcija na nivou sistema za modulaciju bola** može dovesti do smanjene inhibicije bola i/ili pojačane facilitacije što na kraju pogoršava bolnu senzaciju i doprinosi **hronifikaciji bola** (Chen i Heinricher 2019; Ossipov i sar., 2014; Rosa-Casillas i Basbaum 2025). Ovo je najbolje dokumentovano korišćenjem paradigme “uslovljene modulacije bola” (engl. *conditioned pain modulation*) ili „bol inhibira bol“, u kojoj noksični stimulus primenjen u jednom delu tela, potiskuje bol koji je izazvan noksičnim stimulusom koji je primenjen u prostorno udaljenoj regiji tela. Oslabljena sposobnost da se uspostavi odgovor na uslovljenu modulaciju bola se često viđa kod pacijenata sa hroničnim bolnim stanjima (migrena, glavobolja tenzionog tipa, osteoartritis, fibromijalgija, sindrom iritabilnog creva i dr.) i može predstavljati farmakološki osnov za primenu lekova koji potenciraju efekte nishodnih inhibitornih puteva (Chen i Heinricher 2019; Nir i Yarnitsky 2015).

Najvažniji anatomske supstrati **sistema nishodne modulacije bola** čine **periaqueduktalna siva masa (engl. Periaqueductal Gray - PAG), rostroventralna medula (RVM) i neuroni locus coeruleus-a**. Sistem PAG-RVM je pod uticajem viših moždanih struktura, hipotalamusa, limbičkog prednjeg mozga, uključujući amigdalnu, anteriorni cingulati korteks i insulu, što predstavlja mehanistički osnov za razumevanje uticaja kognitivnih i emocionalnih faktora u obradi bolne senzacije. Glavno mesto projekcije PAG je RVM, preko koje PAG kontroliše spinalne nociceptivne neurone (Bannister i Dickenson 2017; Heinricher i Fields 2013). Stimulacija PAG može dovesti do snažnog analgetičkog efekta; pokazano je da električna stimulacija ove regije dovodi do snažnog antinociceptivnog efekta kod životinja i ljudi (Ossipov i sar., 2014). S druge strane, RVM može da dovede i do facilitacije i inhibicije nociceptivne senzacije na nivou primarne sinapse u dorzalnom rogu kičmene moždine/trigeminalnom *nucleus caudalis*-u i tradicionalno se smatra poslednjom stanicom kroz koju prolaze modulatorni uticaji do kičmene moždine (Bannister i Dickenson 2017). Dvosmerni uticaj RVM na modulaciju bolne senzacije se može objasniti postojanjem tri različite populacije neurona (OFF ćelije, ON ćelije i NEUTRALNE ćelije) u RVM. Aktivacija OFF ćelija proizvodi neto inhibitorni uticaj na nocicepciju. Suprotno, ON ćelije imaju neto facilitatorni efekat na nocicepciju. Uloga NEUTRALNIH ćelija nije u potpunosti jasna, iako određenu populaciju ovih ćelija čine serotonergički neuroni, što ukazuje na moguću ulogu u modulaciji bola (Rosa-Casillas i Basbaum 2025). Paralelni noradrenergički putevi, dominantno iz *locus coeruleus*-a su recipročno povezani sa osovino PAG-RVM.

1.4. Modulacija bola: neurotransmiterski sistemi uključeni u inhibiciju bolne senzacije

1.4.1. Uloga monoamina u modulaciji bola

Ključni neurotransmiteri uključeni u nishodnu modulaciju bola su noradrenalin i serotonin, iako i endogeni opioidi, γ -aminobuterna kiselina (GABA), endogeni kanabinoidi, adenzin, acetilholin

doprinosu ovom procesu (Bannister i Dickenson 2016; Bannister i Dickenson 2017; Sawynok 2016; Sirucek i sar., 2023).

Antinociceptivni efekat ***noradrenalina*** posredovan preko spinalnih adrenergičkih α_2 receptora je dobro dokumentovan (Bannister i Dickenson 2016; Ossipov i sar., 2014; Sirucek i sar., 2023). Glavni izvor noradrenalina je ***locus coeruleus***, koji je povezan sa RVM i PAG; električna/optogenetička stimulacija ove regije moždanog stabla smanjuje bolnu preosetljivost (Sirucek i sar., 2023). Različiti mehanizmi doprinose antinociceptivnom efektu noradrenalina na nivou dorzalnog roga kičmene moždine, uključujući i efekte na nivou neurona, ali i gliju ćelija (Caraci i sar., 2019). Adrenergički α_2 receptori su povezani sa $G_{i/o}$ proteinom; stimulacijom presinaptičkih α_2 receptora na primarnom aferentnom neuronu, noradrenalin inhibira voltažno-zavisne Ca^{2+} kanala i posledično oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera (dominantno glutamata, a u manjoj meri i supstance P). Aktivacijom postsinaptičkih α_2 receptora na sekundarnom neuronu bolnog puta, dolazi do otvaranja K^+ kanala i posledičnog smanjenja neuralne ekscitabilnosti (Hayashida i Obata 2019). Pored toga, adrenergički α_2 receptori su eksprimirani na astrocitima i ćelijama mikroglije u kičmenoj moždini, preko kojih noradrenalin dovodi do smanjene aktivacije gliju ćelija tokom hronične inflamacije ili periferne povrede neurona što može biti značajno u prevenciji hronifikacije bola (Caraci i sar., 2019). Suprotno, aktivacija spinalnih α_1 receptora uglavnom olakšava prenos nociceptivnih informacija, iako postoje podaci koji ukazuju da aktivacija ekscitatornih α_1 receptora na GABA-ergičkim interneuronima može doprineti antinociceptivnom efektu (De Felice i Ossipov 2016).

S druge strane, uloga ***serotonina*** je ambivalentna i može imati i inhibitornu i facilitatornu ulogu u modulaciji bola, zavisno od mesta oslobađanja i podtipa receptora koji je uključen. Na periferiji, serotonin ima dominantno pronociceptivnu ulogu; aktivacijom perifernih $5-HT_{2A}$ i $5-HT_3$ receptora, serotonin doprinosi transmisiji nociceptivnih informacija (Bardin 2011; Bardoni 2019). S druge strane, na spinalnom nivou, serotonin može ispoljiti i pronociceptivni i antinociceptivni efekat u zavisnosti od podtipa serotonergičkih receptora koji se aktivira. Aktivacija nishodnih projekcija poreklom iz RVM dovodi do oslobađanja serotonina u dorzalnim rogovima kičmene moždine iz završetaka projekcionih neurona ili iz spinalnih interneurona (Ossipov i sar., 2014). Smatra se da aktivacija $5-HT_{2A}$ i $5-HT_3$ receptora doprinosi descendentnoj facilitaciji, dok $5-HT_{1A}$, $5-HT_{1B/D}$ i $5-HT_7$ receptori posreduju u inhibiciji bolne senzacije (Avila-Rojas i sar., 2015; Bannister i Dickenson 2016; Ossipov i sar., 2014).

Pokazano je da u animalnim modelima hroničnog inflamatornog (model osteoartritisa) i neuropatskog bola postoji disbalans između nishodne inhibicije i facilitacije; dolazi do gubitka nishodnog inhibitornog efekta noradrenalina uz pojavu serotonergičke facilitacije posredovane $5-HT_3$ receptorima. Ovo se može povratiti blokadom spinalne serotonergičke facilitacije (blokadom serotonergičkih $5-HT_3$ receptora) ili inhibicijom spinalnog preuzimanja noradrenalina (Bannister i Dickenson 2017; Sirucek i sar., 2023). Upravo je uticaj na monoaminergičku neurotransmisiju u osnovi analgetičkog dejstva tricikličnih antidepresiva (TCA) i **selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina i noradrenalina** (engl. *SNRI*), koji se široko koriste kao alternativni analgetici (**Slika 1.1**). Antidepresivi koji potenciraju noradrenergičku neurotransmisiju imaju veću efikasnost u poređenju sa selektivnim inhibitorima preuzimanja serotonina (engl. *SSRI*) što se objašnjava kompleksnom ulogom serotonina u modulaciji bolne senzacije (Bannister i Dickenson 2016; Lockwood i Dickenson 2020).

1.4.2. Uloga acetilholina u modulaciji bola

Acetilholin je jedan od najzastupljenijih neurotransmitera u centralnom i perifernom nervnom sistemu. Svoje efekte ostvaruje aktivacijom dva tipa receptora, muskarinskih (metabotropnih) i nikotinskih

(jonotropnih) receptora (Toma i sar., 2020). Aktivacija holinergičkih receptora ili potenciranje efekata acetilholina smanjuje bolnu preosetljivost kod životinja i ljudi (Kuner i Kuner 2021; Naser i Kuner 2018).

Značajnu ulogu u ostvarivanju antinociceptivnih efekata imaju spinalni holinergički mehanizmi. Povećanje acetilholina u kičmenoj moždini proizvodi analgetički efekat, dok lokalno smanjenje nivoa acetilholina ili blokada receptora potencira bolnu preosetljivost, dovodeći do hiperalgezije i alodinije (Naser i Kuner 2018). Intratekalna primena neostigmina, inhibitora acetilholin-esteraze, smanjuje inflamatornu preosetljivost. Ovaj efekat se pripisuje aktivaciji muskarinskih M_2 receptora, koji ujedno predstavljaju i najzastupljeniji podtip muskarinskih receptora eksprimiran na nivou kičmene moždine (Naser i Kuner 2018). Muskarinski M_1 , M_3 i M_5 receptori su spregnuti sa G_q proteinom, dok su M_2 i M_4 povezani sa $G_{i/o}$ proteinom. Upravo se aktivacija „parnih“ muskarinskih receptora dovodi u vezu sa antinociceptivnim efektima; njihovom aktivacijom dolazi do inhibicije adenilat ciklaze, inhibicije voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala na primarnom neuronu bolnog puta i aktivacije K^+ kanala na sekundarnom neuronu bolnog puta (Naser i Kuner 2018).

Među nikotinskim receptorima, najznačajniju ulogu u ublažavanju bolne senzacije imaju α_7 i $\alpha_4\beta_2$ receptori. Poslednjih godina se ekstenzivno ispituje uloga nikotinskih homomernih α_7 receptora u ublažavanju bola. Sistemska primena agonista nikotinskih α_7 receptora, kao i *knock-out* studije ukazuju da ovi receptori posreduju u antinociceptivnom efektu u brojnim animalnim modelima. Pored toga, brojne studije ukazuju da su ovi efekti posredovani uticajem na supraspinalne strukture; intracerebroventrikularna primena selektivnih agonista α_7 receptora proizvodi antinociceptivni efekat u inflamatornim i neuropatskim modelima bola (Hone i McIntosh 2023). Nikotinski receptori su eksprimirani na nivou ventrolateralne PAG, koja je važno mesto u nishodnoj modulaciji bola (Umana i sar., 2017). Sullere i sar. (2023) su pokazali da su antinociceptivni efekti koje ostvaruje acetilholin na nivou PAG posredovani nikotinskim α_7 receptorima koji inhibiraju GABA-ergičke interneurone u PAG što dovodi do aktivacije PAG-RVM projekcionih neurona.

1.4.3. Uloga kanabinoida u modulaciji bola

Kanabinoidi su takođe uključeni u proces nishodne modulacije bola. Antinociceptivni efekat kanabinoida je barem delom posledica aktivacije PAG-RVM sistema za modulaciju bola (Palazzo i sar., 2010; Sirucek i sar., 2023). Najzastupljeniji tip kanabinoidnih receptora u centralnom nervnom sistemu su CB_1 . Pored supraspinalnih struktura, CB_1 receptori su eksprimirani i na dorzalnim rogovima kičmene moždine, ali i na perifernom terminalu primarnog aferentnog neurona (Palazzo i sar., 2010). Kanabinoidni CB_2 receptori su uglavnom eksprimirani na periferiji, posebno na ćelijama imunskog sistema, dok se u CNS-u eksprimirani dominantno na ćelijama mikroglije (Finn i sar., 2021). Kanabinoidni receptori su povezani sa $G_{i/o}$ proteinom, čijom aktivacijom dolazi do inhibicije adenilat-ciklaze, smanjenog stvaranja cAMP, kao i povećanja aktivnosti mitogenom-aktivirane protein kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK) (Finn i sar., 2021). Unutar neurona, aktivacija CB_1 receptora dovodi do inhibicije voltažno-zavisnih Ca^{2+} (i posledične inhibicije oslobađanja neurotransmitera) kanala i aktivacije K^+ kanala (i posledične hiperpolarizacije ćelijske membrane) i otežanog generisanja akcionog potencijala (Finn i sar., 2021). Aktivacija CB_2 receptora ne samo da ublažava bolnu preosetljivost u animalnim modelima bola, već se povezuje i sa antiinflamatornim dejstvom (Bryk i Starowicz 2021).

Eksperimentalni podaci ukazuju da agonisti CB_1 i CB_2 receptora mogu umanjiti bolnu senzaciju u različitim modelima inflamatornog (formalinski test, model karageninske inflamacije i osetoartritisa) i neuropatnog bola kod glodara (Bryk i Starowicz 2021; Finn i sar., 2021).

1.4.4. Uloga adenoizina u modulaciji bola

Efekti **adenoizina** na modulaciju bolne senzacije su kompleksni i uključuju i pronociceptivne i antinociceptivne efekte posredstvom aktivacije različitih podtipova adenoizinskih receptora (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , i A_3) na perifernom i centralnom nivou puta bola. Povećan nivo adenoizina u ekstracelularnom prostoru se javlja u stanjima kao što su ishemija, hipoksija, inflamacija, trauma i posledično bol (Borea i sar., 2016; Chen i sar., 2014; Haskó i sar., 2008; Sawynok 2016).

Antinociceptivni efekat adenoizina se uglavnom pripisuje aktivaciji adenoizinskih A_1 receptora što je pokazano u brojnim pretkliničkim studijama (Draper-Joyce i sar., 2021; Luongo i sar., 2021; Sawynok 2016). Agonisti adenoizinskih A_1 receptora su ispoljili antinociceptivni efekat u modelima inflamatornog bola (formalinski test, karageninski model inflamacije), ali i različitim modelima neuropatskog bola (Sawynok 2016). Adenoizinski A_1 receptori su lokalizovani na perifernim senzornim završecima, unutar površinskih slojeva dorzalnog roga kičmene moždine, kao i supraspinalnim strukturama važnim u modulaciji bola (mikroinjekcija agonista A_1 receptora u PAG proizvodi antinociceptivni efekat i menja aktivnost ON i OFF ćelija u RVM) (Burnstock i Sawynok 2010). Pored toga, ovi receptori su eksprimirani i na ćelijama mikroglije, gde inhibitorni efekat doprinosi ublaženju bolne senzacije (Luongo i sar., 2021).

S druge strane, aktivacija adenoizinskih A_{2A} receptora se dovodi u vezu i sa pronociceptivnim i antinociceptivnim efektima (Sawynok 2016). Postoje eksperimentalni nalazi koji ukazuju na antinociceptivni efekat spinalno primenjenih agonista adenoizinskih A_{2A} receptora (Kwilasz i sar., 2018; Luongo i sar., 2021) u modelima neuropatskog bola. Dodatno, intraperitonealna primena agoniste A_{2A} receptora je ublažila bolno ponašanje tokom obe faze formalinskog testa kod miševa (Nalepa i sar., 2010). Međutim, postoje studije koje ukazuju na facilitatornu ulogu adenoizinskih A_{2A} receptora u generisanju bolne senzacije. Dodatno, pokazano je da *knock-out* A_{2A} receptor miševi slabije reaguju na nociceptivni stimulus (Luongo i sar., 2021).

1.5. Mehanizam nastanka bola kod osteoartritisa

Osteoarthritis je najčešće oboljenje zglobova i jedan od **vodećih uzroka hroničnog bola**, onesposobljenosti i socioekonomskih troškova na globalnom nivou. Kako živimo u eri produženog životnog veka i visoke stope gojaznosti, broj obolelih će nesumnjivo nastaviti da raste (GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators 2023; Hunter i Bierma-Zeinstra 2019; Yao i sar., 2023). U nedostatku bolest-modifikujuće terapije, analgetici ostaju kamen temeljac terapije bola kod osteoartritisa (Katz i sar., 2021; Majeed i sar., 2018; Richard i sar., 2023). Međutim, postojeće terapijske opcije neretko pokazuju nezadovoljavajuću efikasnost i/ili su udružene sa značajnim neželjenim efektima (Majeed i sar., 2018). Stoga, unapređenje našeg razumevanja mehanizma nastanka bola kod osteoartritisa, kao i ključnih medijatora u ovom procesu će verovatno biti presudno u razvoju novih efektivnih terapijskih opcija (Cohen i Lee 2015).

Bol predstavlja kardinalni simptom osteoartritisa, čiji kvalitet i jačina variraju kako među pacijentima, tako i tokom vremena. U ranoj fazi, bol je visoko mehaničke prirode, i u vezi je sa aktivnošću i upotrebom zahvaćenog zgloba, npr. penjanje uz ili silaženje niz stepenice (Fu i sar., 2018). Kako bolest napreduje, bol može da se proširi i na okolne strukture i javi se čak i u mirovanju (Malfait i Schnitzer 2013; O'Neill TW i Felson 2018). Kod pacijenata sa osteoartritisom kolena, kvantitativna senzorna ispitivanja su pokazala postojanje bolne preosetljivosti na mehanički pritisak, uključujući hiperalgeziju i alodiniju. Ovi fenomeni su bili prisutni i na nivou zahvaćenog zgloba, ali i mestima udaljenim od zgloba, ukazujući na postojanje periferne, ali i centralne senzitivizacije (Malfait i Schnitzer 2013).

Danas se osteoartritis definiše kao **bolest celog zgloba** i uključuje patološke promene na nivou hrskavice, subhondralne kosti i sinovije (Abramoff i Caldera 2020; Conaghan i sar., 2019; Martel-Pelletier i sar., 2016; Yao i sar., 2023). Karakteriše ga **nizak stepen inflamacije** na nivou zahvaćenog zgloba što posledično dovodi do nastanka bola. Međutim, kontinuirani nociceptivni signali sa periferije dovode do neuroplastičnih promena na nivou centralnog nervnog sistema i doprinose hronifikaciji bola (Malfait i Schnitzer 2013).

Dodatno, sve veći broj podataka ukazuje na značaj neuroimunskih interakcija u održavanju hroničnog bola. Imunske ćelije i njihovi medijatori su dobro okarakterisani promoteri neuroinflamacije na svim nivoima bolnog puta, počevši od zahvaćenog zgloba, pa sve do struktura centralnog nervnog sistema, doprinoseći razvoju bolne preosetljivosti i održavanju bola (Wood i sar., 2022).

1.5.1. Lokalna inflamacija zgloba: doprinos nastanku bola kod osteoartritisa

Nociceptori eksprimiraju veliki broj receptora za različite ligande, poput citokina, hemokina, neuropeptida i prostaglandina. Ovi ligandi menjaju karakteristike nociceptora, snižavaju prag za generisanje akcionih potencijala ili ih direktno aktiviraju (Baral i sar., 2019). Kao rezultat periferne senzitivizacije, pokret zgloba postaje bolan (mehanička alodinija) (Conaghan i sar., 2019).

Faktor nekroze tumora α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 i IL-17 se smatraju glavnim proinflamatornim citokinima uključenim u patofiziologiju bola kod osteoartritisa (Kapoor i sar., 2011). Najviše je izučavana uloga IL-1 β i TNF- α ; kod pacijenata sa osteoartritisom su povišeni nivoi IL-1 β i TNF- α u sinovijalnoj tečnosti, sinovijalnoj membrani, subhondralnoj kosti i hrskavici, ovi medijatori imaju kataboličke efekte, ali mogu i direktno da aktiviraju nociceptore i time doprinose nastanku bola (Kapoor i sar., 2011; Mathiessen i Conaghan; Wood i sar., 2022). Analizom rezultata CANTOS studije (*Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study*), uočeno je da inhibicija IL-1 β primenom kanakinumaba može značajno smanjiti stopu zamene kuka i kolena, kao i simptome osteoartritisa tokom perioda praćenja od 3,7 godina (Schieker i sar., 2020). Ovi podaci ukazuju da inhibicija IL-1 β može biti značajan terapijski pristup kod pacijenata sa osteoartritisom. Međutim, rezultati kliničkih studija sa monoklonskim antitelima usmerenim prema TNF- α , adalimumabom i etanerceptom, nisu dale obećavajuće rezultate kod pacijenata sa osteoartritisom (Conaghan i sar., 2019; Persson i sar., 2018).

Inflamatorni medijatori, kao što su IL-1 β i TNF- α indukuju stvaranje **reaktivnih kiseoničnih jedinjenja** (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) što dodatno doprinosi disfunkciji zgloba. U patološkim uslovima, povećan nivo ROS indukuje ekspresiju proteaza koje degradiraju ekstracelularni matriks i dovode do apoptoze hondrocita (Ansari i sar., 2020). Prekomerna produkcija ROS i indukcija **oksidativnog stresa** u hondrocitima doprinosi patogenezi osteoartritisa (Ansari i sar., 2020).

Pored povećanog nivoa citokina, kod pacijenata sa osteoartritisom dolazi i do povećanja nivoa **nervnog faktora rasta** (engl. *nerve growth factor*, NGF), jednog od glavnih medijatora periferne senzitivizacije (Schmelz i sar., 2019). Dodatno, intraplantarna injekcija IL-1 β dovodi do termalne hiperaglezije i povećava nivo NGF ukazujući da povećanje IL-1 β verovatno doprinosi i povećanju NGF tokom inflamatorne reakcije (Miller i sar., 2014). Stimulacija humanih hondrocita i sinovijalnih fibroblasta sa IL-1 β povećava ekspresiju *Ngf* (Pecchi i sar., 2014; Takano i sar., 2016).

1.5.2. Nervni faktor rasta (engl. *nerve growth factor, NGF*): doprinos nastanku bola kod osteoartritisa

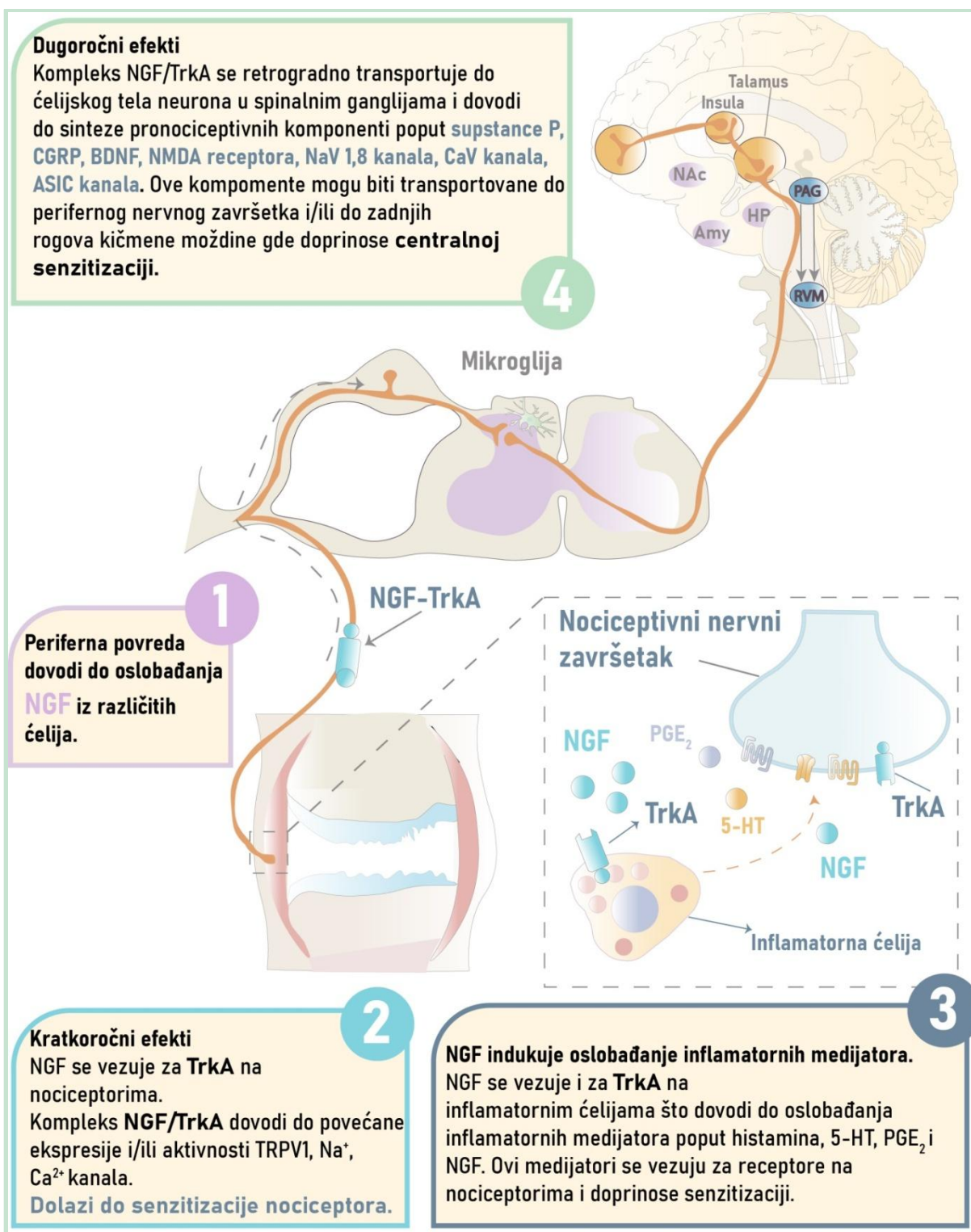
Neurotrofni faktor, NGF, je prepoznat kao jedan od važnih medijatora koji doprinose nastanku inflamatornog bola, uključujući i osteoartritis. Ovo zapažanje je sa velikim entuzijazmom podstaklo razvoj novih lekova, antitela usmerenih prema NGF. Anti-NGF antitela su zaista pokazala obećavajuće analgetičke efekte kod pacijenata sa osteoartritisom kolena i kuka. Međutim, došlo je do pojave rapidno progresivnog osteoartritisa kod određenog broja pacijenata, što je onemogućilo izlazak ovih lekova na tržište (Dietz i sar., 2021; Malfait i sar., 2021; Wise i sar., 2021) (**Slika 1.2**).

Tokom embrionalnog razvoja, NGF ima značajnu ulogu u rastu i preživljavanju neurona. Tokom razvoja, nociceptori, kao i simpatikusni neuroni ekspiriraju TrkA receptor (tropomiozin receptor kinaza), preko kojih NGF reguliše preživljavanje ovih neurona (Malfait i sar., 2021; Schmelz i sar., 2019). Nociceptori su posebno zavisni od NGF signalizacije jer mutacije gena za NGF ili TrkA receptor dovodi do kongenitalne neosetljivosti na bol (Schmelz i sar., 2019). Postnatalno, NGF zadržava važne uloge, posebno u inflamaciji, kada njegov nivo dramatično raste (Wood i sar., 2022). Lokalna injekcija NGF dovodi do trenutne i često dugotrajne senzitivizacije i bolne reakcije kod životinja i ljudi (Wood i sar., 2022). Mehanizam kojim NGF dovodi do bolne senzacije je ekstenzivno proučavan i uključuje, kako brze, tako i sporije, ali dugotrajne neuroplastične promene (Schmelz i sar., 2019).

Nervni faktor rasta se oslobađa od strane ćelija imunskog sistema kao deo inflamatornog odgovora posle periferne povrede, ali verovatno i od strane neimunskih ćelija poput hondrocita i sinoviocita. Vezivanje NGF za receptore sa tirozin-kinaznom aktivnošću A (TrkA, poznat i kao tropomiozin receptor kinaza) na nociceptorima dovodi do senzitivizacije nociceptora (Denk i sar., 2017; Schmelz i sar., 2019). Kratkoročno, aktivacija signalne kaskade koju pokreće NGF-TrkA povećava aktivnost i/ili ekspresiju jonskih kanala i receptora, uključujući TRPV1 kanale (engl. *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*), voltažno-zavisne Na^+ kanale, voltažno-zavisne Ca^{2+} kanale, receptore za bradikinin, ASIC 2 i 3 kanale (engl. *acid-sensing ion channels 2 and 3*) (Malfait i sar., 2020a; Schmelz i sar., 2019). Ovo dovodi do depolarizacije nociceptora i trenutne periferne senzitivizacije. Pored ovih brzih efekata, NGF-TrkA kompleks proizvodi i sporije i dugotrajnije efekte. Kompleks NGF-TrkA se internalizuje i retrogradno transportuje do ćelijskog tela primarnog senzornog neurona u spinalnoj gangliji, gde dovodi do transkripcionih promena što dovodi do povećanja sinteze peptida uključenih u proces nocicepcije, kao što su **supstanca P, CGRP, neurotrofni faktor koji vodi poreklo iz mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor, BDNF*), TRPV1, receptora za bradikinin, jonskih kanala za Na^+ i Ca^{2+}** . Ovi novosintetisani receptori, kanali i peptidi se potom transportuju ka nervnim završecima na periferiji i zadnjim rogovima kičmene moždine, gde podležu posttranslacionim promenama i doprinose nastanku periferne i centralne senzitivizacije (efekti mogu biti vidljivi posle par sati do nekoliko dana) (Schmelz i sar., 2019).

Jedan od primera kako NGF proizvodi svoje efekte je i preko povećanja ekspresije *Bdnf* u dorzalnim rogovima kičmene moždine, neurotrofina koji se smatra jednim od važnih medijatora centralne senzitivizacije (Malfait i sar., 2020a). Neurotrofni faktor koji vodi poreklo iz mozga (BDNF) se vezuje za receptore sa tirozin-kinaznom aktivnošću B (TrkB) na primarnom aferentnom neuronu što dovodi do oslobađanja glutamata, kao i na sekundarnom aferentnom neuronu dovodeći do fosforilacije NMDA receptora za glutamat i posledične depolarizacije čime se snižava prag za generisanje akcionog potencijala na sekundarnom neuronu bolnog puta i olakšava prenos nociceptivnih informacija (Schmelz i sar., 2019). Pored toga, BDNF doprinosi i perifernoj senzitivizaciji; intraartikularna primena BDNF u animalnim modelima osteoartritisa pojačava bolnu preosetljivost (Gowler i sar., 2020).

Na kraju, NGF se vezuje za TrkA receptore i na inflamatornim ćelijama gde stimuliše oslobađanje inflamatornih medijatora kao što su histamin, serotonin, PGE_2 , ali i sopstveno oslobađanje. Ovo dodatno doprinosi senzitivizaciji nociceptora (Schmelz i sar., 2019) (**Slika 1.2**).



Slika 1.2. Pronociceptivno dejstvo nervnog faktora rasta u osteoartritisu (NGF). 5-HT, 5-hidroksitriptamin; ASIC, *acid-sensing ion channels*; BDNF, neurotrofni faktor koji vodi poreklo iz mozga; CGRP, peptid sličan kalcitoninu; PGE₂, prostaglandin E₂; TrkA, tropomiozin receptor kinaza A; TRPV1, *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1* (Preuzeto i prilagođeno prema Schmelz i sar., 2019).

1.5.3. Neuroinflamacija: doprinos nastanku bola kod osteoartritisa

Neuroinflamacija je lokalizovana forma inflamacije na nivou perifernog (periferni neuroni i ganglije) i centralnog nervnog sistema (kičmena moždina i mozak). Neuroinflamaciju karakterišu: 1) vaskularne promene koje dovode do povećane vaskularne propustljivosti, 2) infiltracija leukocita, 3) aktivacija glija ćelija i 4) oslobađanje inflamatornih medijatora uključujući citokine i hemokine (Ji i sar., 2014; 2018; 2023). Poslednjih godina je prepoznato da neuroinflamacija leži u osnovi mnogih neuroloških oboljenja, uključujući i hronična bolna stanja (Ji i sar., 2014; 2018; Wood i sar., 2022) (**Slika 1.3**).

■ Neuroinflamacija: spinalne ganglije

Proces neuroinflamacije je opisan u nekoliko animalnih modela osteoartritisa. Pokazano je da dolazi do aktivacije satelitskih glija ćelija u spinalnim ganglijama (Adães i sar., 2017; Wood i sar., 2022). Pored aktivacije rezidentnih glija ćelija, sve više nalaza ukazuje i na infiltraciju makrofaga (Geraghty i sar., 2021; Geraghty i sar., 2024; Miller i sar., 2020; Raoof i sar., 2021). Nakon periferne inflamacije, senzorni neuroni oslobađaju hemokine CCL2 i CX3CL1 koji privlače makrofage na mesto udaljeno od inicijalnog patološkog procesa (Raoof i sar., 2018). U eksperimentalnom modelu osteoartritisa, uočena je povećana ekspresija *Ccl2* i posledično povećan broj ćelija makrofaga na nivou spinalnih ganglija, kao i kičmene moždine (Geraghty i sar., 2021; Wood i sar., 2022).

Makrofage oslobađaju različite citokine, zavisno od aktiviranog fenotipa; makrofage M1 fenotipa oslobađaju proinflamatorne citokine kao što su IL-1 β , TNF- α i IL-6, ali i reaktivna kiseonična jedinjenja koji doprinose nastanku bola, dok makrofage M2 fenotipa oslobađaju više anti-inflamatornih citokina, kao što je IL-10, koji može da doprinese ublaženju bolne senzacije (Raoof i sar., 2018; Yunna i sar., 2020). Raoof i sar. (2021) su pokazali da dolazi do akumulacije makrofaga M1 fenotipa (proinflamatorni fenotip) u ganglijama dorzalnih korenova kičmene moždine kod životinja sa osteoartritisom. Smatra se da aktivirani senzorni neuroni u ganglijama dorzalnih korenova kičmene moždine oslobađaju neuropeptide, neurotransmitere i/ili citokine poput IL-1 β i TNF- α koji favorizuju nastanak M1 fenotipa makrofaga (Raoof i sar., 2021). Sistemska deplecija makrofaga u modelu osteoartritisa je dovela do smanjenja proinflamatornih makrofaga u spinalnim ganglijama i ublažila je bolno ponašanje kod eksperimentalnih životinja (Geraghty i sar., 2024).

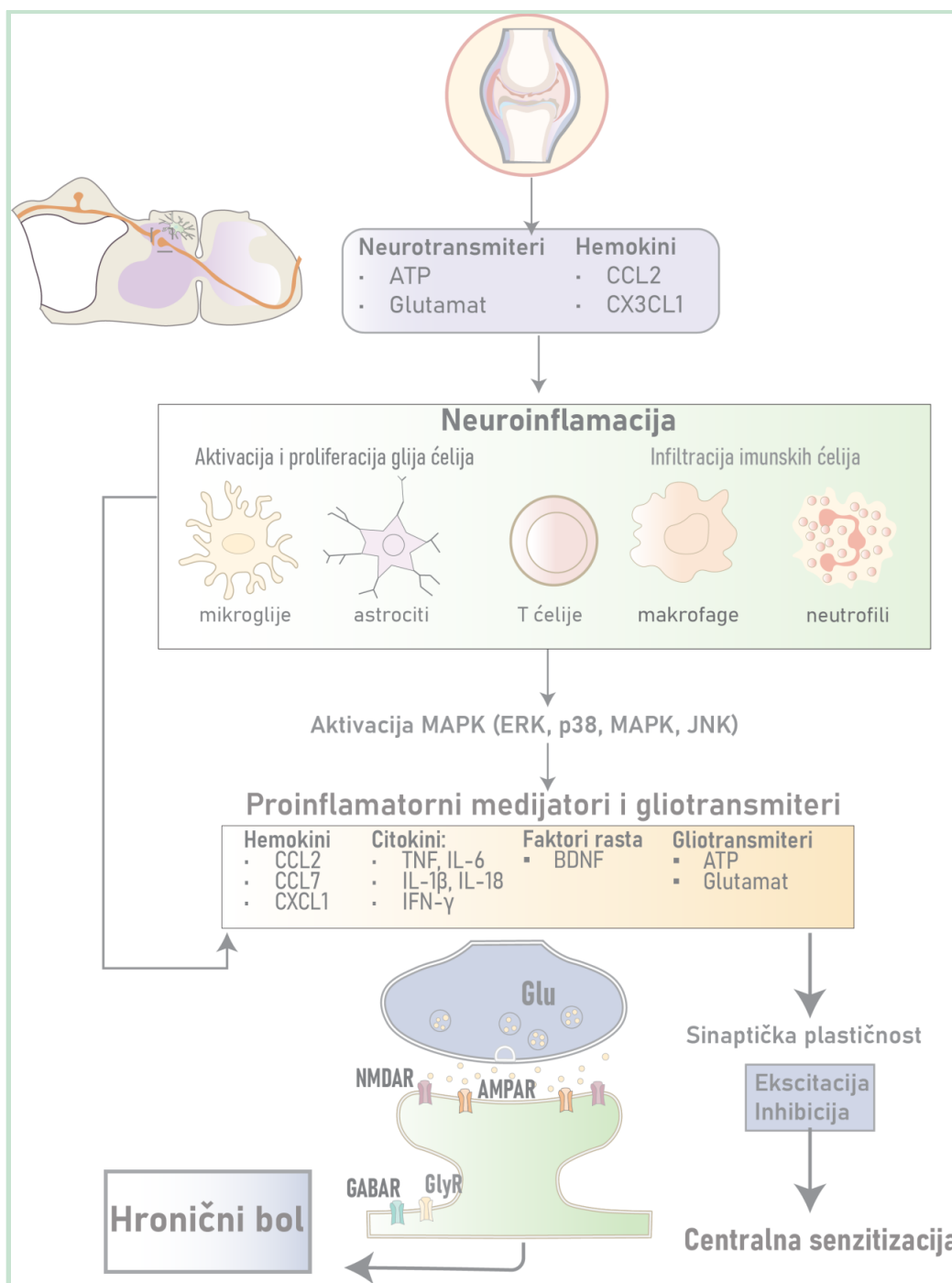
■ Neuroinflamacija: zadnji rogovi kičmene moždine

Nakon povrede neurona, ali i u drugim bolnim stanjima, uključujući artritis, dolazi do aktivacije mikroglia i astrocita u centralnom nervnom sistemu. Uloga glija ćelija u razvoju bolne preosetljivosti je ekstenzivno izučavana, dominantno u modelima neuropatskog bola (Chen i sar., 2018; Inoue i Tsuda 2018). Međutim, poslednjih godina se pojavljuje sve više radova koji ukazuju na značaj aktivacije glija ćelija na nivou dorzalnih rogova kičmene moždine i u inflamatornim bolnim stanjima, uključujući i osteoartritis. U modelu osteoartritisa izazvanog monodacetatom (Kawarai i sar., 2018; Ogbonna i sar., 2013; Orita i sar., 2011), kao i u hiruškom modelu osteoartritisa (Tran i sar., 2017), pokazana je povećana aktivacija ćelija mikroglia.

Posle povrede tkiva, ćelije mikroglie mogu biti aktivirane od strane različitih medijatora koji doprinose nastanku bola i uključuju ATP, neuropeptide (supstancu P i CGRP), citokine i hemokine, CSF-1 (engl. *colony-stimulating factor*), proteaze i dr. (Ji i sar., 2018). Ovi ligandi aktiviraju različite receptore na ćelijama mikroglie, uključujući CX3CR1, CSFR1, TLR4, purinergičke P2X4, P2X7 i P2Y12 receptore. Po aktivaciji ovih receptora dolazi do fosforilacije p38 MAP kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*) u spinalnim ćelijama mikroglia; posledično se povećava sinteza i sekrecija medijatora mikroglie, među

kojima su $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-18 i BDNF . Ovi medijatori povećavaju ekscitatornu sinaptičku transmisiju, dok $\text{IL-1}\beta$ i BDNF dodatno inhibiraju inhibitornu sinaptičku transmisiju. Brojne studije iz različitih laboratorija širom sveta su pokazale da inhibicija funkcije mikroglija različitim farmakološkim i genetskim alatima može ublažiti bolnu preosetljivost u animalnim modelima (Ji i sar., 2023).

Na kraju, iako je doprinos ćelija urođenog imunskog sistema (makrofage, neutrofili, mikroglije, astrociti i dr), kao i proinflamatornih citokina u tranziciji od akutnog do hroničnog bolnog stanja dobro dokumentovan, uloga ćelija stečenog imunskog sistema nije tako dobro razjašnjena (Laumet i sar., 2019). Međutim, postoje eksperimentalni nalazi koji ukazuju da posle povrede neurona, dolazi do infiltracije T ćelija na nivou oštećenog neurona, ipsilateralnih ganglija dorzalnog roga kičmene moždine, kao i na nivou kičmene moždine što doprinosi održavanju bola (Laumet i sar., 2019; Raoof i sar., 2018). T ćelije oslobađaju $\text{IFN-}\gamma$ koji pojačava nociceptivnu sinaptičku transmisiju i aktivira ćelija mikroglije. Zanimljivo, pol izgleda igra važnu ulogu u značaju T ćelija u razvoju bolne preosetljivosti. Eksperimentalni nalazi ukazuju da T ćelije doprinose nastanku neuropatskog bola samo kod ženki miševa, dok ćelije mikroglije imaju važniju ulogu kod mužjaka glodara (Ji i Cheng 2023; Sorge et al. 2015).



Slika 1.3. Neuroinflamacija i razvoj hroničnog bola. AMPAR, AMPA receptor za glutamat; BDNF, neurotrofni faktor koji vodi poreklo iz mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor*); CCL2, CC-hemokin ligand 2; CCL7, CC-hemokin ligand 7; CX3CL1, CX3C-hemokin ligand 1; CXCL1, CXC-hemokin ligand 1; ERK, ekstralcelularnim signalom regulisana kinaza; GABAR, receptor za γ -aminobuternu kiselinu (GABA); GlyR, receptor za glicin; IFN γ , interferon- γ ; IL-1 β , interleukin-1 β ; JNK, Jun N-terminalna kinaza; MAPK, mitogen aktivirana protein-kinaza; NMDAR, NMDA receptor za glutamat; TGF β , transformišući faktor rasta- β ; TNF, faktor nekroze tumora (*prenuzeto i prilagođeno prema Ji i sar., 2014*).

1.6. Hronični bol i komorbiditeti

Pacijenti sa hroničnim bolnim stanjima neretko imaju probleme koji prevazilaze bol sam po sebi (Bushnell i sar., 2013). Hronična bolna stanja su često udružena sa afektivnim i kognitivnim poremećajima, uključujući anksioznost, depresiju, anhedoniju i teškoće sa učenjem i pamćenjem što sve narušava njihov kvalitet života (Cohen i sar., 2021; Gerrits i sar., 2014; Hadi i sar., 2019; Liu i Chen 2014). Kao što je gore spomenuto, bol je jedno multidimenzionalno iskustvo, koje čine senzorna, afektivna i kognitivna komponenta (Navratilova i Porreca 2014). Jedna od pretpostavki je da upravo reorganizacija neuronskih kola motivacije i nagrade može doprineti komorbiditetima u hroničnim bolnim stanjima (Navratilova i Porreca 2014).

Biopsihosocijalni model ističe da je bol lično iskustvo koje proizilazi iz interakcije bioloških, psiholoških i socijalnih faktora (Fillingim 2017; Nicholas 2022). Prema aktuelnoj međunarodnoj klasifikaciji bolesti, MKB-11, **primarni hronični bol** se između ostalog definiše i kao bol koji je povezan sa značajnim emocionalnim distresom (npr. ljutnja, anksioznost, depresivno raspoloženje) i/ili značajnom funkcionalnom onesposobljenošću (utiče na svakodnevne aktivnosti, hobije i učešće u socijalnim aktivnostima) (Nicholas i sar., 2019) (**Slika 1.4**). Nova klasifikacija MKB-11 prepoznaje da različiti faktori mogu uticati na bol i da pacijenti zahtevaju multidisciplinarni pristup.

Pored toga, kod pacijenata sa osteoartritisom, koji predstavlja jedan od najčešćih uzroka hroničnog bola, neretko se viđaju i drugi komorbiditeti, kao što su kardiovaskularne bolesti što dodatno komplikuje lečenje (Hunter i Bierma-Zeinstra 2019). Postojeći analgetici uglavnom ne utiču na komorbiditete ili mogu da ih pogoršaju.

1.6.1. Hronični bol i kognitivna disfunkcija: neurobiološka osnova

Kognitivni deficiti kao što su smanjenje pažnje, problemi sa učenjem i pamćenjem, kao i sa donošenjem odluka i kognitivnom fleksibilnošću su neretko prijavljivani kod pacijenata sa hroničnim bolnim stanjima (Cowen i sar., 2018; Phelps i sar., 2021b). S druge strane, kognitivno zahtevni zadaci mogu umanjiti percepciju bola (Moriarty i Finn 2014). Veza između hroničnog bola i kognitivne disfunkcije je kompleksna i zavisi od različitih faktora. Na primer, oštećenje pažnje je primećeno samo kod najtežih zadataka kod pacijenata koji su opisali da imaju visok intenzitet bola, ali ne i kod onih sa manjim intenzitetom bola. Stoga, uticaj bolom-izazvanog kognitivnog oštećenja na dnevne aktivnosti je posledica različitih faktora, uključujući intenzitet i dužinu trajanja bola, težinu kognitivnih zadataka, starosti pacijenta, ali i lekova koje pacijent primenjuje (Phelps i sar., 2021a, 2021b). Neki od lekova koji se koriste u terapiji bola poput opioda i gabapentinoida mogu da oštete memoriju (Phelps i sar., 2021b).

Iako mehanizmi uključeni u bolom izazvano kognitivno oštećenje nisu razjašnjeni, prepoznato je da bol i kognicija dele zajedničke neuroanatomske i neurohemijske supstrate; funkcionalne imidžing studije su otkrile značajno preklapanje regija mozga uključenih u kognitivne funkcije i modulaciju bola, prevashodno prefrontalni korteks (zadužen za donošenje odluka i egzekutivne funkcije) i prednji cingulatni korteks (uključen u selektivnu pažnju i pamćenje) (Attal i sar., 2014; Moriarty i sar., 2011). Pored toga, kod pacijenata sa hroničnim bolnim stanjima, kao i u animalnim modelima bola, uočene su strukturne i funkcionalne promene u prefrontalnom korteksu i hipokampusu (ključna regija mozga uključena u učenje i pamćenje) (Apkarian i sar., 2004; Han i sar., 2024; Mutso i sar., 2012; Phelps i sar., 2021a).

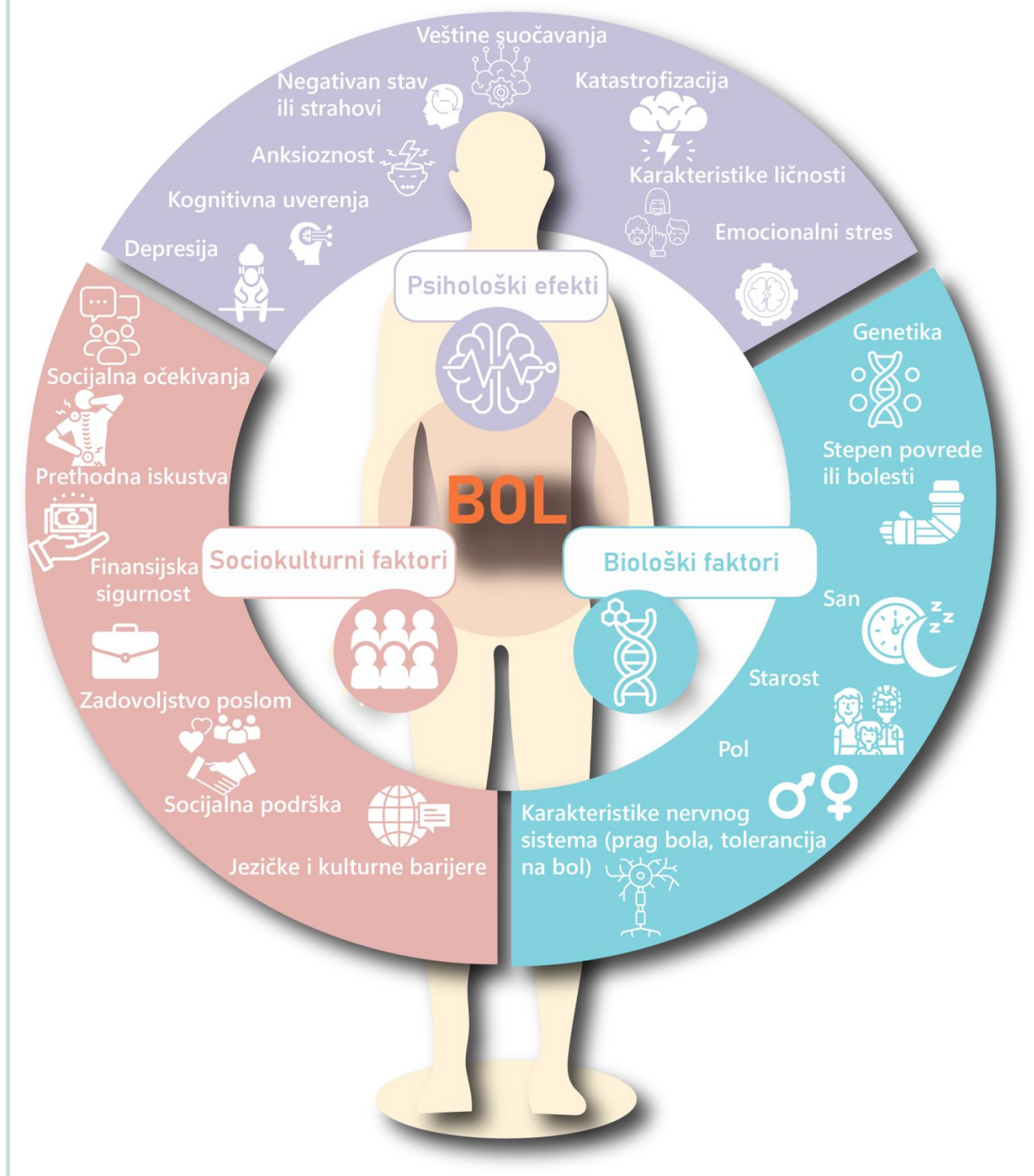
Nekoliko neurotransmiterskih sistema je uključeno i u procese modulacije bola, ali imaju važnu ulogu i u kognitivnim procesima.

Glutamat, kao glavni ekscitatorni neurotransmiter u CNS-u, ima važnu ulogu u kognitivnim procesima (Han i sar., 2024). Svoje efekte ostvaruje preko postsinaptičkih jonotropnih glutamatnih receptora, NMDA, AMPA, kainatskih i metabotropnih glutamatnih receptora. Aktivacija NMDA receptora je važna u ostvarivanju dugotrajne potencijacije (engl. *long-term potentiation*) sinaptičke transmisije, koja predstavlja celularni korelat učenja i pamćenja (Hayashi 2022). Poremećaj na nivou glutamatergičke neurotransmisije i disfunkcija glutamatergičkih receptora, posebno hipofunkcija NMDA receptora se navodi kao jedan od ključnih mehanizama koji doprinose kognitivnim deficitima kod hroničnih bolnih stanja (Han i sar., 2024; Tyrtysnaia i sar., 2021; Xiong i sar., 2020). Dodatno, primena D-serina, endogenog agoniste NMDA receptora, uspešno je ublažila kognitivne deficite u modelu neuropatskog bola, gde je uočen poremećaj glutamatergičke transmisije na nivou hipokampusa (Wang i sar., 2015; Xiong i sar., 2020). Pored toga, snižen nivo glutamata na nivou prefrontalnog korteksa je povezan sa kognitivnom disfunkcijom kod pacijenata sa hroničnim bolom (Naylor i sar., 2019), kao i u animalnim modelima bola (Guida i sar., 2015; Han i sar., 2024). S druge strane, primena rastvora D-aspartata (agonista NMDA receptora) je ublažila kognitivne deficite kod miševa u modelu neuropatskog bola i uspostavila glutamatergičku neurotransmisiju do fiziološkog nivoa u prefrontalnom korteksu (Palazzo i sar., 2016).

Monoamini, **noradrenalin i serotonin** imaju važnu ulogu u modulaciji bola, ali i formiranju memorije (Han i sar., 2024; Holland i sar., 2021). Podaci iz humanih i animalnih studija ukazuju na gubitak noradrenergičkih neurona kod neurodegenerativnih bolesti. Atomoksetin, inhibitor preuzimanja noradrenalina, pokazao je povoljne efekte na kognitivne funkcije kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću i blagim kognitivnim poremećajem (Levey i sar., 2022). Pored toga, eksperimentalni podaci ukazuju na smanjenje nivoa noradrenalina u frontalnom korteksu i hipokampusu kod životinja sa osteoartritisom (Mlost i sar., 2018). S druge strane, za lekove koji potenciraju noradrenergičku neurotransmisiju je pokazano da mogu poboljšati kognitivne deficite u animalnim modelima hroničnog bola (Phelps i sar., 2021).

U animalnim modelima hroničnog bola je pokazano povećanje nivoa **serotonina** u hipokampusu, sa potencijalno štetnim efektom na neurogenezu (Ding i sar., 2021; Kędziora i sar., 2021). Serotonin ima kompleksnu ulogu u kognitivnim procesima, verovatno zbog različitih podtipova serotonergičkih receptora i njihove uloge (Han i sar., 2024). Serotonergički 5-HT_{1A} receptori su eksprimirani u prefrontalnom korteksu i hipokampusu, i verovatno aktivacijom 5-HT_{1A} autoreceptora, serotonin poboljšava kognitivne funkcije (smanjujući oslobađanje serotonina), dok suprotan efekat ostvaruje aktivacijom postsinaptičkih 5-HT_{1A} receptora (Cowen i Sherwood 2013). Serotonergički 5-HT₃ receptori su primarno lokalizovani na GABA-ergičkim interneuronima u prefrontalnom korteksu, gde utiču na holinergičku, dopaminergičku i glutamatergičku neurotransmisiju. Takođe, 5-HT₃ receptori se nalaze i u hipokampusu (Walstab i sar., 2010). Za antagoniste 5-HT₃ receptora, kao što je ondansetron je pokazano da mogu da poboljšaju učenje i memoriju kod pacova sa kognitivnim deficitima (Cowen i Sherwood 2013). Ovaj efekat je verovatno posledica povećanja glutamatergičke neurotransmije. Serotonergički 5-HT₇ receptori su eksprimirani na glutamatergičkim neuronima u hipokampusu, korteksu, talamusu i *nuclei raphe*. Eksperimentalne studije ukazuju i da bi inhibicija 5-HT₇ receptora mogla da poboljša radnu memoriju kod pacijenata sa glutamatergičkom disfunkcijom (Cowen i Sherwood 2013).

Biopsihosocijalni model bola



Slika 1.4. Biopsihosocijalni model bola (preuzeto i prilagođeno prema Cohen i sar., 2021).

1.7. Hronični bol: uticaj pola

Epidemiološke studije ističu da se najčešća hronična bolna stanja, uključujući bol u leđima, druge bolove mišićno-skeletnog porekla, glavobolje i osteoartritis češće viđaju kod osoba ženskog pola. Pored toga, eksperimentalne studije nedvosmisleno ukazuju da su osobe ženskog pola osetljivije na bol i pokazuju manju toleranciju u odnosu na osobe muškog pola, nezavisno od kvaliteta primenjenog bolnog stimulusa (električni, ishemični, hladni, toplotni, mehanički) ili praćenog parametra (Mogil 2020).

Pri izučavanju polno-specifičnih razlika, važno je razmotriti biološke mehanizme, ali i psiho-socijalni uticaj. Na primer, u mnogim kulturama se od muškaraca očekuje stoicizam, kontrola i nezavisnost, dok se ženama pripisuje emocionalna izražajnost i briga. Stoga se pretpostavlja da se neke od polnih razlika mogu pripisati razlikama u spremnosti polova da prijave da ih nešto boli (Keogh 2022).

Kao što je gore spomenuto, ćelije imunskog sistema, kao i neuroimunske interakcije imaju važnu ulogu u transmisiji bola, ali i razvoju/održavanju hroničnog bola. Interesantno, sve više podataka iz eksperimentalnih studija ukazuje na postojanje polno-specifičnih kvalitativnih razlika u neuroimunskim interakcijama koje doprinose održavanju hroničnog bola. Pokazano je da aktivacija signalnih puteva spinalnih ćelija mikroglija ima važniju ulogu u razvoju bolne preosetljivosti nakon povrede neurona ili inflamacije kod životinja muškog pola, efekat koji je zavisen od testosterona (Gregus i sar., 2021; Mapplebeck i sar., 2016; Mogil 2020; Rosen i sar., 2017; Sorge i sar., 2011, 2015). S druge strane, infiltracija T ćelija adaptivnog imunskog sistema ima važniju ulogu kod ženki miševa u razvoju bolne preosetljivosti (Rosen i sar., 2017; Sorge i sar., 2015).

Kod životinja oba pola u modelima neuropatskog i inflamatornog bola dolazi do mikroglioze (Mogil i sar., 2024). Međutim, inhibicijom mikroglije primenom neslektivnih inhibitora ili blokadom p38 signalne kaskade, purinergičkih P2X4 receptora, receptora za hemokine CX3CR1 dolazi do ublaženja bolne preosetljivosti kod mužjaka, ali ne i kod ženki (Mogil i sar., 2024). Kod mužjaka miševa, nakon periferne povrede neurona, dolazi do povećane ekspresije P2X4 receptora na ćelijama mikroglije, posledično dolazi do aktivacije p-38-zavisne kaskade i oslobađanja BDNF, koji se vezuje za TrkB receptore i dovodi do dezinhibicije spinalnih nociceptivnih neuronskih kola (Mapplebeck i sar., 2016). Kod ženki miševa, BDNF nije uključen u održavanje neuropatskog bola nakon povrede neurona. Međutim, važno je naglasiti da kod životinja oba pola dolazi do razvoja poredbene bolne preosetljivosti, u eksperimentalnim modelima bola. Stoga, očekivano je da i kod ženki glodara postoje ćelije imunskog sistema koje doprinose održavanju bolne preosetljivosti, po analogiji sa ćelijama mikroglije kod mužjaka životinja. Najviše eksperimentalnih dokaza ukazuju na značaj T ćelija adaptivnog imunskog sistema. Ipak, interesantan je nalaz da kod ženki miševa sa nedostatkom T ćelija dolazi do "prebacivanja" na signalni put mikroglije (Sorge i sar., 2015).

Od uvođenja Akta o revitalizaciji nacionalnih instituta za zdravlje (engl. *National Institutes of Health Revitalization Act*) Sjedinjenih Američkih Država 1993. godine, kliničke studije su u obavezi da uključe ispitanike ženskog pola. Međutim, takav zakon ne postoji kada su u pitanju pretkliničke studije. Pored epidemiološke realnosti, pretkliničke studije dominantno koriste životinje muškog pola u oblasti istraživanja bola. Ovo je delom zbog uverenja da će hormonske fluktuacije kod životinja ženskog pola dovesti do veće varijabilnosti eksperimentalnih rezultata (Mogil 2020). Ipak, empirijske studije iz oblasti istraživanja bola, kao i šire studije iz oblasti biomedicine su pokazale da to nije slučaj (Mogil 2020). Ovo ne znači da fluktuacije hormona tokom estrusa ne mogu dovesti do varijabilnosti i modulisati bolnu preosetljivost, već sugerišu da takva varijabilnost ne nadmašuje varijabilnost koju vidamo kod mužjaka glodara (za koje se pretpostavlja da uključuju dominaciju i agresiju unutar kaveza) (Beery 2018). Dakle, pokazano je da uključivanje ženki u pretkliničke studije ne zahteva korišćenje većeg broja životinja. U

skladu sa tim, vladina agencija za biomedicinska istraživanja u Sjedinjenim Američkim Državama, *National Institutes of Health*, od 2016. godine uvodi obavezno uključivanje životinja oba pola (osim ako ne postoje specifični razlozi da se isključi jedan ili drugi pol), kako bi finansirala istraživanja, a sličan trend se pojavljuje i u mnogim evropskim zemljama i Kanadi (Mogil 2020). Ovim naglašavamo da direktno poređenje između polova kada su u pitanju modeli hroničnog bola uglavnom nedostaje.

1.8. Vortiooksetin – mehanizam dejstva, prokognitivni potencijal i antinociceptivni efekti

Vortiooksetin je multimodalni antidepresiv, relativno novijeg datuma. Od strane Američke agencije za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) odobren je u septembru 2013. godine za primenu u terapiji velikog depresivnog poremećaja, a u oktobru iste godine je odobren i od strane Evropske agencije za lekove (engl. *European Medicines Agency, EMA*) (Sanchez i sar., 2015). Multimodalnost u mehanizmu dejstva vortiooksetina podrazumeva inhibiciju transportera za preuzimanje serotonina (engl. *serotonin transporter, SERT*), kao i direktnu modulaciju serotonergičkih receptora; antagonizam na nivou 5-HT₃, 5-HT₇ i 5-HT_{1D} receptora, agonizam na nivou 5-HT_{1A} receptora i parcijalni agonizam na nivou 5-HT_{1B} receptora (Slika 1.5).

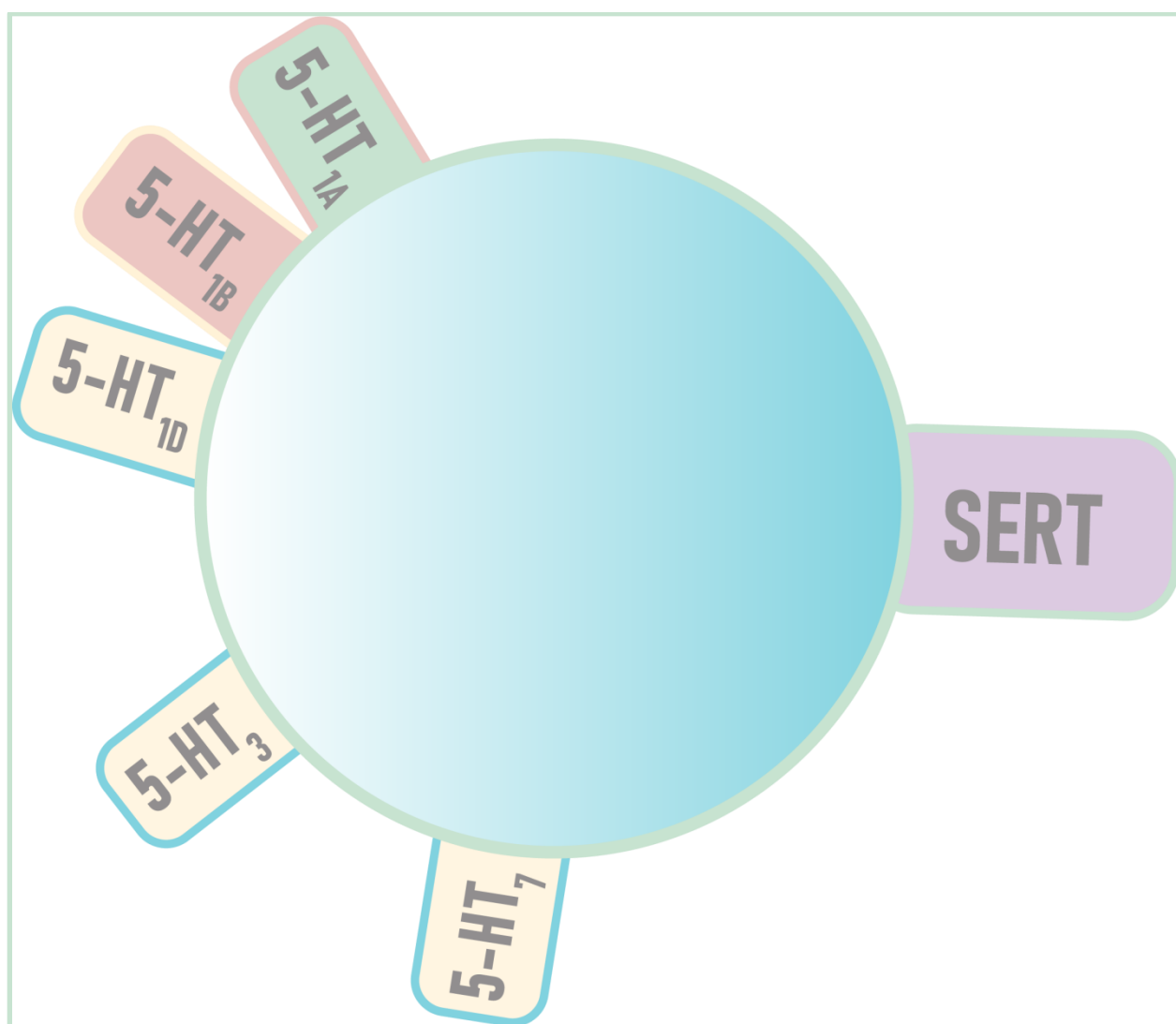
Ono što najviše izdvaja vortiooksetin od drugih antidepresiva jeste **prokognitivni potencijal** koji je zabeležen kod pacijenata sa velikim depresivnim poremećajem, ali i u različitim pretkliničkim studijama (Bennabi i sar., 2019; Huang i sar., 2022; Mahableshwarkar i sar., 2015; Sanchez i sar., 2015). Meta-analize su pokazale da i antidepresivi iz grupe SSRI i SNRI mogu u izvesnom stepenu poboljšati kognitivne deficite povezane sa velikim depresivnim poremećajem, ali isto tako je pokazano da vortiooksetin poseduje povoljniji efekat na kognitivne funkcije u poređenju sa konvencionalnim antidepresivima (Bennabi i sar., 2019). Prokognitivni potencijal se može pripisati upravo direktnoj modulaciji serotonergičkih 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT₃ i 5-HT₇ receptora za koje je pokazano da mogu uticati na kognitivne funkcije i posledično modulaciju holinergičke, noradrenergičke, histaminergičke i glutamatergičke neurotransmisije (Bennabi i sar., 2019; Sanchez i sar., 2015).

Nakon SERT-a, vortiooksetin ima najveći afinitet za 5-HT₃ receptore čime se delom može objasniti i prokognitivno dejstvo leka. Imunohistohemijske studije su pokazale da su 5-HT₃ receptori lokalizovani na GABA-ergičkim interneuronima u regiji korteksa i hipokampusa (Pehrson i Sanchez 2014). Aktivacija ovih receptora dovodi do ekscitacije GABA-ergičkih neurona. Blokada 5-HT₃ receptora na GABA-ergičkim interneuronima, dovodi do inhibicije oslobađanje GABA-e i posledično do dezinhibicije oslobađanja glutamata, koji se smatra jednim od ključnih neurotransmitera u obradi kognitivnih informacija (Sanchez i sar., 2015; Stahl 2015c). Povećano oslobađanje glutamata u prefrontalnom korteksu i hipokampusu povećava dugotrajnu potencijaciju (engl. *long-term potentiation*), celularni mehanizam učenja i pamćenja (Hayashi 2022). *In vivo* studije na prefrontalnom korteksu pacova su pokazale da se modulacija glutamatergičke neurotransmisije pod uticajem vortiooksetina viđa u klinički relevantnim dozama leka (5-20 mg/dan) (Sanchez i sar., 2015).

Pored toga, povećanje ekstracelularnog nivoa acetilholina (značajan za učenje i pamćenje) i histamina (važan za održavanje pažnje, pobuđenosti i pamćenja) u medijalnom prefrontalnom korteksu može doprineti pozitivnim efektima vortiooksetina kod kognitivnih deficita (Bennabi i sar., 2019; Sanchez i sar., 2015; Stahl 2015b). Stimulacija postsinaptičkih 5-HT_{1A} receptora povećava oslobađanje acetilholina na nivou korteksa i hipokampusa od strane vortiooksetina. Dodatno, blokada 5-HT₃ receptora dovodi do dezinhibicije oslobađanja acetilholina uticajem na GABA-ergičke interneurone (Sanchez i sar., 2015; Stahl 2015a, 2015b).

Vortioksetin je pokazao i analgetska svojstva kod pacijenata sa sindromom žarećeg bola u ustima (engl. *burning mouth syndrome*), ali i u animalnim modelima neuropatskog bola (**Tabela 1.1**). Ovo je delom i očekivano, imajući u vidu da se antidepresivi široko koriste u terapiji neuropatskih bolnih stanja (Finnerup i sar., 2021). Međutim, uzimajući u obzir multimodalnost vortioksetina i uticaj na neurotransmitere važne u modulaciji bola (serotonin, noradrenalin, acetilholin i dr.), osnovano je pretpostaviti da bi vortioksetin mogao biti efikasan i u lečenju drugih bolnih stanja, uključujući i one sa inflamatornom komponentom.

Na kraju, vortioksetin prati povoljniji bezbednosni profil u poređenju sa drugim antidepresivima, koji podrazumeva nižu incidencu poremećaja spavanja, seksualne disfunkcije, dobijanja u telesnoj težini, kardiovaskularnih promena i simptoma obustave (verovatno zbog dužeg poluvremena eliminacije) (De Diego-Adeliño i sar., 2022). Najčešći neželjeni efekat vortioksetina je mučnina, koja je uglavnom prolaznog karaktera i blagog do umerenog intenziteta (De Diego-Adeliño i sar., 2022).



Slika 1.5. Mehanizam dejstva vortioksetina. Vortioksetin blokira SERT, ostvaruje antagonizam na nivou 5-HT₃, 5-HT₇ i 5-HT_{1D} receptora, agonizam na nivou 5-HT_{1A} receptora i parcijalni agonizam na nivou 5-HT_{1B} receptora (*prenuzeto i prilagođeno prema Stahl 2015d*).

Tabela 1.1. Kliničke i pretkliničke studije u kojima je pokazan analgetički efekat vortioksetina.

Model bola/studija	Najznačajniji rezultat	Referenca
Randomizovana otvorena studija; poređenje efekata vortioksetina sa drugim antidepresivima kod pacijenata sa sindromom žarećeg bola u ustima	Vortioksetin je pokazao efikasnost kod pacijenata sa sindromom žarećeg bola u ustima; u poređenju sa drugim antidepresivima ispoljio je manje neželjenih efekata sa bržim nastupom dejstva.	Adamo i sar., 2020
Streptozotocinom indukovani dijabetes	Vortioksetin (5 i 10 mg/kg tokom 2 nedelje) je povećao mehanički prag povlačenja šape dijabetičnih pacova. Pokazano je učešće adrenergičkih α_2 i β_2 , dopaminergičkih $D_{2/3}$ i muskarinskih holinergičkih receptora.	Turan Yücel i sar., 2023
Rezerpinom indukovana fibromijalgija	Vortioksetin (10 mg/kg, i.p.) je smanjio taktilnu alodiniju kod miševa. Dodatno, pokazao je anksiolitičke efekte.	Salat i Furgala-Wojas 2021
Oksaliplatinom indukovana neuropatija	Vortioksetin (1-10 mg/kg, p.o.) je značajno i doзно-zavisno smanjio mehaničku i hladnu alodiniju u von Frey i acetone testu, redom kod miševa. Efekti su bili prisutni i nakon ponavljanja i nakon akutne primene leka.	Micov i sar., 2020
Neuropatski bol izazvan povredom išijadičnog nerva	Vortioksetin (10 mg/kg, i.p. tokom 27 dana počevši 14. dana nakon povrede) je povećao mehanički prag kod miševa sa neuropatskim bolom.	Zuena i sar., 2018
Inflamatorni bol izazvan supkutanom injekcijom kompletnim Freudovim adjuvansom (CFA) u zadnju šapu miševa	Vortioksetin (10 mg/kg, i.p. tokom 10 dana, počevši 3 h nakon injekcije CFA) nije ostvario značajan efekat u modelu inflamatornog bola.	
Nociceptivni testovi	Vortioksetin (10 i 20 mg/kg) je ostvario značajne efekte u testu izmicanja repa (engl. <i>tail-clip test</i>), testu uranjanja repa u toplu vodu (engl. <i>tail-immersion test</i>) i testu vruće ploče (engl. <i>hot-plate test</i>). Pokazana uključenost serotonergičkih 5-HT _{1A} i opioidnih receptora.	Turan Yücel i sar., 2021

2. Ciljevi rada

Ciljevi doktorske disertacije su bili sledeći:

1. Ispitivanje antinociceptivnog efekta vortioksetina u eksperimentalnim modelima akutnog inflamatornog bola i mehanizama dejstva vortioksetina u animalnom modelu trigeminalnog bola.

- 1.1. Ispitivanje antinociceptivnog efekta vortioksetina u modelu inflamatornog trigeminalnog bola (orofacijalni formalinski test) praćenjem uticaja leka na dužinu nociceptivnog ponašanja miševa *Swiss Webster* soja u prvoj i drugoj fazi testa.
- 1.2. Ispitivanje antinociceptivnog efekta vortioksetina u modelu inflamatornog visceralnog bola (test grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom) praćenjem uticaja leka na broj abdominalnih grčeva miševa *Swiss Webster* nakon intraperitonealne primene sirćetne kiseline.
- 1.3. Ispitivanje antinociceptivnog efekta vortioksetina u modelu inflamatornog somatskog bola (model karageninske inflamacije šape) praćenjem uticaja leka na mehaničku preosetljivost šape pacova *Wistar* soja nakon intraplantarne injekcije karagenina.

1.4. Ispitivanje mehanizama dejstva vortioksetina u modelu trigeminalnog bola korišćenjem farmakološkog pristupa - primenom odgovarajućih receptorskih antagonista:

- selektivnog antagoniste serotoninskih 5-HT_{1B/1D} receptora (GR 127935)
- selektivnih antagonista adrenergičkih α_1 (prazosin), α_2 (johimbin) i β_1 (metoprolol) receptora
- neselektivnog antagoniste muskarinskih holinergičkih receptora (atropin) i selektivnog antagoniste α_7 nikotinskih holinergičkih receptora (metililakonitin).
- selektivnih antagonista kanabinoidnih CB₁ (AM251) i CB₂ (AM630) receptora
- selektivnog antagoniste adenozičkih A₁ receptora (DPCPX).

2. Ispitivanje antinociceptivnog efekta vortioksetina u modelu osteoartritisa kolena (monojodoacetatom indukovani osteoartritis).

Ispitivanje antinociceptivnog efekta vortioksetina u modelu osteoartritisa kolena kod mužjaka i ženki pacova *Wistar* soja (monojodoacetatom indukovani osteoartritis) praćenjem uticaja leka na funkcionalnu onesposobljenost, mehaničku i hladnu preosetljivost eksperimentalnih životinja i poređenje efekata sa duloksetinom (lek koji je zvanično odobren za lečenje osteoartritisa).

3. Ispitivanje mehanizama dejstva vortioksetina u animalnom modelu osteoartritisa.

Ispitivanje mehanizama dejstva vortioksetina u modelu osteoartritisa indukovani monojodoacetatom praćenjem uticaja leka na gensku ekspresiju markera bolne preosetljivosti kod osteoartritisa na perifernom i centralnom nivou puta bola, kao i uticaja leka na parametre oksidativnog stresa u kolenu eksperimentalnih životinja.

- Ispitivanje uticaja leka na promene relativne ekspresije gena za *Il-1 β* , *Tnf- α* i *Ngf*, kao i parametre oksidativnog stresa u kolenu eksperimentalnih životinja.
- Ispitivanje uticaja leka na promene relativne ekspresije gena za *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Ngf*, *Bdnf* i *Tac1* u L3-L5 ipsilateralnim spinalnim ganglijama i L3-L5 segmentu kičmene moždine eksperimentalnih životinja.

4. Ispitivanje uticaja vortioksetina na kognitivne performanse eksperimentalnih životinja u modelu osteoartritisa indukovanog monojodoacetatom korišćenjem testa prepoznavanja novog objekta (engl. *novel object recognition test, NORT*).
5. Ispitivanje bezbednosnog profila vortioksetina praćenjem uticaja leka na opštu dobrobit eksperimentalnih životinja (engl. *well-being*), motornu spretnost/sposobnost izazivanja sedacije i parametre redoks statusa/histološke promene kardiomiocita u modelu osteoartritisa.
 - 5.1. Ispitivanje uticaja leka na opštu dobrobit životinja u testu kopanja u animalnom modelu osteoartritisa izazvanog monojodoacetatom.
 - 5.2. Ispitivanje uticaja leka na motornu spretnost/sposobnost izazivanja sedacije korišćenjem *rotarod* testa u modelu osteoartritisa.
 - 5.3. Ispitivanje uticaja leka na redoks parametre u srčanom mišiću eksperimentalnih životinja u modelu osteoartritisa izazvanog monojodoacetatom.
 - 5.4. Ispitivanje uticaja leka na histološke promene kardiomiocita kod životinja sa osteoartritisom.

3. Materijal i metode

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni mužjaci miševa *Swiss Webster* soja (mase 20-30 g), kao i mužjaci i ženke pacova *Wistar* soja (mase 170-250 g). Životinje su odgajane na Odeljenju za uzgoj laboratorijskih i eksperimentalnih životinja (Institut za medicinska istraživanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd). Miševi *Swiss Webster* soja su korišćeni u orofacijalnom formalinskom testu i testu grčeva, mužjaci *Wistar* soja pacova su korišćeni u karageninskom modelu inflamacije, dok su *Wistar* pacovi oba pola korišćeni u modelu osteoartritisa izazvanog primenom monojodoacetata.

Životinje su čuvane pod standardnim laboratorijskim uslovima u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ambijentalni uslovi: temperatura $22 \pm 1^\circ\text{C}$, relativna vlažnost vazduha 60% u kontrolisanom 12-časovnom ciklusu svetlo-mrak. Životinje su bile smeštene u grupama od po pet u kavezu i imale su slobodan pristup hrani i vodi (*ad libitum*), osim tokom izvođenja eksperimentalnih merenja. Kako bi se izbegle cirkadijalne varijacije u bihevioralnom istraživanju, eksperimenti u kojima je ispitivano uslovljeno bolno ponašanje su rađeni uvek u istom periodu i to od 8 do 16 časova, dok je test kopanja (model osteoartritisa) rađen u toku noćne faze u skladu sa našim preliminarnim rezultatima i literaturnim podacima (Deacon 2006, 2009). Tretmani su bili primenjivani različitim, nezavisnim grupama od po 6-10 životinja. Zdravlje životinja je redovno praćeno od strane eksperimentatora i tehničkog osoblja. Bihevioralna merenja u modelu osteoartritisa je izvodio jedan eksperimentator, koji nije bio upoznat sa eksperimentalnim grupama. Životinje su nasumično raspoređene u eksperimentalne grupe.

Sve eksperimentalne postupke odobrila je Etička komisija za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Uprava za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (br. rešenja 323-07-03984/2017-05 i 323-07-09456/2020-05), a sprovedeni su u skladu sa Direktivom EU 2010/63/EU za eksperimente na životinjama, Pravilnikom o radu sa oglednim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i smernicama ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*). Tokom celokupnog istraživanja upotrebljeno je oko 300 miševa *Swiss Webster* soja, 120 mužjaka i 60 ženki pacova *Wistar* soja.

3.2. Eksperimentalne supstance i njihova primena

U eksperimentima su korišćene sledeće supstance:

- **Lekovite (aktivne) supstance**
 - **vortioksetin** (Brintellix®, Lundbeck, Valby, Danska), **duloksetin** (Taita®, Hemofarm AD, Vršac, Srbija)
- **Algogene supstance**
 - **formalin** (Reahem, Srbija), **sirćetna kiselina** (Zorka Pharma, Srbija), **karagenin** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), **natrijum-monojodoacetat** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka)
- **Receptorski antagonisti**
 - **GR 127935** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), antagonist serotoninских 5-HT_{1B/1D} receptora,
 - **prazosin-hidrohlorid** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), antagonist α_1 -adrenergičkih receptora,

- **johimbin-hidroklorid** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), antagonist α_2 -adrenergičkih receptora,
- **metoprolol-tartarat** (Presolol®, Hemofarm AD Vršac, Srbija), antagonist β_1 -adrenergičkih receptora,
- **atropin-sulfat** (Zhejiang Essuan, Kina), neselektivni antagonist muskarinskih holinergičkih receptora,
- **metilakakonitin** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), antagonist α_7 nikotinskih holinergičkih receptora,
- **AM251** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), antagonist kanabinoidnih CB₁ receptora
- **AM630** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), antagonist kanabinoidnih CB₂ receptora,
- **DPCPX** (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), antagonist adenozijskih A₁ receptora.

Vortiooksetin je suspendovan u vodi i primenjivan peroralno korišćenjem intragastrične sonde u finalnoj zapremini od 10 mL/kg telesne mase miševa i 2 mL/kg telesne mase pacova. U modelu osteoartritisa, primenjivan je i duloksetin (pozitivna kontrola) u vidu oralne suspenzije korišćenjem intragastrične sonde u finalnoj zapremini od 2 mL/kg telesne mase pacova, tokom 28 dana.

Rastvor formalina je pripremljen razblaživanjem komercijalno dostupnog štoka fiziološkim rastvorom do koncentracije od 2% v/v i zatim primenjen supkutano pomoću mikrolitarskog šprica i 26G igle u perinazalnu regiju miševa (20 μ L) (*orofacijalni formalinski test*). U *testu grčeva*, razblažena sirćetna kiselina (0,75% v/v) je primenjivana pomoću šprica i 26G igle intraperitonealno u zapremini od 10 mL/kg telesne mase miševa. U *modelu karageninske inflamacije*, karagenin (1% m/v) je dispergovan u fiziološkom rastvoru dan pre planiranog eksperimenta i primenjen intraplantarno korišćenjem šprica i 26G igle na dan eksperimenta (100 μ L po šapi pacova). U *modelu osteoartritisa*, monojodoacetat je neposredno pre primene rastvoren u 0,9% fiziološkom rastvoru i primenjen je pomoću mikrolitarskog šprica i 26G igle u dozi od 2 mg intraartikularno u zapremini od 25 μ L u desno koleno pacova. Životinje su najpre blago anestetizirane sevofluranom, a potom je primenjena injekcija monojodoacetata/fiziološkog rastvora.

Štok rastvori odgovarajućih antagonista su pripremljeni rastvaranjem antagonista u destilovanoj vodi (GR 127935, atropin, metilakakonitin) ili dimetilsulfoksidu (prazosin, johimbin, AM251, AM630 i DPCPX), a neposredno pre primene su razblaženi fiziološkim rastvorom do odgovarajuće koncentracije; komercijalni rastvor metoprolola za injekcije je razblažen fiziološkim rastvorom. Rastvori antagonista su primenjeni intraperitonealno u zapremini od 10 mL/kg telesne mase miševa.

3.3. Eksperimentalni modeli akutnog inflamatornog bola i protokol eksperimenata

3.3.1. Model inflamatornog trigeminalnog bola

Kao **model inflamatornog trigeminalnog bola**, korišćen je orofacijalni formalinski test. Test je izvođen prema *Luccarini i sar.* (2004) uz nekoliko modifikacija. Trideset minuta pre početka testa miševi *Swiss Webster* soja su ostavljani da se adaptiraju na komore za posmatranje od pleksiglasa (30 $\times$ 25 $\times$ 25 cm³). Nociceptivno ponašanje je izazivano supkutanom injekcijom formalina u gornji desni lateralni deo njuške miševa. Nakon toga, miševi su vraćani u komoru za posmatranje i praćeno je vreme koje životinje provedu u nociceptivnom ponašanju (trljanje njuške ipsilateralnom prednjom ili zadnjom šapom) tokom 45 minuta (**Slika 3.1**). Injekcija formalina izaziva karakteristično bifazno nociceptivno ponašanje kod miševa, kao posledica različitih mehanizama uključenih u nastanak bola; prva faza traje kratko, javlja se neposredno nakon injekcije formalina (0-9 min) i većinom je posledica direktne aktivacije nociceptora od strane formalina; druga faza je dugotrajnija (9-45 min) i javlja se kao posledica inflamatorne reakcije na mestu injekcije formalina i promena na nivou centralnih neuronskih puteva koje olakšavaju transmisiju

nociceptivnih informacija (Sawynok i Liu 2003b). Vreme koje su miševi proveli u nociceptivnom ponašanju beleženo je u intervalima od 3 minuta (ukupno 15 intervala) i izraženo kao ukupno (kumulativno) vreme (T) provedeno u trljanju njuške prednjom i zadnjom ipsilateralnom šapom u prvoj i drugoj fazi testa.

U orofacijalnom formalinskom testu je praćeno sledeće:

a) antinociceptivni efekat vortioksetina (4 doze) i

b) mehanizam antinociceptivnog dejstva vortioksetina.

a) Oralna suspenzija vortioksetina ili vehikulum (destilovana voda, u kontrolnoj grupi) je primenjena *per os* 60 minuta pre injekcije formalina, nakon čega je praćen uticaj leka na dužinu nociceptivnog ponašanja u formalinskom testu. Procenat antinociceptivne aktivnosti (%AN) vortioksetina je računat preko kumulativnog vremena (T) koje su životinje provele u trljanju njuške prema sledećoj formuli:

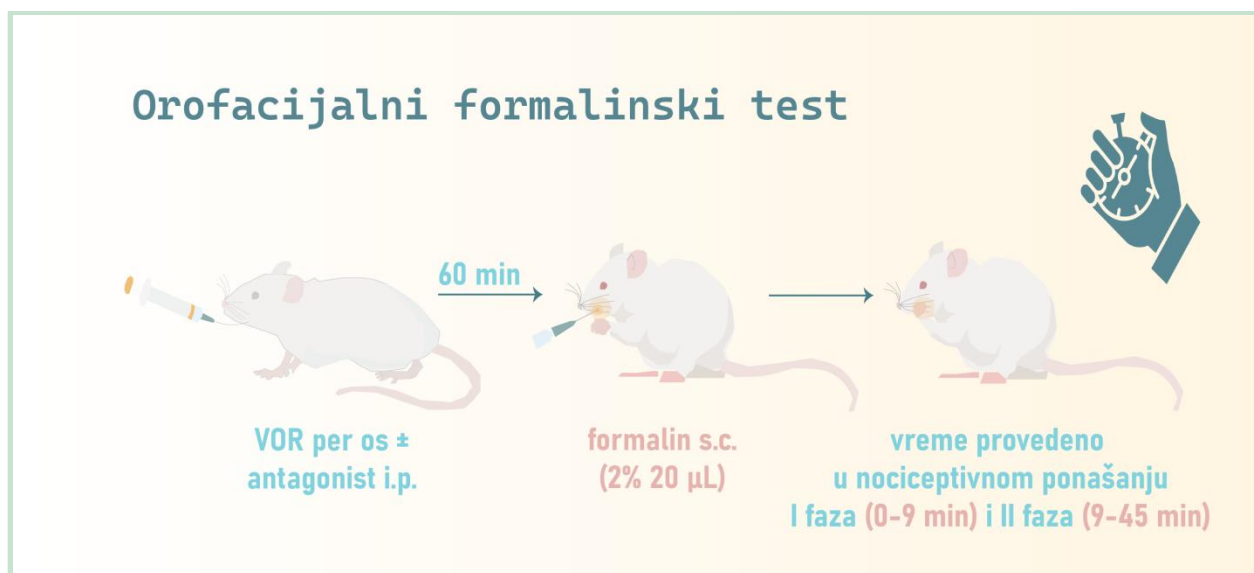
$$\%AN = \frac{(\text{srednja vrednost T kontrolne grupe} - \text{T pojedinačne životinje u test grupi})}{\text{srednja vrednost T kontrolne grupe}} \times 100$$

U ovom eksperimentu vortioksetin je primenjen sistemski u četiri različite doze i izračunata je srednja efektivna doza (ED₅₀) primenom linearne regresione analize odnosa log doze i antinociceptivnog efekta (Tallarida, 2000; Tallarida i Murray, 1986).

b) Za ispitivanje potencijalnih mehanizama vortioksetina u modelu inflamatornog trigeminalnog bola (orofacijalni formalinski test) korišćen je farmakološki pristup (primenom odgovarajućih antagonista serotonergičkih, adrenergičkih, holinergičkih, kanabinoidnih i adenozijskih receptora). Test je izveden na goreopisan način, a zajedno sa vortioksetinom je primenjen i odgovarajući antagonista intraperitonealno (neposredno nakon primene vortioksetina, 60 min pre injekcije formalina). Vortioksetin je u ovom delu istraživanja primenjivan u fiksnoj dozi koja proizvodi submaksimalni antinociceptivni efekat (15 mg/kg *per os*). Antagonisti su primenjeni u tri različite doze, kako bismo utvrdili da li postoji dozno-zavisna inhibicija antinociceptivnih efekata vortioksetina. Procenat inhibicije (%I) antinociceptivnih efekata vortioksetina od strane odgovarajućeg antagoniste je računata prema sledećoj formuli:

$$\%I = 100 - \left(\frac{\%AN \text{ u prisustvu antagoniste}}{\%AN \text{ u odsustvu antagoniste}} \right) \times 100$$

Kako bismo isključili mogućnost intrinzičkog efekta primenjenih antagonista, pratili smo i uticaj najvećih ispitivanih doza antagonista samostalno (bez vortioksetina) na dužinu nociceptivnog ponašanja u orofacijalnom formalinskom testu.



Slika 3.1 Eksperimentalni protokol orofacijalnog formalinskog testa. VOR, vortioksetin; per os, oralno; i.p., intraperitonealno; s.c., supkutano.

3.3.2. Model akutnog visceralnog bola

Kao **model inflamatornog visceralnog bola**, korišćen je test grčeva izazvanih intraperitonealnom injekcijom sirćetne kiseline. Broj grčeva je praćen tokom 15 minuta, počevši 5 minuta nakon primene sirćetne kiseline. Vortioksetin ili vehikulum (fiziološki rastvor u kontrolnoj grupi) su primenjivani 55 minuta pre rastvora sirćetne kiseline (**Slika 3.2**).

Ovaj model je korišćen za ispitivanje antinociceptivne efikasnosti vortioksetina. Antinociceptivni efekat (%AN) je računat na osnovu broja grčeva (N), korišćenjem sledeće formule (Stepanović-Petrović i sar., 2014):

$$\%AN = \frac{(\text{srednja vrednost } N \text{ kontrolne grupe} - N \text{ pojedinačne životinje u test grupi})}{\text{srednja vrednost } N \text{ kontrolne grupe}} \times 100$$

U modelu inflamatornog visceralnog bola, ispitali smo četiri različite doze vortioksetina nakon sistemske primene i izračunata je ED_{50} primenom linearne regresione analize odnosa log doze i antinociceptivnog efekta (Tallarida, 2000; Tallarida i Murray, 1986).



Slika 3.2. Eksperimentalni protokol za izvođenje modela akutnog visceralnog bola. VOR, vortiooksetin; per os, oralno; i.p., intraperitonealno.

3.3.3. Model akutnog somatskog inflamatornog bola

Kao **model somatskog inflamatornog bola**, korišćen je model inflamatorne mehaničke hiperalgezije izazvane karageninom (Morris 2003). Karagenin dovodi do bifazne inflamatorne reakcije (rana i kasna faza). Rana faza (0-1h nakon injekcije) je u vezi sa povećanim oslobađanjem serotonina, bradikina i histamina, dolazi do hiperemije i povećane kapilarne propustljivosti što rezultuje pojavom edema. U kasnoj fazi (nakon sat vremena) dolazi do migracije leukocita i oslobađanja prostaglandina.

Karagenin (1% m/v) je primenjen u zadnju desnu šapu *Wistar* pacova, a efekti vortiooksetina su praćeni u modifikovanom testu pritiska na zadnje šape (engl. *paw pressure test*). Zadnje šape pacova su oslonjene na platforme aparata (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Nemačka) koji meri silu (u gramima) oslanjanja na pojedinačnu šapu. Blagim pokretom ruke eksperimentatora, pacov se gura nadole sve dok se ne postigne vrednost težine od 100 g na jednoj od šapa. U većini slučajeva, životinja se više oslanja na zdravu šapu, štedeći bolesnu (**Slika 3.3**). Razlika težine oslanjanja između zdrave i inflamirane šape (df) je parametar koji smo koristili za procenu antinociceptivnog efekta vortiooksetina u modelu somatskog inflamatornog bola.

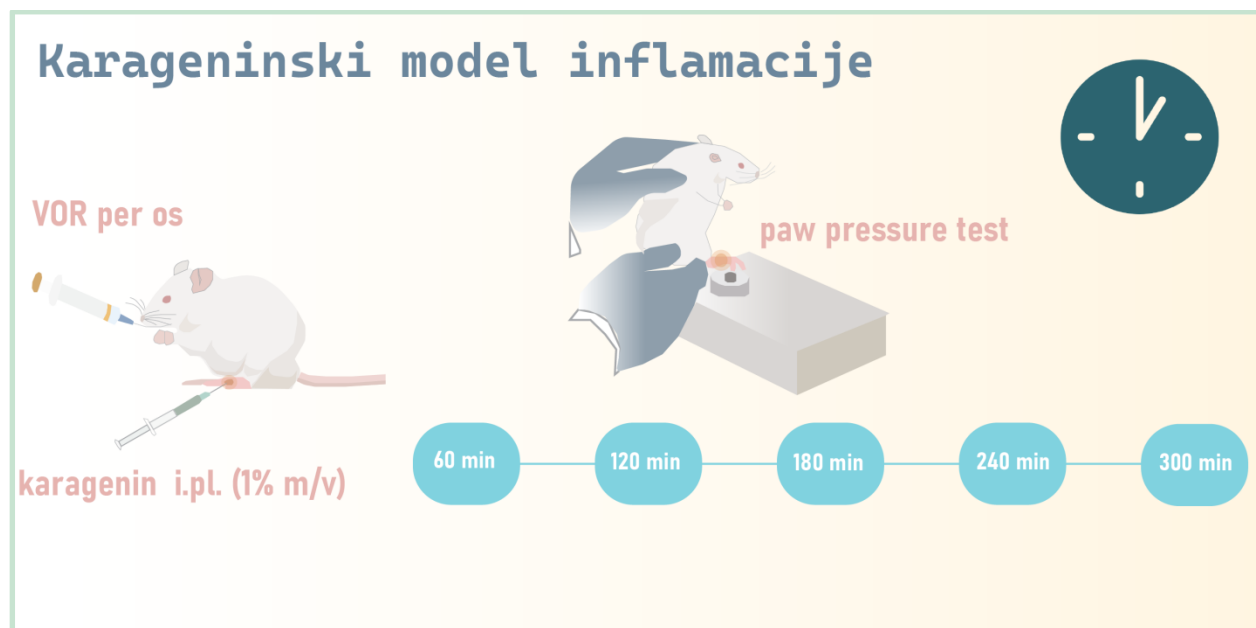
$$df = \text{sila (g) oslanjanja na neinflamiranu šapu} - \text{sila (g) oslanjanja na inflamiranu šapu}$$

Vortiooksetin ili vehikulum (fiziološki rastvor u kontrolnoj grupi) su primenjeni neposredno nakon primene karagenina (Stepanović-Petrović i sar., 2014). Bazalne df vrednosti su izmerene pre izazivanja inflamacije injekcijom karagenina i pre primene vortiooksetina/vehikuluma. Testiranje je sprovedeno u 5 vremenskih tačaka (60, 120, 180, 240 i 300 min nakon injekcije karagenina). Merenja su ponavljana četiri puta u svakoj vremenskoj tački i srednja vrednost df za svakog pacova je uzeta za dalja izračunavanja. Smatra se da agensi koji smanjuju df poseduju antihiperalgezijsku aktivnost. Antihiperalgezijska

aktivnost (%AA) vortiooksetina je računata za svaku vremensku tačku i izražena je u odnosu na kontrolnu grupu (životinje koje su primile fiziološki rastvor nakon injekcije karagenina) prema sledećoj formuli:

$$\%AA = \frac{\text{srednja vrednost df kontrolne grupe} - \text{df pojedinačne životinje u test grupi}}{\text{srednja vrednost df kontrolne grupe}} \times 100$$

U modelu inflamatornog somatskog bola, pratili smo efekte četiri različite doze vortiooksetina nakon sistemske primene i izračunali ED₅₀ primenom linearne regresione analize odnosa log doze i antinociceptivnog efekta (Tallarida, 2000; Tallarida i Murray, 1986).



Slika 3.3. Eksperimentalni protokol za izvođenje karageninskog modela inflamacije VOR, vortiooksetin; per os, oralno; i.pl., intraplantarno.

3.3.4. Rotarod test

Rotarod test je korišćen kako bismo ispitali uticaj vortiooksetina na motornu koordinaciju i sposobnost izazivanja sedacije eksperimentalnih životinja. Test je sproveden korišćenjem *rotarod* aparata (*Treadmill for mice 7600* i *Treadmill for rats 47700*; Ugo Basile, Milano, Italija), podešenog tako da rotira konstantnom brzinom od 15 obrtaja u minuti. Životinje su trenirane da održe ravnotežu na rotirajućem vretenu tokom dva uzastopna dana. Trećeg dana su miševi/pacovi testirani i smatra se da su savladali tehniku vožnje (i biće uključeni u eksperiment) ukoliko ne padnu sa rotirajućeg vretena nakon dva uzastopna merenja, od po 180 s. Kod miševa je sposobnost da ostanu na rotirajućem vretenu praćena u četiri vremenske tačke posle primene vortiooksetina/vehikuluma, tokom 120 min (tj. 30, 60, 90 i 120 min) da bi se pokrio period posmatranja u orofacijalnom formalinskom testu i testu grčeva. Kod pacova je sposobnost pacova da ostanu na *rotarod* aparatu praćena u pet vremenskih tačaka, tokom 300 min (tj. 60, 120, 180, 240 i 300 min), kako bi se pokrio period bihevioralnih merenja u modelu karageninske inflamacije šape. Efekti vortiooksetina na motornu koordinaciju pacova su praćeni kod zdravih životinja (sa neinflamiranom šapom) i pacova sa inflamiranom šapom (pod uticajem karagenina).

3.4. Eksperimentalni model hroničnog inflamatornog bola (model osteoartritisa) i protokol eksperimenata

Kao model hroničnog inflamatornog bola, koristili smo *model osteoartritisa izazvanog intraartikularnom injekcijom monojodoacetata*. Monojodoacetat dovodi do histopatoloških promena, funkcionalne onesposobljenosti zahvaćenog ekstremiteta i razvoja bolne preosetljivosti kod eksperimentalnih životinja, što u više aspekata oponaša patološke promene i simptome kod pacijenata sa osteoartritisom (Lockwood i sar., 2019).

Životinje su najpre anestetizirane sevofluranom; nakon gubitka refleksa povlačenja, obrijano je koleno, dezinfikovano etanolom (70%) i zglobov kolena je savijen pod uglom od 90°. Osteoarthritis je izazvan pojedinačnom injekcijom monojodoacetata (2 mg u zapremini od 25 µL) kroz infrapatelarni ligament desnog kolena pacova korišćenjem mikrolitarskog šprica i igle 26G. Nakon injekcije, koleno je ručno ispružano i savijano tokom 30 s kako bi se primenjena supstanca distribuirala u zglobovnu šupljinu. Kontrolne životinje (zdrava kontrola) su primile intraartikularnu injekciju fiziološkog rastvora u istoj zapremini i dalje su podvrgnute istim eksperimentalnim procedurama kao i životinje koje su primile injekciju monojodoacetata. Dan primene injekcije monojodoacetata/fiziološkog rastvora je označen kao nulti dan. Vortiooksetin i duloksetin su primenjivani peroralno, jednom dnevno tokom 28 dana trajanja eksperimenta, nakon završetka bihejvioralnih merenja (kako ne bi uticali na rezultate merenja; izuzetak je test kopanja koji se izvodi u toku noći, gde su tretmani primenjeni pre testa), počevši neposredno nakon indukcije osteoartritisa.

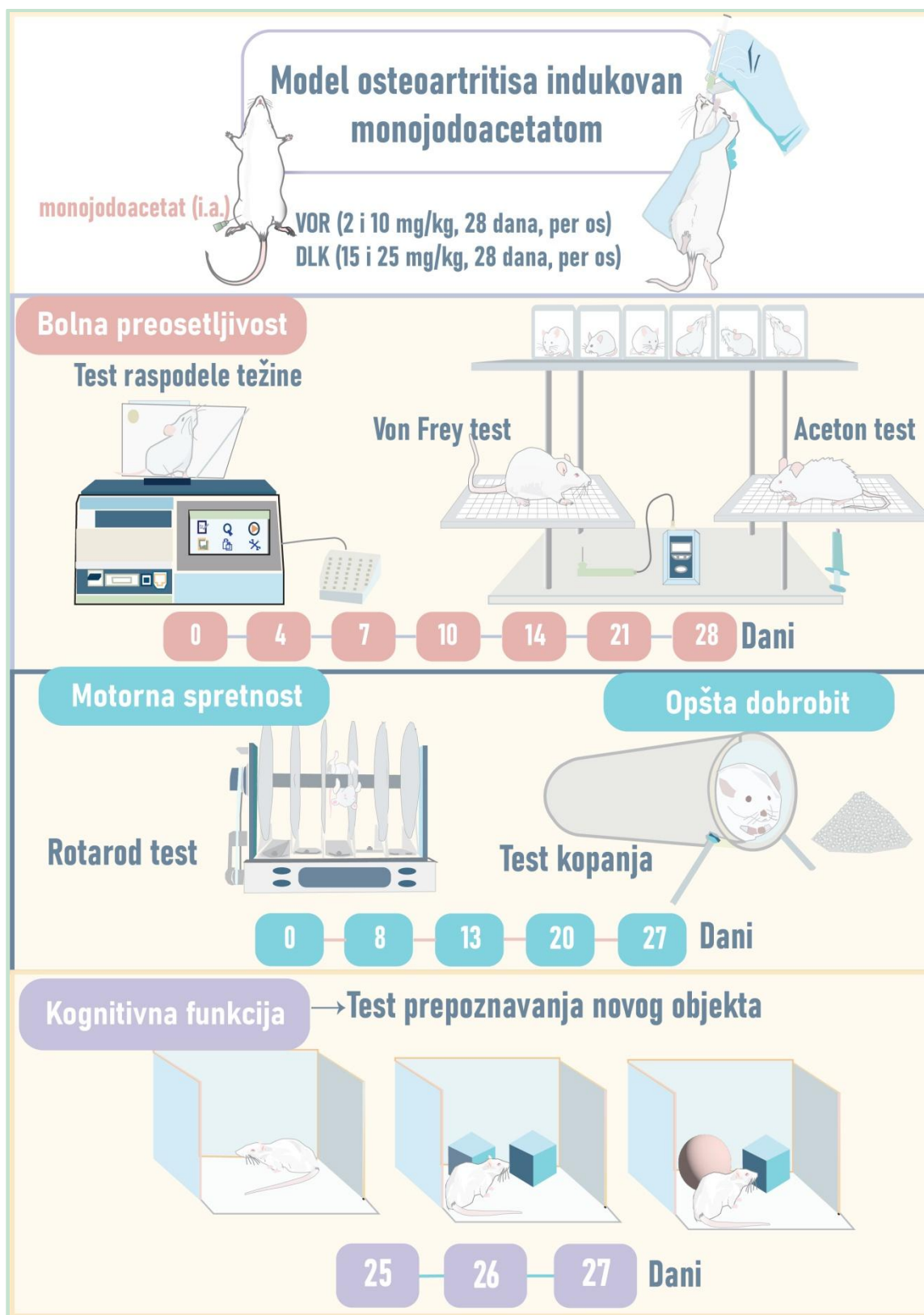
U modelu osteoartritisa praćeno je sledeće:

- *Uticaj vortiooksetina na bolno ponašanje životinja sa osteoartritisom*
- *Uticaj vortiooksetina na opštu dobrobit i motornu spretnost životinja sa osteoartritisom*
- *Uticaj vortiooksetina na kognitivne performanse životinja sa osteoartritisom*
- *Uticaj vortiooksetina na molekularne markere bolne preosetljivosti i parametre oksidativnog stresa u kolenu*
- *Uticaj vortiooksetina na molekularne markere bolne preosetljivosti u spinalnim ganglijama i kičmenoj moždini*
- *Uticaj vortiooksetina na oksidoredukcioni status i histološke promene kardiomiocita.*

Intenzitet bola, kao i sposobnost ispitivanih tretmana (vortiooksetina i duloksetina) da suprimiraju bol su praćeni u testu raspoređivanja težine između zdravog i obolelog ekstremiteta (engl. *weight-bearing*; procena funkcionalne onesposobljenosti zahvaćenog zglobova/mehaničke preosetljivosti usled opterećenja obolelog ekstremiteta sopstvenom težinom), von Frey testu (procena mehaničke preosetljivosti šape zahvaćenog ekstremiteta) i aceton testu (procena hladne preosetljivosti šape zahvaćenog ekstremiteta) u odgovarajućim vremenskim tačkama, pre (bazalne vrednosti), kao i 4, 7, 10, 14, 21 i 28 dana nakon injekcije. Opšta dobrobit (engl. *well-being*) i motorna spretnost životinja, kao i uticaj lekova na ove parametre su procenjivani pre, kao i 8, 13, 20 i 27 dana nakon injekcije u testu kopanja i *rotarod* testu, redom. Kognitivne performanse životinja sa osteoartritisom su procenjene u testu prepoznavanja novog objekta (engl. *novel object recognition test*, NORT) 27. dana nakon indukcije osteoartritisa (Slika 3.4).

Po završetku bihejvioralnih eksperimenata (28 dana nakon indukcije osteoartritisa), životinje su žrtvovane (primenom sevoflurana i cervikalnom dislokacijom) i izolovano je obolelo koleno (jedan deo kolena je korišćen za praćenje genske ekspresije markera bolne preosetljivosti, dok je drugi deo kolena korišćen za praćenje markera oksidativnog stresa u kolenu), ipsilateralne spinalne ganglije i kičmena moždina u segmentu L3-L5 i srce (jedan deo je korišćen za praćenje parametara redoks statusa, dok je drugi deo korišćen za histološku analizu kardiomiocita; srce je uvek sečeno horizontalno tako da je vrh

srca opredeljivan za histološka ispitivanja, a gornji deo za biohemijska ispitivanja). Uzorci su čuvani na - 80 °C (**Slika 3.5**).



Slika 3.4. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola bihejvioralnih eksperimenata u modelu osteoartritisa indukovanog monoiodoacetatom; VOR, vortiooksetin; DLK, duloksetin.

3.4.1. Praćenje bolnog ponašanja u modelu osteoartritisa

Životinje su habituirane na uređaje za merenje bolnog ponašanja 3 dana pre merenja bazalnih vrednosti (pre injekcije monojodoacetata/fiziološkog rastvora).

➤ Test raspoređivanja težine između zdravog i obolelog ekstremiteta (engl. *weight-bearing test*)

Test se zasniva na tendenciji životinje da izbegne bol prebacujući svoju težinu sa zadnjeg ekstremiteta sa bolnim kolonom (desnog u našem eksperimentu) na kontralateralni (levi u našem eksperimentu) ekstremitet sa zdravim kolonom. Promene u raspodeli težine između ekstremiteta merene su korišćenjem uređaja koji omogućava oslanjanje pacova na zadnje šape (*Incapacitance Tester Librae - for Mice and Rats*, Ugo Basile, Milano, Italija). Životinje su postavljene u komoru od pleksiglasa, dizajniranu da omogući oslanjanje samo na zadnje šape na različitim pedalama. Kada se životinja smiri i pravilno osloni, počinje merenje (pritiskom na pedal uređaja ili odgovarajući taster na ekranu aparata); težina (u gramima) kojom se životinja oslanja na zadnje šape se beleži na digitalnom ekranu aparata. Nakon pet merenja u trajanju od 3 s, izračunava se srednja vrednost merenja (ovaj postupak je ponavlján u svakoj vremenskoj tački). Nakon indukcije osteoartritisa, dolazi do smanjenja oslanjanja životinja na ekstremitet sa obolelim kolonom, kao odraz funkcionalne onesposobljenosti zahvaćenog zgloba. Raspodela težine (%RT) oslanjanja na desni ekstremitet je izražena kao procenat od ukupne težine oslanjanja raspoređen na ekstremitet sa obolelim kolonom prema sledećoj formuli (Lockwood i sar., 2019):

$$\%RT = \frac{\text{težina oslanjanja na desnu šapu}}{(\text{težina oslanjanja na desnu šapu} + \text{težina oslanjanja na levu šapu})} \times 100$$

➤ Von Frey test

Životinje su postavljane pojedinačno u providne, plastične komore sa metalnom mrežom na dnu što omogućava pristup zadnjima šapama. Nakon adaptacije životinja (prosečno 30 minuta), plastični semifleksibilni filament je primenjen na plantarnu površinu desne šape pacova pod pravim uglom, pri čemu se mehanička sila postepeno povećava (tako da ne izazove odizanje šape od metalne podloge) sve do pojave reakcije, trzaja šape (naglo odizanje šape od podloge). Merni parametar je upravo sila pritiska (u gramima), pri kojoj je životinja izmakla šapu u odgovoru na mehanički stimulus, mehanički prag povlačenja (engl. *Paw Withdrawal Threshold, PWT*) što se očitava na ekranu električnog von Frey aparata (IITC Life Science, Woodland Hills, CA) (Micov i sar., 2020). U svakoj vremenskoj tački postupak je ponavlján 6–8 puta i izračunata je srednja vrednost merenja. Kod životinja sa osteoartritisom dolazi do progresivnog smanjenja mehaničkog praga povlačenja što oslikava razvoj mehaničke preosetljivosti u ovom modelu.

➤ Aceton test

Test se izvodi u istim komorama kao i von Frey test, nakon završetka prethodnog. Na plantarnu regiju zadnje ipsilateralne šape pacova (desna šapa u našem eksperimentu) aplikovana je kap acetona uz pomoć šprica ravnog vrha i praćeno je vreme koje životinje provedu u nociceptivnom ponašanju (trzanje, lizanje ili trešenje nadražene šape) tokom 60 s. Merni parametar od značaja u ovom testu jeste ukupno vreme koje životinja provede u bolnom ponašanju (Micov i sar., 2020). Nakon indukcije osteoartritisa, životinje značajno više vremena provode u nociceptivnom ponašanju nakon primene hladnog stimulusa (razvoj hladne preosetljivosti).

3.4.2. Test kopanja

Kopanje je urođena aktivnost glodara i u eksperimentalnim uslovima se koristi kao svojevrsna mera „kvaliteta života“ i opšte dobrobiti eksperimentalnih životinja (engl. *well-being*), a može se tumačiti i kao mera spontanog bolnog ponašanja (Deacon 2006).

U eksperimentu su korišćene plastične tube (32 cm dužine i prečnika 10 cm) sa otvorom uzdignutim 6 cm od podloge koje su napunjene sa 2 kg šljunka (dijametra 2–6 mm). Pre indukcije osteoartritisa, životinje su najpre trenirane 3 dana kako bi se dobile bazalne vrednosti ovog parametra i isključile životinje koje su „loši“ kopači (životinje koje su iskopale ispod 500 g šljunka). Životinje su stavljene između 15 i 16 časova u kaveze sa tubama napunjenim šljunkom i ostavljene da kopaju preko noći. Merni parametar je količina šljunka (g) koje su životinje izbacile iz tube (ukupna količina je 2000 g), što se meri narednog jutra. Trening je sproveden u dve faze, socijalna i individualna faza. Prvog dana treninga (socijalna faza), pacovi su postavljeni u kaveze u paru jer je pokazano da socijalna interakcija stimuliše poriv za kopanjem (Deacon 2006). Tokom individualne faze svaka životinja je postavljena u zaseban kavez (druga i treća noć treninga), a srednja vrednost količine šljunka koje su životinje iskopale tokom druge i treće noći je uzeta kao bazalna vrednost.

3.4.3. Rotarod test

Rotarod test je sproveden u cilju validacije rezultata antinociceptivnih testova našeg istraživanja tj. isključivanja mogućnosti da su dobijeni efekti vortiooksetina i duloksetina posledica motorne inkoordinacije ili sedacije eksperimentalnih životinja (Pecikoza i sar., 2017). Ovo je od značaja upravo zbog validnog tumačenja rezultata von Frey i aceton testa gde se kao odgovori prate određene motorne radnje, pa je potrebno odbaciti mogućnost delovanja ispitivanih tretmana na motoriku/sedaciju. U testu je korišćen *rotarod* aparat (*Treadmill for rats 47700*; *Ugo Basile*, Milano, Italija), podešen tako da se rotira konstantnom brzinom od 16 obrtaja u minuti. Životinje su najpre trenirane da održe ravnotežu na rotirajućem vretenu tokom dva uzastopna dana; trećeg dana se životinje testiraju i smatra se da su savladale tehniku vožnje (i biće uključene u eksperiment) ukoliko ne padnu sa rotirajućeg vretena nakon dva uzastopna merenja, od po 300 s.

3.4.4. Test prepoznavanja novog objekta (engl. novel object recognition test, NORT)

Uticaj osteoartritisa, kao i ispitivanih tretmana (vortiooksetina i duloksetina) na kognitivne performanse životinja sa osteoartritisom, ispitan je u testu prepoznavanja novog objekta (*NORT*) (Milić i sar., 2013). Test se zasniva na urođenoj sklonosti glodara ka novinama (u ovom slučaju ka novom predmetu) (Bevins i Besheer 2006). Eksperiment je izvođen u pravougaonoj komori (65 x 45 x 45 cm³) pri slabom osvetljenju (približno 20 lux) tokom tri dana. Prvog dana testa (25. dan nakon indukcije osteoartritisa), životinje su postavljene u prazne kutije u trajanju od 10 minuta kako bi se adaptirale na eksperimentalne uslove (faza habituacije). Sledećeg dana (26. dan nakon indukcije osteoartritisa), životinje su postavljene između dva identična predmeta i spuštane u komoru tako da budu okrenute prema suprotnom zidu od predmeta (faza upoznavanja) kako bi istraživale predmete u trajanju od 5 min, nakon čega su vraćene u svoje kaveze. Faza testiranja je sprovedena nakon 24 sata (27. dan nakon indukcije osteoartritisa), pri čemu je jedan od poznatih predmeta zamenjen novim i mereno je vreme koje životinja provede sa svakim predmetom pomoću *Any-Maze video-tracking* softvera (*Stoelting Co.*, SAD) (Milić i sar., 2013). Smatra se da pacovi istražuju objekat ako se nalaze u njegovoj neposrednoj blizini (2 cm) i okrenuti su prema njemu ili ako njuškaju predmet. Tokom istraživanja su korišćeni sledeći predmeti: metalne limenke i stakleni cilindri različitih oblika i veličina (predmeti su bili dovoljno veliki da spreče životinje da ih pomere). Posle svakog testiranja, predmeti i komora su očišćeni sa 70 % etanolom kako bi se

minimizirali mirisni uticaji. Merni parametar u ovom testu je vreme koje životinja provede sa poznatim/starim (S) i novim predmetom (N), i na osnovu toga je izračunat diskriminacioni indeks (%DI) prema sledećoj formuli:

$$\%DI = \frac{N-S}{N+S} \times 100$$

3.4.5. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

U cilju razumevanja molekularnih mehanizama dejstva vortiooksetina, praćena je genska ekspresija markera bolne preosetljivosti na perifernom i centralnom nivou puta bola (Tabela 2). U ovim analizama su korišćene niže doze lekova (2 mg/kg vortiooksetina i 15 mg/kg duloksetina) jer one korelišu sa terapijskim dozama ovih antidepresiva u lečenju velikog depresivnog poremećaja, kao i duloksetina u lečenju bola kod osteoartritisa. Doza vortiooksetina od 2 mg/kg je ekvivalentna humano dozi od 19,5 mg/dan (Reagan-Shaw i sar., 2008), terapijski opseg vortiooksetina je 5-20 mg/dan (De Diego-Adeliño i sar., 2022). Doza duloksetina od 15 mg/kg kod pacova je ekvivalentna humano dozi od 146 mg/dan (Reagan-Shaw i sar., 2008), dok je terapijski opseg duloksetina 30-120 mg/dan (Muscatello i sar., 2019).

Tabela 3.1. Određivanje relativne genske ekspresije markera bolne preosetljivosti u modelu osteoartritisa.

Merenje relativne genske ekspresije markera bolne preosetljivosti		
Koleno	L3-L5 spinalne ganglije	L3-L5 segment kičmene moždine
<i>Il-1β, Tnf-α i Ngf</i>	<i>Il-1β, Tnf-α, Ngf, Bdnf i Tac1</i>	<i>Il-1β, Tnf-α, Ngf, Bdnf i Tac1</i>

Koleno, spinalne ganglije i kičmena moždina su homogenizovani u *Tissue Lyser II (Qiagen)* korišćenjem kuglica od nerđajućeg čelika. Ukupna RNK je izolovana korišćenjem komercijalnog reagensa *Trizol (Thermo Fisher Scientific)*, a izolovana RNK je dalje tretirana korišćenjem komercijalnog kita *RapidOut DNA Removal Kit* prema odgovarajućem protokolu proizvođača (*Thermo Fisher Scientific*) sa ciljem uklanjanja potencijalne kontaminacije genomskom DNK. *RevertAid* reverzna transkriptaza (*Thermo Fisher Scientific*) sa heksamerima nasumične sekvence (*Thermo Fisher Scientific*) i *RiboLock* RNase inhibitorom (*Thermo Fisher Scientific*) su korišćeni za transkripciju 0,5 µg RNK kao matrice. Kvantitativni real-time PCR je izveden korišćenjem komercijalnog kita *IC Green qPCR Universal Kit (NIPPON Genetics, Düren, Nemačka)*. Uslovi reakcije su bili sledeći: 2 min na 95°C aktivacija, 40 ciklusa u trajanju od 5 s na 95°C i 30 s na 60°C na *Line-Gene 9600 Plus Real-Time PCR (Hangzhou Bioer Technology)*. Svi rezultati su normalizovani prema *Gapdh* genu i izračunati prema formuli $2^{-\Delta\Delta C}$. Sekvence prajmera koje su korišćene za umnožavanje ciljnih gena, preuzete su iz literature i/ili dizajnirane primenom *Primer BLAST* softvera i prikazane su u **Tabeli 3.2.**

Tabela 3.2. Lista prajmera korišćenih u ovom istraživanju.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera 5'–3'	Referenca
<i>Bdnf</i> _forward	TGCTGGATGAGGACCAGAAG	Ovaj rad
<i>Bdnf</i> _reverse	TTCCTCCAGCAGAAAGAGCA	
<i>Tac1</i> _forward	GAAATCGGTGCCAACGATGA	Ovaj rad
<i>Tac1</i> _reverse	GTCTTCGGGCGATTCTCTGA	
<i>Ngf</i> _forward	ATAAGACCACAGCCACGGAC	Ovaj rad
<i>Ngf</i> _reverse	ACGCCITGACAAAGGTGTGA	
<i>Il-1β</i> _forward	GGAAGGCAGTGTCACTCAATTGTG	Tilleux i sar., 2007
<i>Il-1β</i> _reverse	GGTCTCATCCTGGAAGCTCC	
<i>Tnf-α</i> _forward	GGGTGATTGGTCCCAACAAG	Ovaj rad
<i>Tnf-α</i> _reverse	GGGTCTGGGCCATGGAA	
<i>Gapdh</i> _forward	CCCCCAATGTATCCGTGTGTG	Tanga i sar., 2004
<i>Gapdh</i> _reverse	TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT	

3.4.6. Parametri oksidativnog stresa u kolenu

Za određivanje parametara oksidativnog stresa, deo kolena je najpre homogenizovan u tarioniku sa pistilom u hladnom 0,1 mol/L fosfatnom puferu (pH = 7,4, sadrži 1,15% KCl) u zapremini 1:9 (masa tkiva:zapremina pufera). Posle homogenizacije, uzorci su centrifugirani 10 minuta (800 x g), zatim 20 minuta (9500 x g) kako bi se dobio postmitohondrijalni supernatant. U supernatantu su mereni sledeći parametri prema odgovarajućem protokolu (Kotur-Stevuljevic i sar., 2015; Javorac i sar., 2022):

- **totalni oksidantni status (TOS),**
- **superoksidni anjon (O_2^-),**
- **prooksidativno-antioksidativni balans (PAB),**
- **proteinski produkti uznapredovale oksidacije (engl. *advanced oxidation protein products*, AOPP) i**
- **malondialdehid (MDA)**

Svi rezultati su normalizovani prema koncentraciji proteina u uzorku (metoda po *Bradford*-u) (Javorac i sar., 2022).

Totalni oksidantni status (TOS) je određivan kolorimetrijskom metodom po *Erel*-u, koja se zasniva na sposobnosti oksidanasa da oksiduju fero *o*-dianizidin kompleks u feri oblik, koji zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseljoj sredini; intenzitet boje je proporcionalan ukupnom sadržaju oksidacionih molekula u uzorku. Količina superoksidnog anjona (O_2^-) je merena prema metodi koju su predložili *Anclair* i *Voisin*; metoda se zasniva na sposobnosti superoksid anjon radikala da redukuje žuti nitroplavitetrazolijum (*NBT*, 2,2'-di-*p*-nitrofenil-5,5'-difetil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difetil)-ditetrazolium hlorid) u plavi formazan. Za određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (*TMB*) je korišćen kao hromogen; u testu se određuje koncentracija vodonik-peroksida (H_2O_2) u antioksidativnom okruženju, hromogen (*TMB*) reaguje i sa vodonik-peroksidom i sa antioksidansima (mokraćna kiselina) u isto vreme jer se nalaze u istoj

sredini; reakcija H_2O_2 i hromogena je enzimski katalizovana peroksidazom i oksidovanjem *TMB* nastaje intenzivno plavo obojeni proizvod.

Određivanje proteinskih produkata uznapredovale oksidacije (engl. *advanced oxidation protein products, AOPP*) se zasniva na merenju absorbance na 340 nm, nakon reakcije glacijalne sirćetne kiseline i 1,16 mol/L kalijum-jodida. Koncentracija malondialdehida (*MDA*) je određivana spektrofotometrijskim testom koji se zasniva na apsorpcionom maksimumu kompleksa *MDA* i ostalih supstanci koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom na 535 nm. Apsorbancija se određuje nakon zagrevanja smeše (uzorak i reagensi) na 100 °C u trajanju od 5 minuta, zatim hlađenja i centrifugiranja (10000x g, 4 °C 10 min). Koncentracija proteina u uzorcima je određivana metodom po *Bradford*-u, koristeći goveđi serumski albumin kao standard. Nivoi *TOS*, $O_2^{\bullet-}$ i *AOPP* su mereni korišćenjem *ILAB 300 Plus* analizatora (*Instrumentation Laboratory*, Milano, Italija), dok su koncentracije *PAB* i *MDA* merene na kontinuiranom spektrofotometru (*Pharmacia LKB, Cambridge*, Velika Britanija).

3.4.7. Parametri redoks statusa u srčanom mišiću

Uzorci srčanog mišića su homogenizovani u hladnom 0,1 mol/L fosfatnom puferu (pH = 7,4, sadrži 1,15% KCl) u zapremini 1:9 (masa tkiva:zapremina pufera) korišćenjem *T10 basic Ultra-Turrax* homogenizatora (*IKA*, Nemačka). Posle homogenizacije, uzorci su centrifugirani 10 minuta (800 x g), zatim 20 minuta (9500 x g) kako bi se dobio postmitohondrijalni supernatant. U supernatantu su mereni sledeći parametri prema odgovarajućem protokolu (Javorac i sar., 2022; Kotur-Stevuljevic i sar., 2015):

- **Prooksidativni markeri:**
 - totalni oksidantni status (*TOS*),
 - superoksidni anjon ($O_2^{\bullet-}$),
 - prooksidativno-antioksidativni balans (*PAB*),
 - proteinski produkti uznapredovale oksidacije (engl. *advanced oxidation protein products, AOPP*) i
 - malondialdehid (*MDA*)
- **Antioksidativni markeri:**
 - superoksid dizmutaza (*SOD*) i
 - nivo *SH* grupa

Svi rezultati su normalizovani prema koncentraciji proteina u uzorku (metoda po *Bradford*-u) (Javorac i sar., 2022).

Određivanje prooksidativnih markera u srčanom mišiću je rađeno prema goreopisanim metodama. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze se zasniva na sposobnosti *SOD* da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini na pH 10,2; aktivnost enzima se izražava u relativnim jedinicama koje se dobijaju merenjem apsorpcije nastalog crvenog proizvoda oksidacije adrenalina na 480 nm. Aktivnost *SOD* je određivana na *ILAB 300 Plus* analizatoru (*Instrumentation Laboratory*, Milano, Italija).

Određivanje sadržaja sulfhidrilnih grupa određivan je metodom po *Ellman*-u. Metoda se zasniva na reakciji 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoeva kiseline (*DTNB*) sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini (pH 9,0), pri čemu nastaje jedan mol *p*-nitrofenola, koji je jako žuto obojen i čija apsorbcija se meri na 412 nm. Sadržaj *SH* grupa je određivan na spektrofotometru (*Pharmacia LKB, Cambridge*, Velika Britanija).

Ex vivo analize

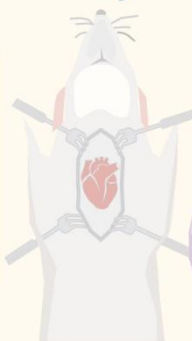
Izolacija kolena



1
Određivanje ekspresije
iRNK za
IL-1 β , Tnf- α i Ngf
i parametara
oksidativnog stresa.



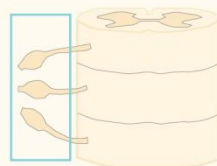
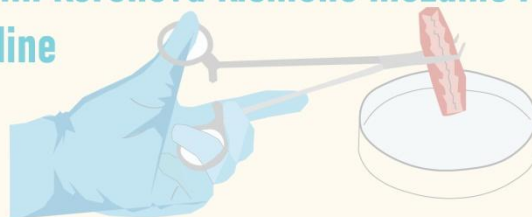
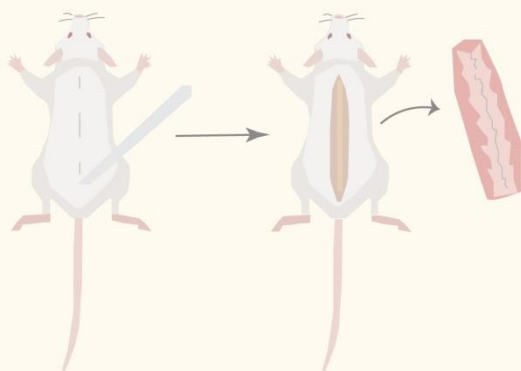
Izolacija srca



2
Određivanje parametara
redoks statusa i histološka
analiza.

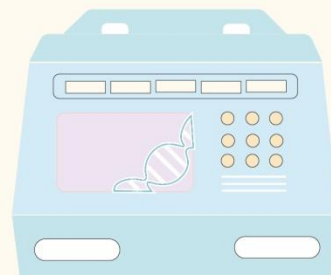


Izolacija L3-L5 ganglija dorzalnih korenova kičmene moždine i L3-L5 segmenta kičmene moždine



3

Određivanje ekspresije iRNK
za
IL-1 β , Tnf- α , Ngf, Bdnf i Tac1.



Slika 3.5. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola *ex vivo* eksperimenata u modelu osteoartritisa indukovanoj monoiodoacetatom.

3.4.8. Histološka analiza kardiomiocita

Uzorci vrha srčanog mišića su fiksirani u 4% formaldehidu (*FNB4, BioGnost Ltd.*, Hrvatska) tokom 24 sata. Zatim su uzorci dehidratirani (rastućom koncentracijom alkohola) i ukalupljeni u parafin. Histološki uzorci tkiva obrađeni su korišćenjem modularnog automatizovanog procesora tkiva (*Leica TP1020 Leica Biosystems Nussloch GmbH*, Nemačka) prema sledećem protokolu: 4% neutralno-puferovani formaldehid (4% NB *Formaldehyde FNB4-10 L, BioGnost Ltd.*, Hrvatska) $2 \times 1,5$ h – 2×2 h, 70% alkohol (*Histanol 70, H70-5 L, BioGnost Ltd.*, Hrvatska) 1,5–3 h, 96% alkohol (*Histanol 96, H96-5 L, BioGnost Ltd.*, Hrvatska) 1,5–3 h, 100% alkohol (*Histanol 100, H100-5 L, BioGnost Ltd.*, Hrvatska) $3 \times 1,5$ h, ksilol (*Ksilen pro analysis, Zorka Pharma*, Srbija) $2 \times 1,5$ h, parafin (*Biomax Plus 56/58, BWPLUS-1, BioGnost Ltd.*, Hrvatska) $3 \times 1,5$ h. Tkivo je ugrađeno korišćenjem *Leica HistoCore Arcadia H Leica Biosystems* (*Nussloch GmbH*, Nemačka) i serijski presečeno mikrotomom (*Leica RM2125RTS, Leica Biosystems Nussloch GmbH*, Nemačka). Za morfološku analizu, iseći debljine 4 μ m su postavljeni na pločice i obojeni metodom hematoksilin-eozin i Mason-trihrom (engl. *Masson trichrome*).

Za analizu je korišćen mikroskop *Leica DM2000 LED* i *Leica ICC50 E* kamera opremljena sa *LAS V4.12* softverom. Morfološka evaluacija je urađena u skladu sa preporukama *The Royal College of Pathologists* (The Royal College of Pathologists). Za svaku životinju analizirali smo ukupno 4 poprečna preseka, koji su dobijeni iz dva različita dela/nivoa srca, razdvojena najmanje 2 mm. Analizirani su sledeći histološki parametri kardiomiocita: orijentacija, poprečna ispruganost, formiranje interkalatnih diskova, morfologija jedra, morfološki znaci atrofije ili hipertrofije kardiomiocita, ćelijska vakuolizacija, *contraction band* nekroza. Zasebno je analizirana morfologija intersticijskog tkiva, intersticijskih krvnih sudova i koronarna cirkulacija.

3.5. Statistička analiza

Podaci istraživanja su analizirani primenom softvera *SigmaPlot11*, *GraphPad Prism* (verzija 10.1.0; *GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA*), *Microsoft Excel* i *Pharm PCS*. Izbor statističkog testa je određen u zavisnosti od broja grupa, broja/vrste faktora i karakteristika podataka [normalnost, ujednačenost varijanse]. Za procenu tipa distribucije je korišćen *Shapiro-Wilk* test, a u zavisnosti od normalnosti, distribucije podataka i ujednačenosti varijanse korišćeni su Studentov *t*-test, jednofaktorska ANOVA, dvofaktorska ANOVA i dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima praćene *Tukey post-hoc* testom, *Mann Whitney U*-test i *Kruskal-Wallis* test. Program *Pharm PCS* je korišćen za računanje ED_{50} vrednosti sa 95% intervalima poverenja (linearnom regresionom analizom odnosa logaritma doze i efekta). U bihevioralnim eksperimentima u modelu osteoartritisa, za rezultate vremenskog toka je izračunata površina ispod krive (engl. *area under the curve, AUC*) za svaku životinju korišćenjem metode trapezoida. Ovo je urađeno da bismo pojednostavili poređenje između tretmana u modelu osteoartritisa. Vrednost *P* manja od 0,05 je uzeta kao statistički značajna u svim testovima.

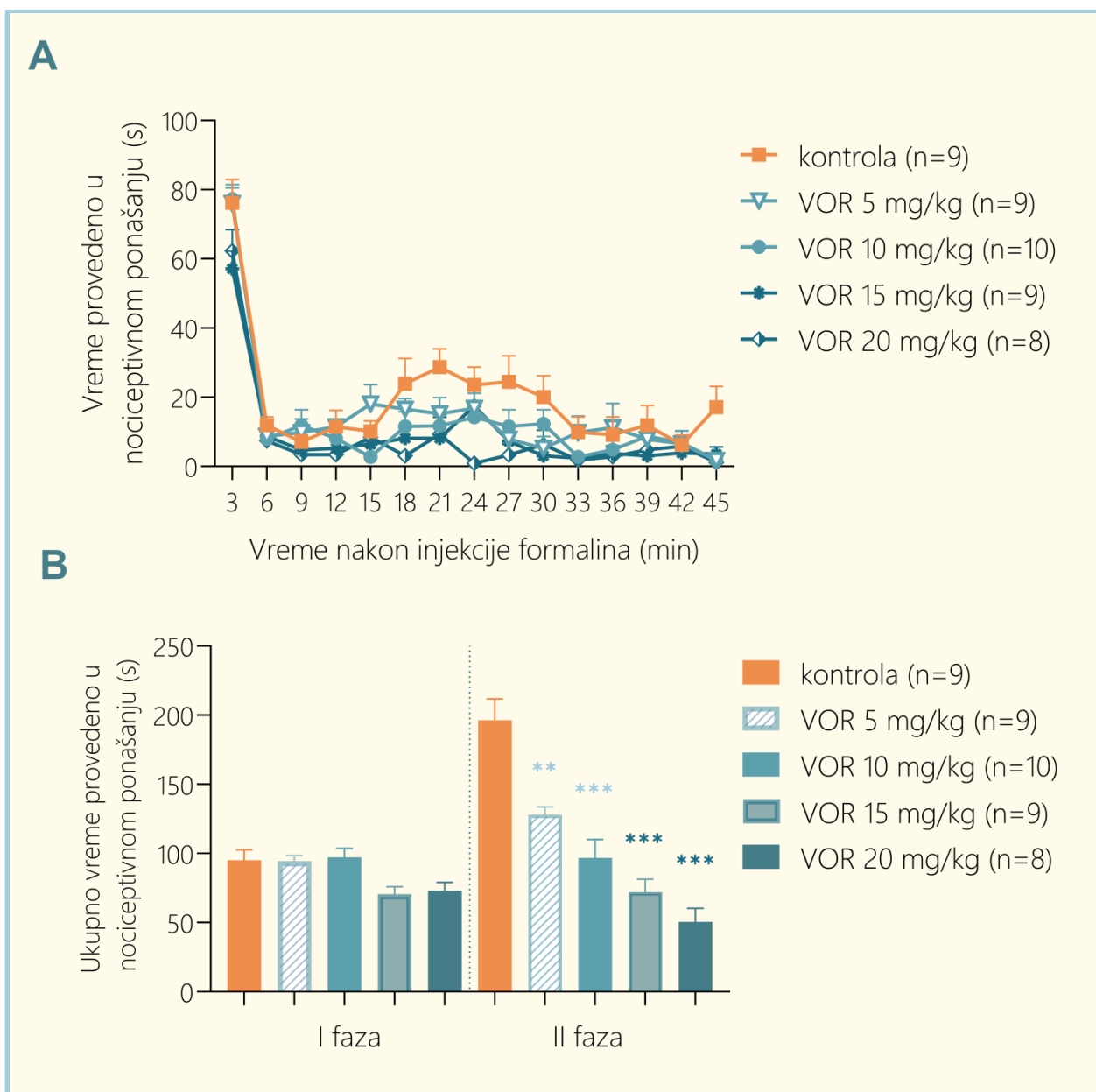
4. Rezultati

4.1. Efikasnost vortioksetina u modelima akutnog inflamatornog bola i mehanizam dejstva vortioksetina u animalnom modelu trigeminalnog bola

4.1.1. Efekat vortioksetina u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

Injekcija 20 μ L 2% rastvora formalina je dovela do karakterističnog bifaznog nociceptivnog ponašanja miševa, dok injekcija ekvivalentne zapremine fiziološkog rastvora nije proizvela značajan bihejvioralni efekat (nije prikazano).

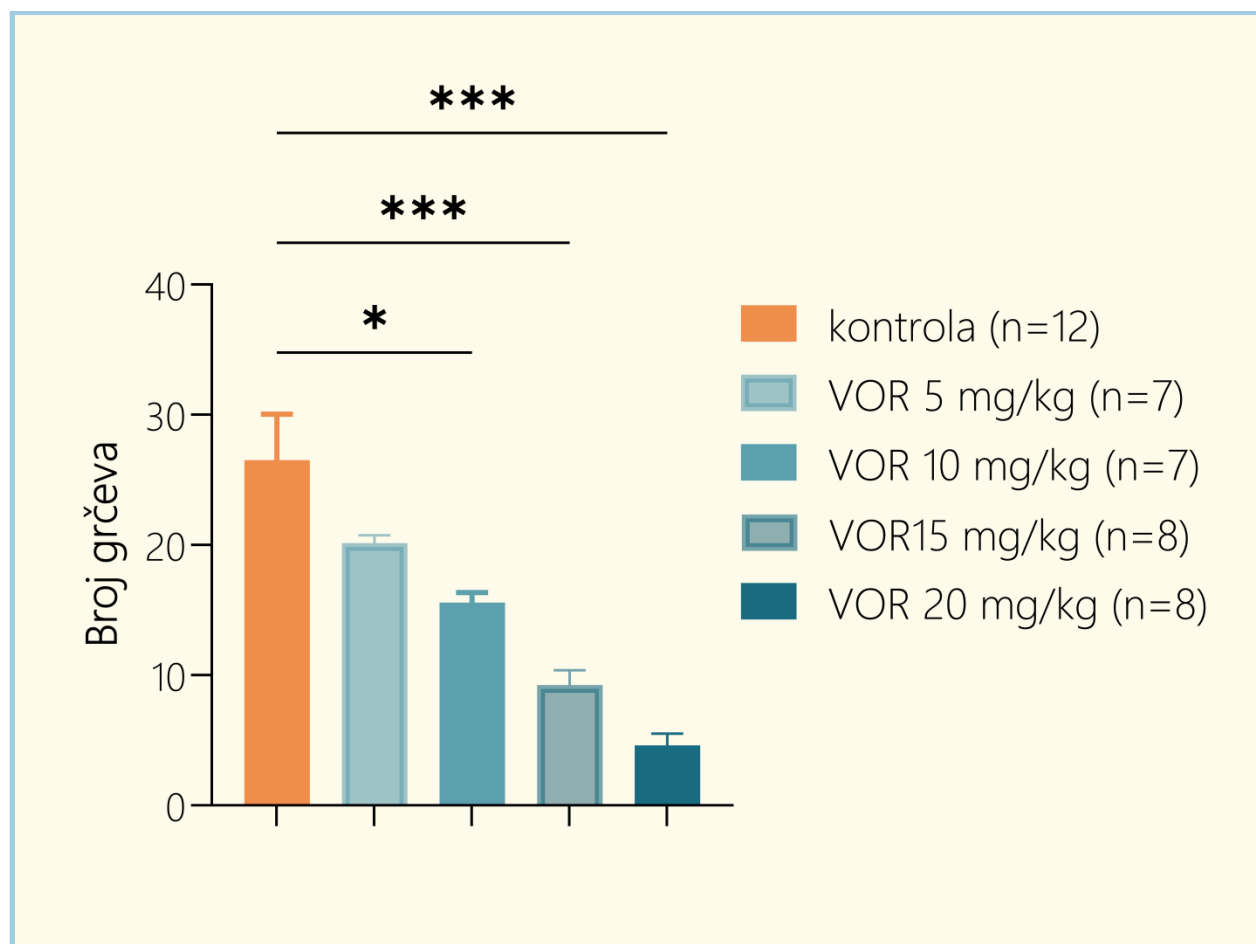
Primena vortioksetina nije značajno smanjila nociceptivno ponašanje životinja u prvoj fazi testa (svi *post-hoc* $P \geq 0,051$, **Slika 4.1**). U drugoj fazi testa, vortioksetin (5-20 mg/kg) je proizveo značajan i dozno-zavisan antinociceptivni efekat tj. smanjio je vreme koje su životinje provele u bolnom ponašanju ($P < 0,001$; jednofaktorska ANOVA; **Slika 4.1**). Antinociceptivni efekti su bili u rasponu od 35-74% (nije prikazano). Srednja efektivna doza (ED_{50}) $\pm$ standardna greška za drugu fazu testa je bila $9,02 \pm 0,40$ mg/kg.



Slika 4.1. Antinociceptivni efekat vortiooksetina (VOR) u modelu inflamatornog trigeminalnog bola (orofacijalni formalinski test) kod miševa. Vremenski tok nocieptivnog ponašanja (trljanje njuške) u 3-minutnim intervalima je prikazan na gornjem grafikonu (A), a ukupno vreme koje su životinje provele u trljanju nadražene njuške u fazi I (0–9 min nakon injekcije formalina) i fazi II (9–45 min nakon injekcije formalina) je prikazano na donjem grafikonu (B). Tačke/stubići na grafikonu predstavljaju srednje vrednosti grupa $\pm$ standardna greška. VOR je primenjivan peroralno, 60 min pre formalina. Statistička značajnost (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; jednofaktorska-ANOVA praćena *post-hoc Tukey* testom) je određena poređenjem sa kontrolnom grupom.

4.1.2. Efekat vortiooksetina u modelu inflamatornog visceralnog bola

U testu grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom, primena vortiooksetina (5-20 mg/kg) je značajno i dozno-zavisno smanjila broj grčeva u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($P < 0,001$, jednofaktorska ANOVA; **Slika 4.2**). Antinociceptivni efekti su bili u sledećem rasponu: 24% do 83%, a odgovarajuća ED_{50} vrednost ($\pm$ standardna greška) je bila $10,2 \pm 0,9$ mg/kg.

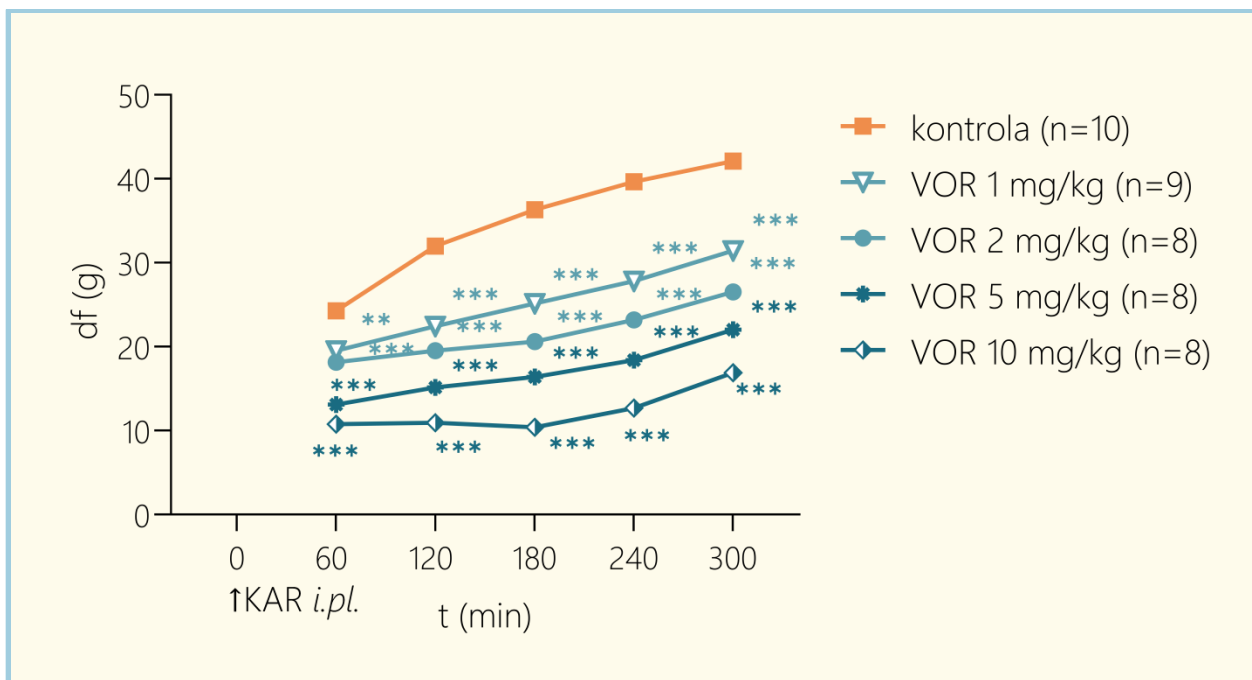


Slika 4.2. Antinociceptivni efekat vortiooksetina (VOR) u animalnom modelu visceralnog inflamatornog bola (test grčeva). Rezultati u testu grčeva kod miševa su izraženi kao broj grčeva izazvanih primenom intraperitonealne injekcije sirćetne kiseline. Stubići na grafikonu predstavljaju srednje vrednosti grupa ($\pm$ standardna greška) broja grčeva u eksperimentalnim grupama. VOR je primenjivan peroralno, 55 min pre injekcije sirćetne kiseline. Statistička značajnost (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; jednofaktorska-ANOVA praćena *post-hoc* Tukey testom) je određena poređenjem sa kontrolnom grupom.

4.1.3. Efekat vortiooksetina u modelu somatskog inflamatornog bola

U modelu karageninske inflamacije, u modifikovanom testu pritiska na zadnje šape pacova, sistemska primena vortiooksetina (1-10 mg/kg) je statistički značajno i dozno-zavisno smanjila mehaničku

hiperalgeziju ($P < 0,001$, dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima; **Slika 4.3**). Vortioksetin je postigao maksimalni antihiperalgezijski efekat 180 min nakon primene karagenina/vortioksetina u svim ispitivanim dozama; efekat je bio u rasponu od 31 do 71%, dok je ED_{50} ($\pm$ standardna greška) za vortioksetin u ovom testu bila $3,2 \pm 0,2$ mg/kg.



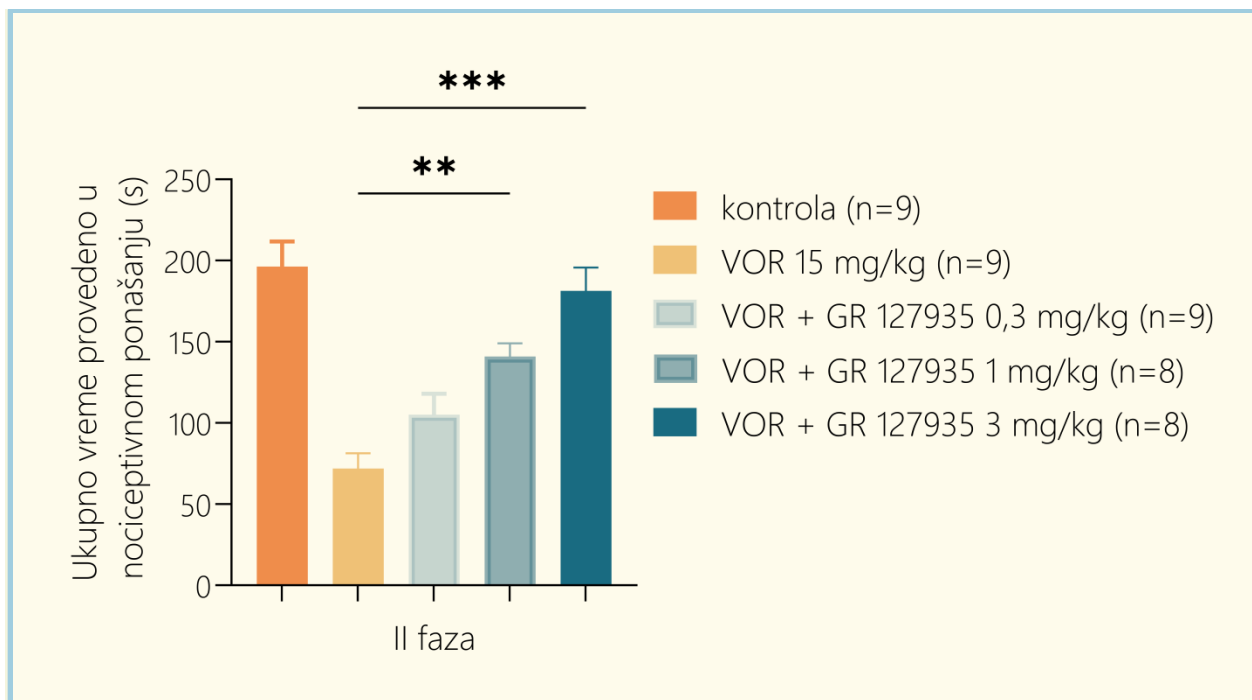
Slika 4.3. Antihiperalgezijski efekat vortioksetina (VOR) u modelu somatskog inflamatornog bola (model karageninske (KAR) inflamacije šape). Rezultati su prikazani kao razlika u gramima (df) težine oslanjanja na zadnje šape pre (zdrava šapa) i posle (inflamirana šapa) primene KAR. Tačke na grafikonu predstavljaju srednje vrednosti grupa ($\pm$ standardna greška) df u eksperimentalnim grupama. Statistička značajnost (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, praćena *post-hoc* Tukey testom) je određena poređenjem sa vrednostima za kontrolnu grupu. *i.pl.* = intraplantarno.

4.1.4. Ispitivanje mehanizama dejstva vortioksetina u modelu inflamatornog trigeminalnog bola

4.1.4.1. Uticaj antagoniste serotonininskih 5-HT_{1B/1D} receptora na antinociceptivni efekat vortioksetina

Sistemski primenjen selektivni antagonist serotonininskih 5-HT_{1B/1D} receptora, GR 127935 (0,3–3 mg/kg; *i.p.*), je značajno i dozno-zavisno umanjio antinociceptivni efekat vortioksetina (15 mg/kg; *per os*) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ($P < 0,001$; jednofaktorska-ANOVA; **Slika 4.4**). Stepeni inhibicije su bili 26,6%, 55,5% i 87,9% za doze 0,3, 1 i 3 mg/kg, redom (nije prikazano).

Najveća ispitivana doza GR127935 (3 mg/kg; *i.p.*) *per se*, bez vortioksetina, nije imala značajan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u drugoj fazi testa ($P = 0,714$; Studentov *t*-test; nije prikazano).

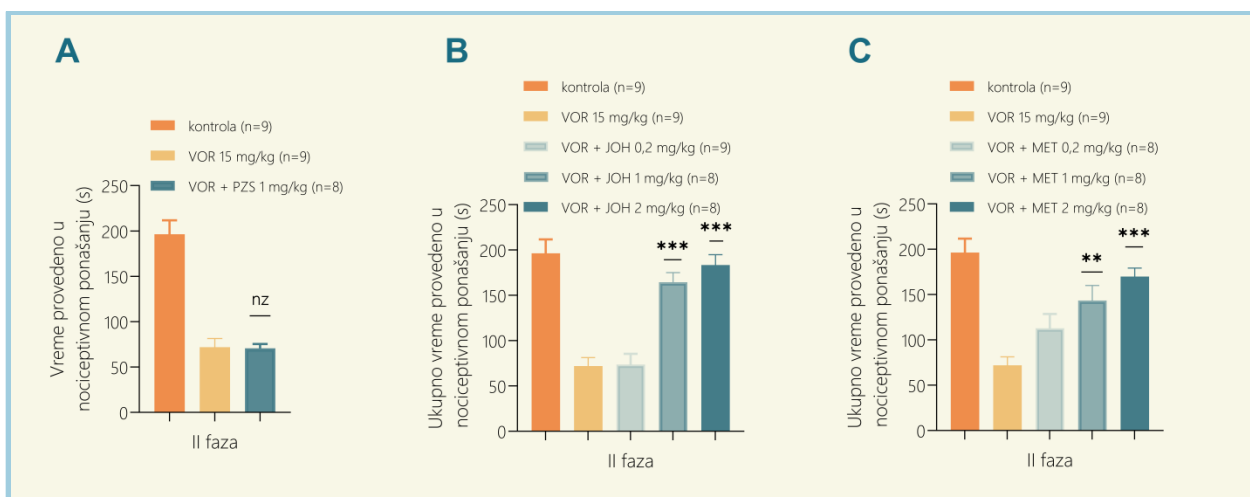


Slika 4.4. Uticaj antagoniste 5-HT_{1B/1D} receptora (GR 127935) na antinociceptivni efekat vortiooksetina (VOR) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. GR 127935 je primenjen intraperitonealno istovremeno sa VOR (15 mg/kg; *per os*), 60 minuta pre injekcije formalina. Na grafiku je prikazano ukupno vreme provedeno u trljanju njuške u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Stubići predstavljaju srednje vrednosti grupa ($\pm$ standardna greška). Statistička značajnost (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, jednofaktorska-ANOVA sa *post-hoc* Tukey testom) je određena u odnosu na VOR grupu (15 mg/kg).

4.1.4.2. Uticaj antagonista adrenergičkih receptora na antinociceptivni efekat vortiooksetina

Prazosin (1 mg/kg; i.p.), selektivni antagonista α_1 adrenergičkih receptora, nije imao značajan uticaj na antinociceptivni efekat vortiooksetina (15 mg/kg; *per os*) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ($P = 0,919$, Studentov *t*-test; **Slika 4.5A**). S druge strane, johimbina (0,2–2 mg/kg, i.p.), selektivni antagonista α_2 adrenergičkih receptora, i metoprolol (0,2–2 mg/kg, i.p.), selektivni antagonista β_1 receptora, značajno i dozno-zavisno su smanjili antinociceptivni efekat vortiooksetina u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ($P < 0,001$ za oba primenjena antagonista, jednofaktorska ANOVA; **Slika 4.5B** i **Slika 4.5C**). Stepni inhibicije antinociceptivnog efekta vortiooksetina su bili 1,3%, 74,3%, i 89,7% za doze 0,2, 1, i 2 mg/kg johimbina (nije prikazano). Inhibitorni efekti metoprolola su bili 32,8%, 57,5%, i 78,8% za doze od 0,2, 1 i 2 mg/kg (nije prikazano).

Najveće testirane doze antagonista adrenergičkih receptora, prazosina (1 mg/kg), johimbina (2 mg/kg) i metoprolola (2 mg/kg), primenjene bez vortiooksetina, nisu proizvele značajan efekat na nociceptivno ponašanje životinja u orofacijalnom formalinskom testu ($P = 0,517$ za prazosin, $P = 0,913$ za johimbina, i $P = 0,303$ za metoprolol, Studentov *t*-test; nije prikazano).

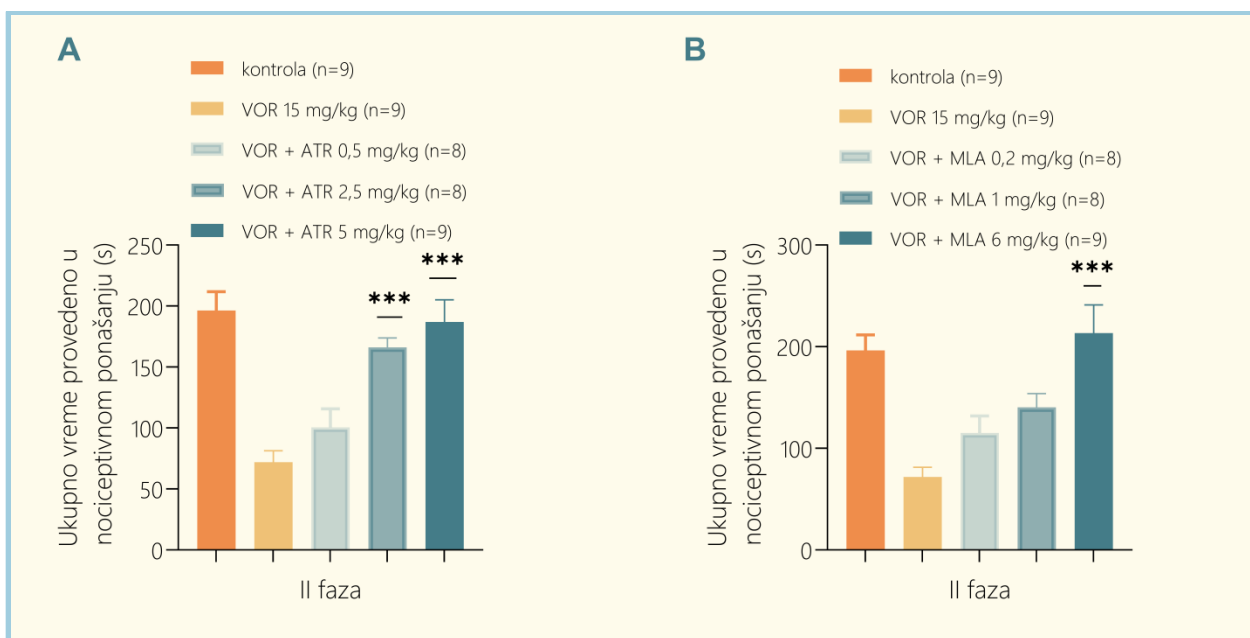


Slika 4.5. Uticaj antagonista adrenergičkih receptora, prazosina (PZS) (A), johimbina (JOH) (B) i metoprolola (MET) (C) na antinociceptivni efekat vortiooksetina (VOR) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. PZS, JOH i MET su primenjeni istovremeno sa VOR (15 mg/kg; *per os*), 60 minuta pre injekcije formalina. Na grafikonima je prikazano ukupno vreme provedeno u trljanju njuške u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Stubići predstavljaju srednje vrednosti grupa ($\pm$ standardna greška). Statistička značajnost (n.z. – nema značajne razlike; *** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, jednofaktorska-ANOVA sa *post-hoc Tukey* testom) je određena u odnosu na VOR grupu (15 mg/kg).

4.1.4.3. Uticaj antagonista holinergičkih receptora na antinociceptivni efekat vortiooksetina

Sistemska primena atropina (0.5–5 mg/kg, i.p.) i metilakakonitina (0.2–6 mg/kg, i.p.) je značajno i dozno-zavisno umanjila antinociceptivni efekat vortiooksetina (15 mg/kg; *per os*) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ($P < 0,001$ za oba testirana antagonista, jednofaktorska ANOVA; **Slika 4.6A i 4.6B**). Atropin, neselektivni antagonist muskarinskih holinergičkih receptora, inhibirao je antinociceptivni efekat vortiooksetina za 23% (0,5 mg/kg), 75,7% (2,5 mg/kg) i 92,4% (5 mg/kg) (nije prikazano). Metilakakonitin, antagonist α_7 nikotinskih holinergičkih receptora, inhibirao je antinociceptivni efekat vortiooksetina za 34,7%, 55,1% i 100% za doze od 0,2, 1, i 6 mg/kg, redom (nije prikazano).

Najveće testirane doze antagonista holinergičkih receptora, atropina (5 mg/kg) i metilakakonitina (6 mg/kg), nisu imale značajan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa kada su primenjene bez vortiooksetina ($P = 0,838$ za atropin i $P = 0,758$ za metilakakonitin, Studentov *t*-test; nije prikazano).

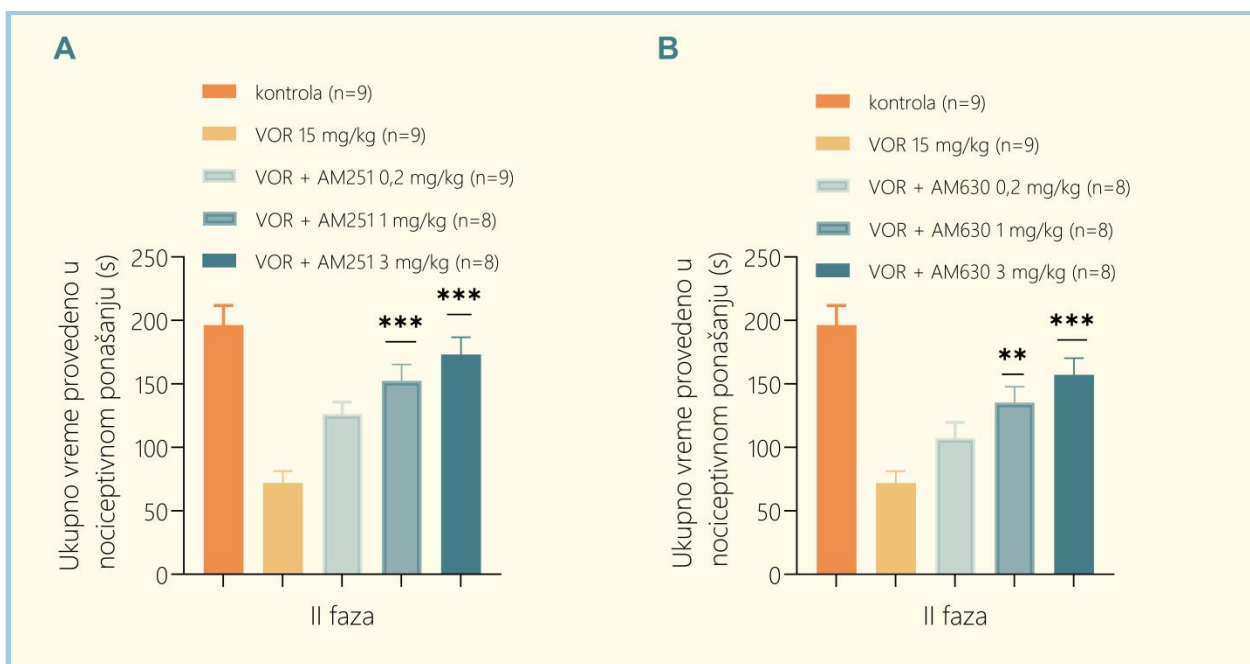


Slika 4.6. Uticaj antagonista holinergičkih receptora, atropina (ATR) (A) i metilakakonitina (MLA) (B) na antinociceptivni efekat vortiooksetina (VOR) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. ATR i MLA su primenjeni intraperitonealno istovremeno sa VOR (15 mg/kg; *per os*), 60 minuta pre injekcije formalina. Rezultati su prikazani kao ukupno vreme provedeno u trljanju njuške u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Stubići predstavljaju srednje vrednosti grupa ($\pm$ standardna greška). Statistička značajnost (***) $P < 0,001$, jednofaktorska-ANOVA praćena *post-hoc* Tukey testom) je određena u odnosu na VOR grupu (15 mg/kg).

4.1.4.4. Uticaj antagonista kanabinoidnih receptora CB₁ i CB₂ na antinociceptivni efekat vortiooksetina

Sistemi primenjeni antagonisti kanabinoidnih CB₁ receptora AM251 (0,2–3 mg/kg, i.p.) i kanabinoidnih CB₂ receptora AM630 (0,2–3 mg/kg, i.p.) su značajno i dozno zavisno inhibirali antinociceptivni efekat vortiooksetina (15 mg/kg; *per os*) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ($P < 0,001$ za oba testirana antagonista, jednofaktorska ANOVA; **Slika 4.7A i 4.7B**). Stepni inhibicije antinociceptivnog dejstva vortiooksetina su bili 43,8%, 64,7% i 81,4% za doze AM251 od 0,2, 1 i 3 mg/kg, redom (nije prikazano). Inhibitorski efekti AM630 za doze od 0,2, 1 i 3 mg/kg su bili 32,3%, 50,9% i 68,6%, redom (nije prikazano).

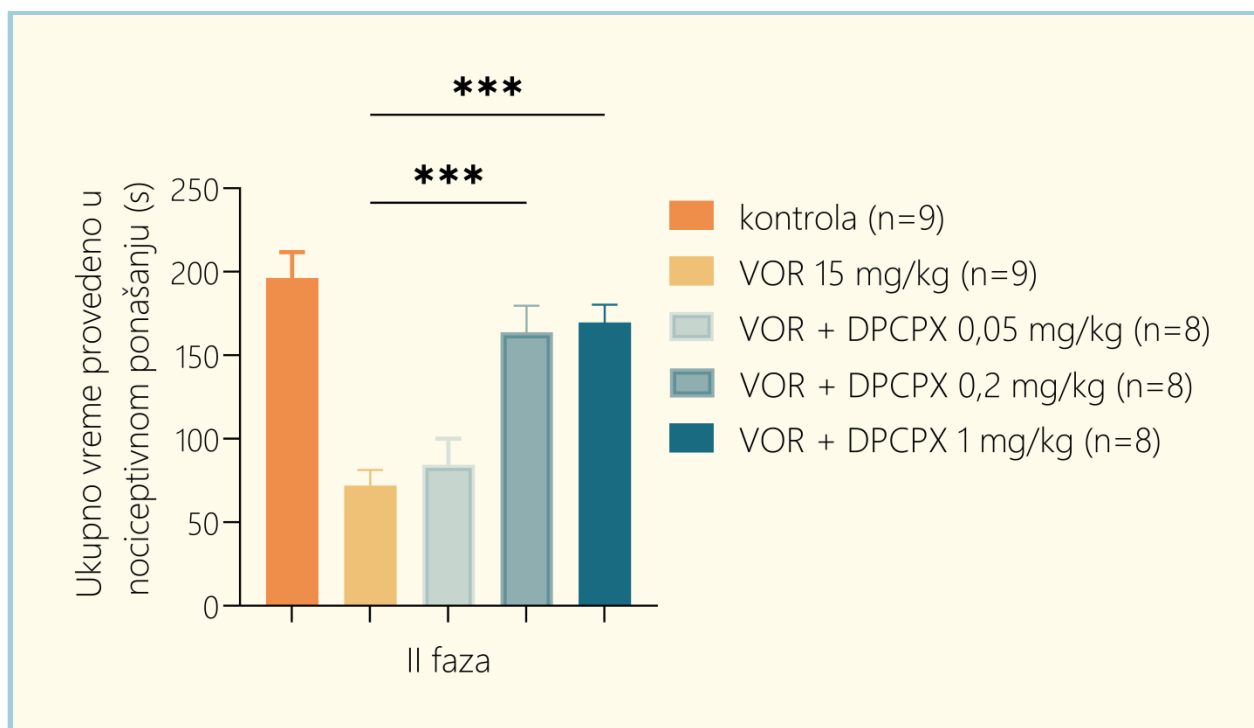
Najveće testirane doze ispitivanih selektivnih antagonista kanabinoidnih receptora primenjenih *per se*, AM251 (3 mg/kg, i.p.) i AM630 (3 mg/kg, i.p.) nisu imale značajan uticaj na dužinu nociceptivnog ponašanja u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ($P = 0,685$ za AM251 i $P = 0,825$ za AM630, Studentov *t*-test; nije prikazano).



Slika 4.7. Uticaj antagonista kanabinoidnih receptora AM251 (A) i AM630 (B) na antinociceptivni efekat vortiooksetina (VOR) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. AM251 i AM630 su primenjeni intraperitonealno istovremeno sa VOR (15 mg/kg; *per os*), 60 minuta pre injekcije formalina. Rezultati su prikazani kao ukupno vreme provedeno u trljanju njuške u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Stubići predstavljaju srednje vrednosti grupa ($\pm$ standardna greška). Statistička značajnost (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, jednofaktorska-ANOVA praćena *post-hoc* Tukey testom) je određena u odnosu na VOR grupu (15 mg/kg).

4.1.4.5. Uticaj antagoniste adenozijskih A_1 receptora na antinociceptivni efekat vortiooksetina

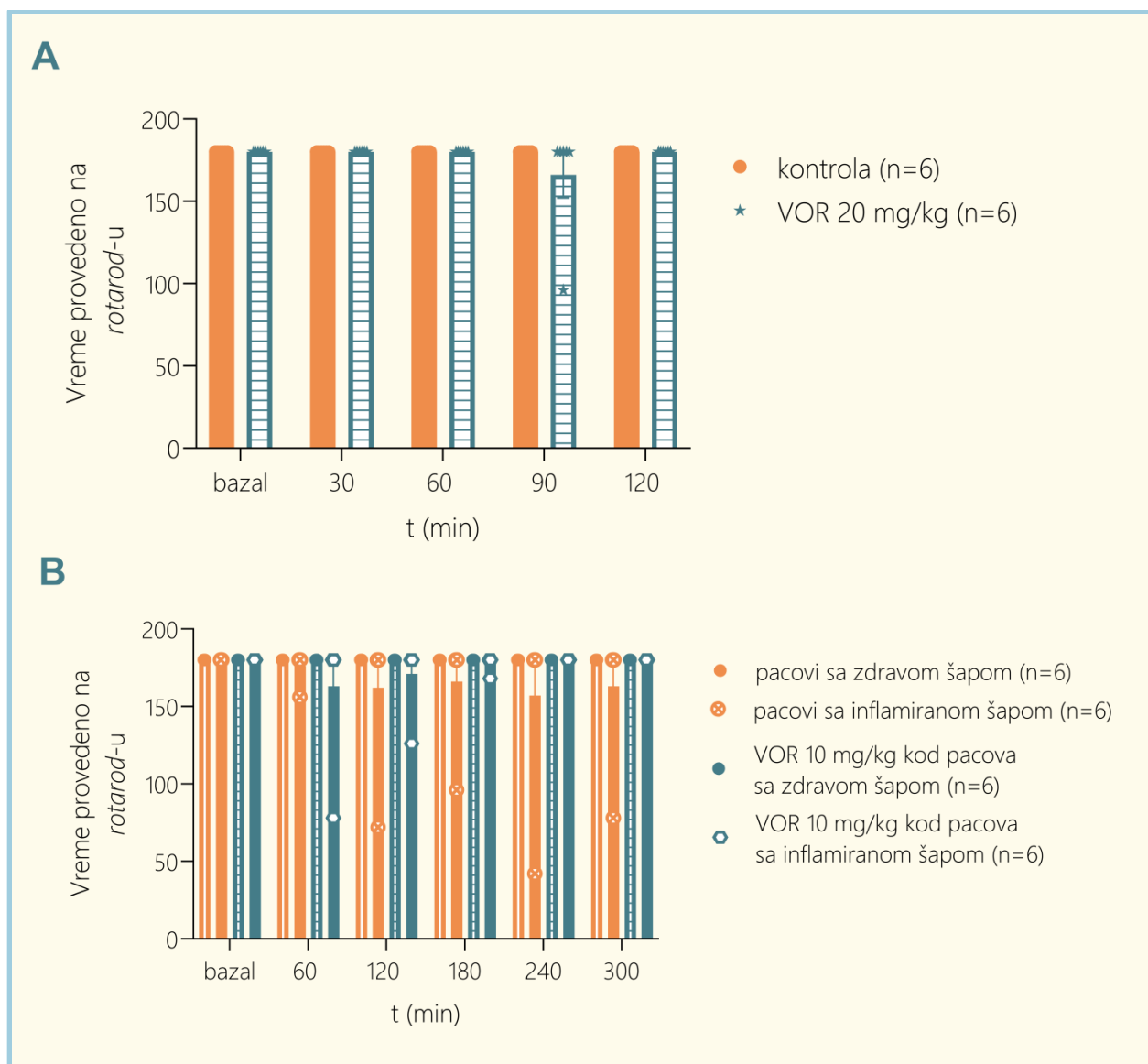
Primena selektivnog antagoniste adenozijskih A_1 receptora, DPCPX (0,05–1 mg/kg, *i.p.*), značajno i dozno-zavisno je smanjila antinociceptivni efekat vortiooksetina (15 mg/kg; *per os*) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ($P < 0,001$, jednofaktorska ANOVA; **Slika 4.8**). Stepene inhibicije antinociceptivnog efekta vortiooksetina koji je proizveo DPCPX bili su 14,1% (0,05 mg/kg), 74% (0,2 mg/kg) i 86,3% (1 mg/kg) (nije prikazano). Najveća testirana doza DPCPX (1 mg/kg, *i.p.*), *per se*, nije proizvela začajan efekat u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa ($P = 0,711$, Studentov *t*-test; nije prikazano).



Slika 4.8. Uticaj antagoniste adenozijskih A_1 receptora (DPCPX) na antinociceptivni efekat vortioksetina (VOR) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. DPCPX je primenjen intraperitonealno istovremeno sa VOR (15 mg/kg; *per os*), 60 minuta pre injekcije formalina. Na grafiku je prikazano ukupno vreme provedeno u trljanju njuške u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Stubići predstavljaju srednje vrednosti grupa ($\pm$ standardna greška). Statistička značajnost (***) $P < 0,001$, jednofaktorska-ANOVA sa *post-hoc* Tukey testom) je određena u odnosu na VOR grupu (15 mg/kg).

4.1.5. Uticaj vortioksetina na motoriku životinja u akutnim modelima inflamatornog bola

Primena najveće testirane doze vortioksetina kod miševa (20 mg/kg) nije imala značajan uticaj na vreme koje su životinje provele na *rotarod*-u (sve $P \geq 0,699$ u svakoj vremenskoj tački, *Mann-Whitney U* test; **Slika 4.9A**). Dodatno, primena najveće testirane doze kod pacova (10 mg/kg kod zdravih pacova i pacova sa inflamiranom šapom) nije imala značajan uticaj na vreme koje su životinje provele na *rotarod*-u ($P = 0,116$, dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima; **Slika 4.9B**).



Slika 4.9. Uticaj vortiooksetina (VOR) na motornu spretnost miševa (A) i pacova (B) u akutnim modelima inflamatornog bola izraženo kao vreme provedeno na *rotarod*-u. Bazalno vreme provedeno na *rotarod*-u je određeno pre primene vortiooksetina (20 mg/kg kod zdravih miševa i 10 mg/kg kod zdravih pacova i pacova sa inflamiranom šapom) ili vehikuluma. Stubići predstavljaju srednju vrednost ($\pm$ standardna greška) vremena provedenog na *rotarod*-u. Statistička značajnost ($P > 0,05$, *Mann-Whitney U* test ili dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima) je određena u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.2. Efekti vortiooksetina u modelu osteoartritisa

4.2.1. Uticaj vortiooksetina na bolno ponašanje životinja sa osteoartritisom

Intraartikularna injekcija monojodoacetata u desno koleno mužjaka i ženki *Wistar* pacova dovela je do razvoja bolne preosetljivosti, odnosno funkcionalne onesposobljenosti zahvaćenog zgloba u testu raspoređivanja težine, kao i mehaničke i hladne preosetljivosti u von Frey i aceton testu, redom. Ovo se manifestovalo kao značajno smanjenje težine oslanjanja životinja na povređeni ekstremitet (test raspoređivanja težine), kao i smanjenje mehaničkog praga povlačenja ipsilateralne šape (*PWT*, von Frey test) i povećanje vremena koje su životinje provodile u bolnom ponašanju (*t* (s), aceton test) u poređenju sa zdravom kontrolom (*post-hoc* $P < 0,001$ za vremenski tok i AUC vrednosti; **Slike 4.10, 4.11 i 4.12**). Ove promene su perzistirale tokom celokupnog perioda praćenja (28 dana) kod životinja oba pola. Pik smanjenja u raspodeli težine i mehaničkom pragu povlačenja šape je postignut 4. dana nakona injekcije monojodoacetata i iznosio je 41,19% kod mužjaka i 33,67% kod ženki (test raspoređivanja težine); 35,18% kod mužjaka i 36,15% kod ženki (von Frey) u odnosu na odgovarajuće bazalne vrednosti. Tokom celokupnog perioda praćenja nisu uočene polne razlike u razvoju bolne preosetljivosti u testu raspoređivanja težine i aceton testu (AUC *post-hoc* $P = 0,247$ u testu raspoređivanja težine; AUC *post-hoc* $P = 0,36$ u aceton testu; **Tabela 4.1**), dok je u von Frey testu uočena razlika između polova (AUC *post-hoc* $P = 0,02$; **Tabela 4.1**).

Tabela 4.1. Bihevioralna karakterizacija modela osteoartritisa izazvanog monojodoacetatom kod pacova *Wistar* soja: uticaj pola

Test	Bolesna kontrola			Zdrava kontrola		
	Mužjaci	Ženke	Mužjaci vs ženke poređenje	Mužjaci	Ženke	Mužjaci vs ženke poređenje
	AUC (srednja vrednost)		Studentov <i>t</i> -test	AUC (srednja vrednost)		Studentov <i>t</i> -test
Test raspodele težine	1066,62	1131,69	$P = 0,247$	1409,29	1401,27	$P = 0,303$
Von Frey	748,63	713,46	$P = 0,02$	986,24	957,97	$P = 0,20$
Aceton	253,92	202,28	$P = 0,36$	36,68	35,24	$P = 0,89$
Kopanje	40501,39	39074,31	$P = 0,38$	40501,11	37955,89	$P = 0,28$
Test	Diskriminacioni indeks (%)		Studentov <i>t</i> -test	Diskriminacioni indeks (%)		Studentov <i>t</i> -test
<i>NORT</i>	4,43	-2,95	$P = 0,07$	35,65	23,93	$P = 0,21$

U testu raspoređivanja težine između zdravog i obolelog ekstremiteta, ponavljana 28-dnevna primena vortiooksetina (2 i 10 mg/kg/dan; *per os*) i duloksetina (15 i 25 mg/kg/dan; *per os*) je statistički značajno i dozno-zavisno smanjila disbalans u raspodeli težine na povređeni ekstremitet kod životinja oba pola (sve *post-hoc* $P \leq 0,015$ za podatke vremenskog toka i sve *post-hoc* $P \leq 0,03$ za AUC vrednosti; **Slika 4.10**). Dodatno, oba antidepresiva su proizvela statistički značajan i dozno-zavisan efekat u von Frey testu kod životinja oba pola, što se ispoljilo kao povećanje u mehaničkom pragu povlačenja i AUC vrednosti (sve *post-hoc* $P < 0,001$ za podatke vremenskog toka i sve *post-hoc* $P < 0,001$ za AUC podatke; **Slika 4.11; Tabela 4.2**).

U aceton testu, vortiooksetin (2 i 10 mg/kg/dan; *per os*) je nakon ponavljane primene ispoljio statistički značajno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo kod životinja oba pola (sve *post-hoc* $P \leq 0,002$ za podatke vremenskog toka i sve *post-hoc* $P \leq 0,002$ za *AUC* vrednosti; **Slika 4.12**), izraženo kao smanjenje vremena koje je životinja provela ližući i trzajući ipsilateralnu šapu na koju je primenjena kap acetona. Ponavljana primena duloksetina (15 i 25 mg/kg/dan) statistički značajno je smanjila nociceptivno ponašanje u aceton testu kod mužjaka pacova sa monojodoacetatom-izazvanim osteoartritisom (sve *post-hoc* $P \leq 0,011$ za podatke vremenskog toka i sve *post-hoc* $P \leq 0,026$ za *AUC* vrednosti; **Slika 4.12**). Kod ženki pacova, jedino je veća testirana doza duloksetina (25 mg/kg/dan) značajno smanjila hladnu preosetljivost (*post-hoc* $P = 0,005$ za vremenski tok i *post-hoc* $P = 0,005$ za *AUC* vrednosti; **Slika 4.12**), dok manja testirana doza duloksetina (15 mg/kg/dan) nije značajno uticala na nociceptivno ponašanje ženki pacova sa osteoartritisom (*post-hoc* $P = 0,387$ za podatke vremenskog toka i *post-hoc* $P = 0,304$ za *AUC* vrednosti; **Slika 4.12**).

Tabela 4.2 Poređenje efekata vortiooksetina i duloksetina u bihevioralnim testovima u modelu osteoartritisa izazvanog monoiodoacetatom kod pacova *Wistar* soja: uticaj pola.

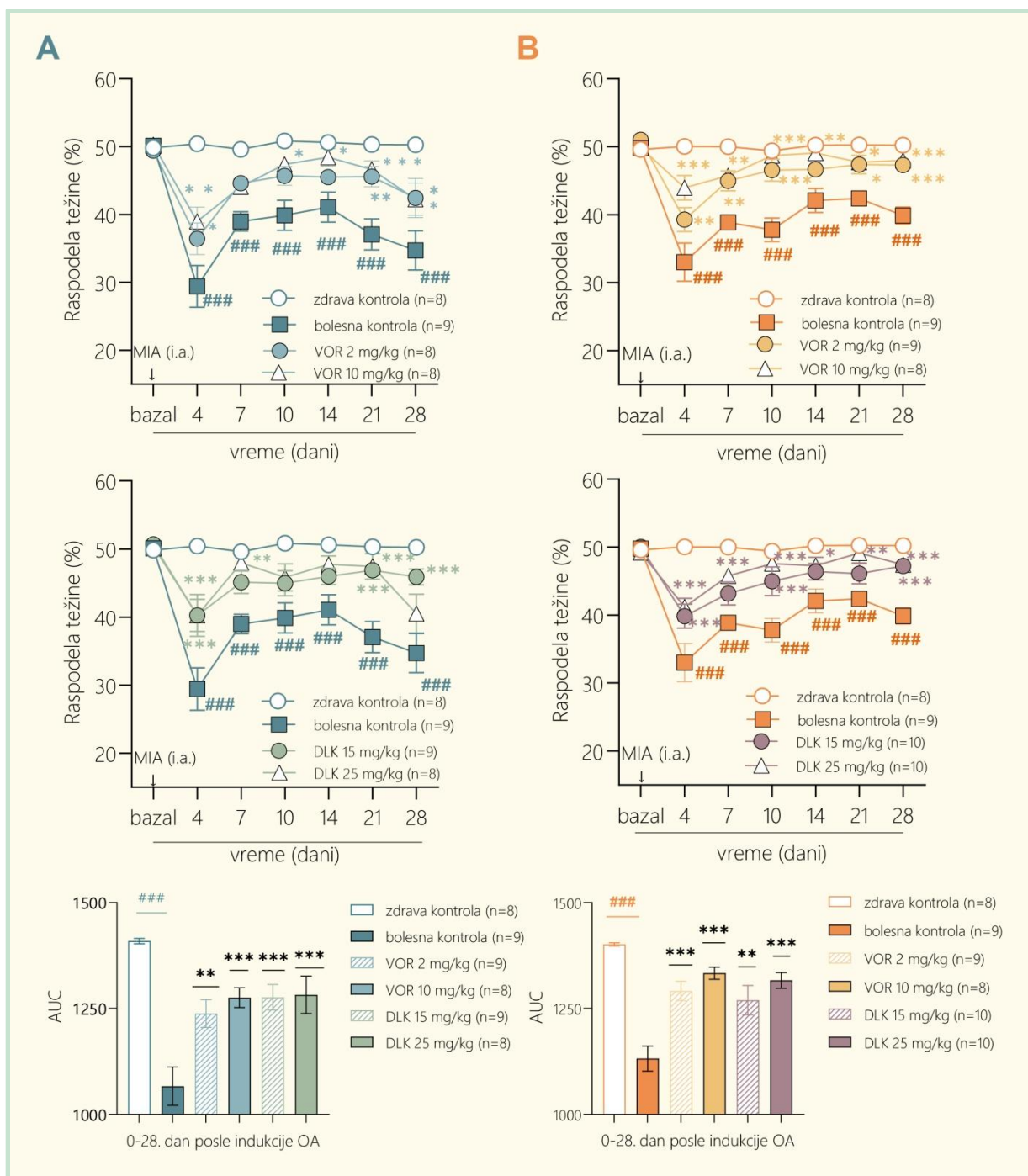
Test		Mužjaci	Ženke	Mužjaci vs ženke poređenje	Mužjaci	Ženke	Mužjaci vs ženke poređenje
		VOR 2 mg/kg		Studentov <i>t</i> -test	VOR 10 mg/kg		Studentov <i>t</i> -test
Test raspodele težine	AUC	1238,00	1291,45	<i>P</i> = 0,194	1275,63	1333,38	<i>P</i> = 0,054
	Antinociceptivni efekat (%) [*]	50,01%	59,26%	<i>P</i> = 0,48	61%	74,81%	<i>P</i> = 0,13
Von Frey	AUC	876,25	843,27	<i>P</i> = 0,17	919,46	893,47	<i>P</i> = 0,239
	Antinociceptivni efekat (%) [*]	53,71%	53,08%	<i>P</i> = 0,95	71,89%	73,62%	<i>P</i> = 0,85
Aceton	AUC	88,34	66,275	<i>P</i> = 0,495	39,71	56,93	<i>P</i> = 0,404
	Antinociceptivni efekat (%) ^{**}	72,69%	78,54%	<i>P</i> = 0,70	97,81%	82,37%	<i>P</i> = 0,14
Kopanje	AUC	39896,5	33042,78	<i>P</i> = 0,691	42035,28	33674	<i>P</i> = 0,007
<i>NORT</i>	Diskriminacioni indeks (%)	24,24	15,50	<i>P</i> = 0,454	28,37	32,22	<i>P</i> = 0,652
Test		DLX 15 mg/kg		Studentov <i>t</i> -test	DLX 25 mg/kg		Studentov <i>t</i> -test
Test raspodele težine	AUC	1276,66	1269,63	<i>P</i> = 0,882	1282,17	1316,32	<i>P</i> = 0,453
	Antinociceptivni efekat (%) [*]	61,29%	51,16%	<i>P</i> = 0,53	62,90%	68,49%	<i>P</i> = 0,69
Von Frey	AUC	879,92	811,46	<i>P</i> = 0,001	933,44	862,53	<i>P</i> < 0,001
	Antinociceptivni efekat (%) [*]	55,25%	40,08%	<i>P</i> = 0,05	77,78%	60,97%	<i>P</i> = 0,02
Aceton	AUC	129,91	133,24	<i>P</i> = 0,935	117,68	79,93	<i>P</i> = 0,341
	Antinociceptivni efekat (%) ^{**}	62,30%	46,70%	<i>P</i> = 0,31	68,83%	73,09%	<i>P</i> = 0,79
Kopanje	AUC	37063,87	27915,125	<i>P</i> = 0,010	30404,75	21829,22	<i>P</i> = 0,025
<i>NORT</i>	Diskriminacioni indeks (%)	20,84	29,48	<i>P</i> = 0,403	5,35	17,61	<i>P</i> = 0,313

Antinociceptivni efekat (%) ^{*}

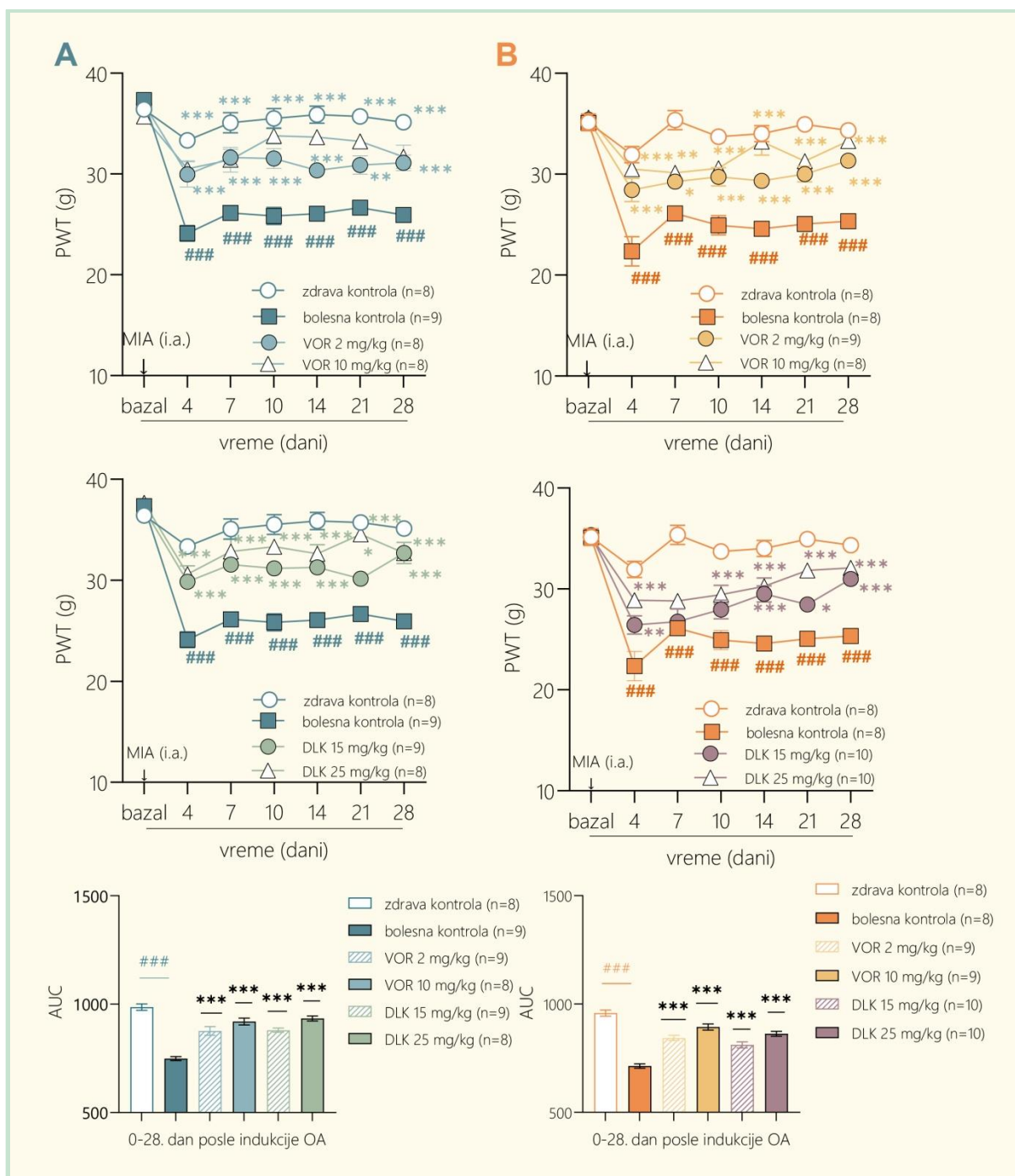
$$= \frac{\text{AUC vrednost test grupe} - \text{srednja vrednost AUC bolesne kontrolne grupe}}{\text{srednja vrednost AUC zdrave kontrolne grupe} - \text{srednja vrednost AUC bolesne kontrolne grupe}} \times 100$$

Antinociceptivni efekat (%) ^{**}

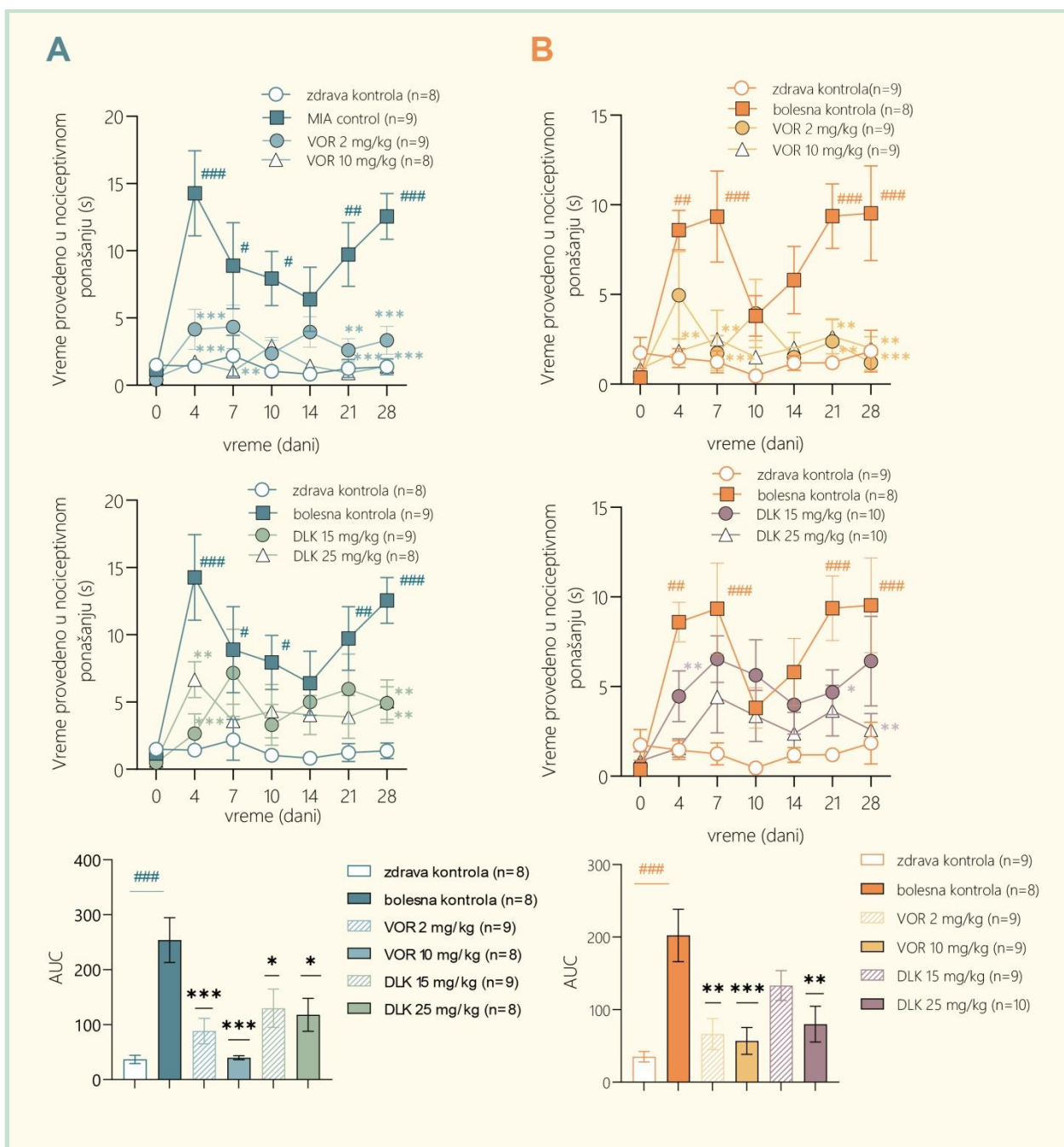
$$= \frac{\text{srednja vrednost AUC zdrave kontrolne grupe} - \text{AUC vrednost test grupe}}{\text{srednja vrednost AUC bolesne kontrolne grupe} - \text{srednja vrednost AUC zdrave kontrolne grupe}} \times 100$$



Slika 4.10. Primena vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) je smanjila disbalans raspodele težine kod mužjaka (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom indukovanim injekcijom monoiodoacetata. Rezultati su prikazani kao vremenski tok podataka u testu raspodele težine i površine ispod krive (AUC) dobijene tokom 28 dana eksperimenta. VOR/DLK je primenjen jednom dnevno tokom 28 dana eksperimenta. Statistička značajnost je određena između zdrave i bolesne kontrole ($###P < 0,001$), kao i između bolesne kontrole i tretmana ($**P < 0,01$; $***P < 0,001$), korišćenjem dvofaktorske ANOVA sa ponovljenim merenjima (podaci vremenskog toka) ili jednofaktorske ANOVA (AUC vrednosti) praćene *Tukey post-hoc* testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ($\pm$ standardna greška) raspodele težine (%) / AUC vrednosti.



Slika 4.11. Primena vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) je smanjila mehaničku preosetljivost kod mužjaka (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom. Rezultati su prikazani kao vremenski tok podataka u *von Frey* testu (PWT, mehanički prag povlačenja šape) i površine ispod krive (AUC) dobijene tokom 28 dana eksperimenta. VOR/DLK je primenjen jednom dnevno tokom 28 dana eksperimenta. Statistička značajnost je određena između zdrave i bolesne kontrole ($^{###}P < 0,001$), kao i između bolesne kontrole i tretmana ($^{**}P < 0,01$; $^{***}P < 0,001$), korišćenjem dvofaktorske ANOVA sa ponovljenim merenjima (podaci vremenskog toka) ili jednofaktorske ANOVA (AUC vrednosti) praćene *Tukey post-hoc* testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ($\pm$ standardna greška) PWT/AUC vrednosti.



Slika 4.12. Primena vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) je smanjila hladnu preosetljivost kod mužjaka (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom indukovanim injekcijom monojodoacetata. Rezultati su prikazani kao vremenski tok podataka (vreme koje su životinje provele u bolnom ponašanju) u aceton testu (t (s)) i površine ispod krive (AUC) dobijene tokom 28 dana eksperimenta. VOR/DLK je primenjen jednom dnevno tokom 28 dana eksperimenta. Statistička značajnost je određena između zdrave i bolesne kontrole (### $P < 0,001$), kao i između bolesne kontrole i tretmana (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$), korišćenjem dvofaktorske ANOVA sa ponovljenim merenjima (podaci vremenskog toka) ili jednofaktorske ANOVA (AUC vrednosti) praćene Tukey post-hoc testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ($\pm$ standardna greška) t (s)/ AUC vrednosti.

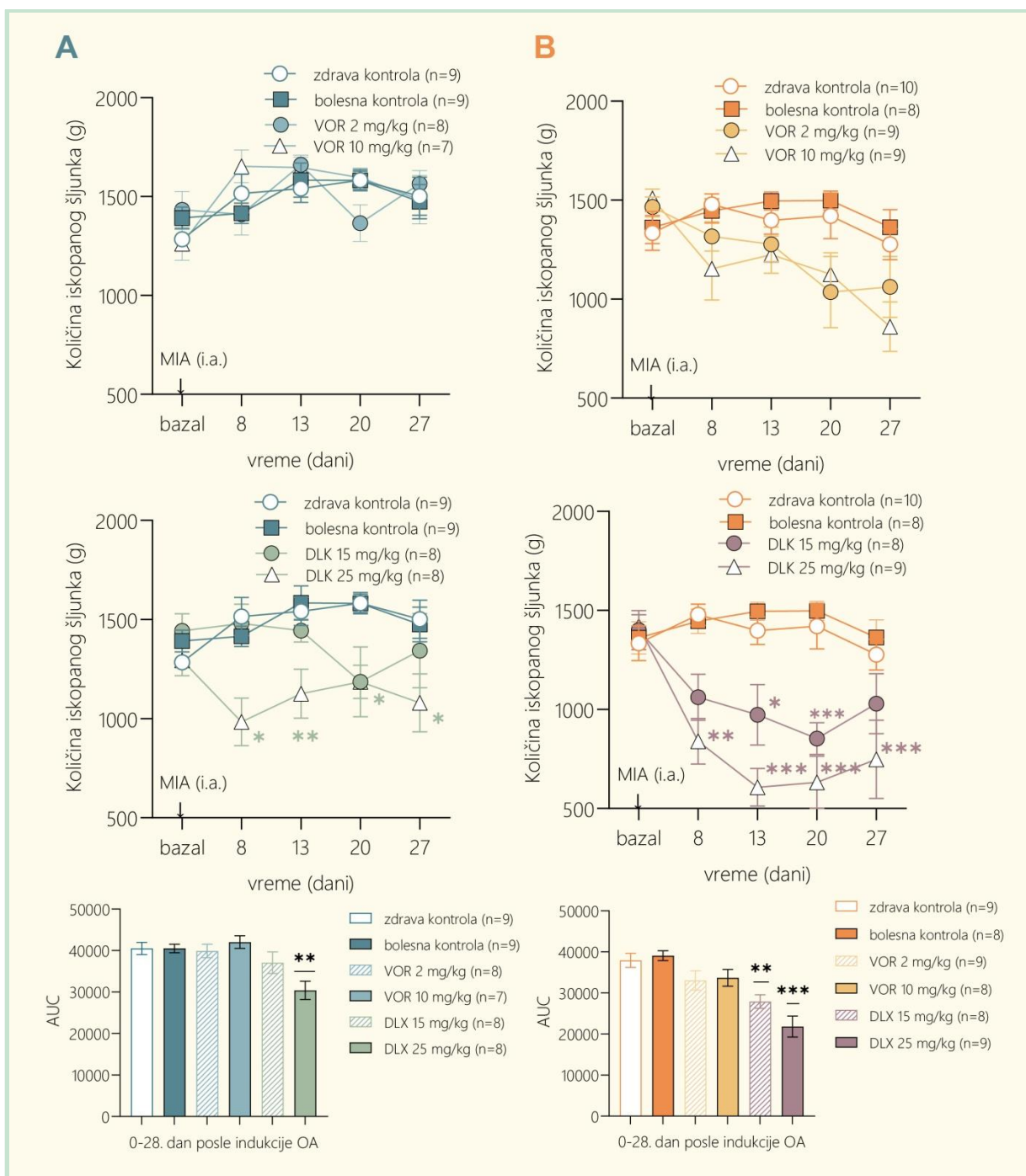
4.2.2. Uticaj vortioksetina na opštu dobrobit životinja sa osteoartritisom u testu kopanja

U testu kopanja, osteoartritis indukovan monojodoacetatom nije doveo do značajnih promena u količini iskopanog materijala u poređenju sa zdravom kontrolom koja je primila intraartikularnu injekciju fiziološkog rastvora, kod životinja oba pola, tokom celokupnog perioda praćenja (sve *post-hoc* $P \geq 0,998$ za podatke vremenskog toka i sve *post-hoc* $P \geq 0,999$ za *AUC* vrednosti; **Slika 4.13**). Dodatno, nisu uočene ni polne razlike u količini iskopanog materijala kod kontrolnih grupa životinja (**Tabela 4.1**). Ponavljana primena vortioksetina (2 i 10 mg/kg/dan) nije imala statistički značajan uticaj na aktivnost kopanja kod mužjaka pacova (*post-hoc* $P \geq 0,999$ za podatke vremenskog toka i *post-hoc* $P \geq 0,991$ za *AUC* vrednosti; **Slika 4.13**) u poređenju sa bolesnom kontrolom. Kod ženki pacova, postojalo je blago smanjenje količine iskopanog šljunka u poređenju sa bolesnom kontrolom. Ove promene nisu dostigle statističku značajnost kada se analiziraju podaci vremenskog toka (*post-hoc* $P \geq 0,399$) ili smanjenje *AUC* vrednosti (*post-hoc* $P \geq 0,298$).

Kod mužjaka pacova, veća testirana doza duloksetina (25 mg/kg/dan) je statistički značajno smanjila količinu iskopanog šljunka u testu kopanja u poređenju sa bolesnom kontrolom (*post-hoc* $P = 0,005$ za vremenski tok i *post-hoc* $P = 0,003$ za *AUC* vrednosti), dok niža testirana doza duloksetina (15 mg/kg/dan) nije imala značajan uticaj na aktivnost kopanja (*post-hoc* $P = 0,842$ za podatke vremenskog toka i *post-hoc* $P = 0,741$ za *AUC* podatke; **Slika 4.13**).

Kod ženki pacova, obe testirane doze duloksetina (15 i 25 mg/kg/dan) su značajno i dozno-zavisno smanjile količinu iskopanog materijala (sve *post-hoc* $P \leq 0,015$ za podatke vremenskog toka i sve *post-hoc* $P \leq 0,005$ za *AUC* vrednosti; **Slika 4.13**). Efekat duloksetina kod ženki pacova je bio dozno-zavisan; *AUC* vrednosti su smanjene za 28,6% (15 mg/kg/dan) i 44,1% (25 mg/kg/dan) u poređenju sa *AUC* vrednostima bolesne kontrolne grupe životinja.

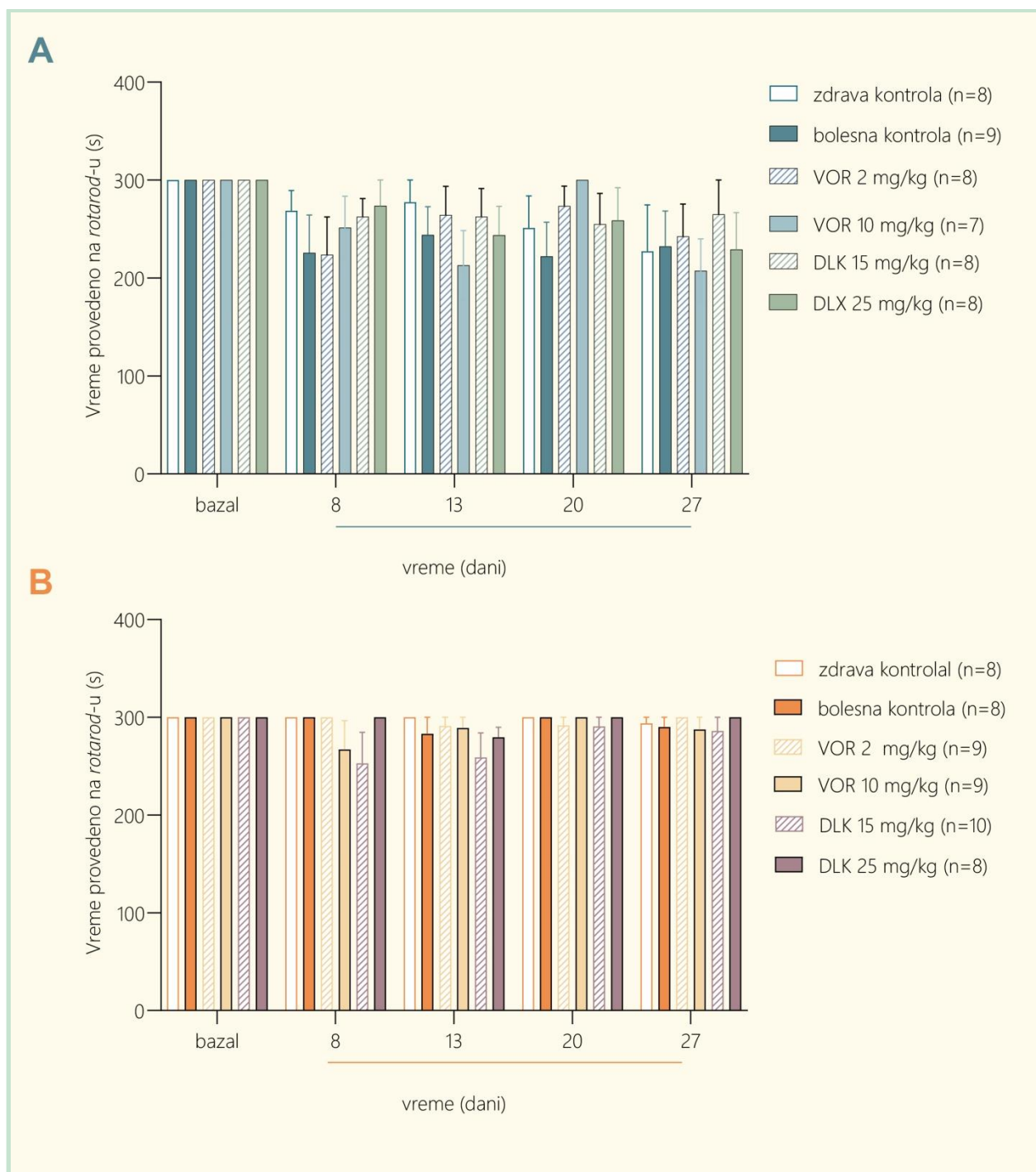
Dodatno, uočene su i značajne polne razlike u *AUC* vrednostima kod životinja tretiranih većom dozom vortioksetina, kao i kod obe doze duloksetina; ženke su značajno manje kopale pod uticajem primenjenih tretmana (**Tabela 4.2**).



Slika 4.13. Uticaj vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) na aktivnost kopanja kod mužjaka (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom indukovanim injekcijom monoiodoacetata. Rezultati su prikazani kao vremenski tok količine iskapanog materijala u testu kopanja (g) i površine ispod krive (AUC) dobijene tokom 28 dana eksperimenta. VOR/DLK je primenjen jednom dnevno tokom 28 dana eksperimenta. Statistička značajnost je određena između bolesne kontrole i tretmana (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$), korišćenjem dvofaktorske ANOVA sa ponovljenim merenjima (podaci vremenskog toka) ili jednofaktorske ANOVA (AUC vrednosti) praćene *Tukey post-hoc* testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ($\pm$ standardna greška) količine iskapanog materijala (g)/ AUC vrednosti.

4.2.3. Uticaj vortioksetina na motorne performanse životinja sa osteoartritisom

U *rotarod* testu praćen je uticaj ponavljane primene vortioksetina (2 i 10 mg/kg/dan) i duloksetina (15 i 25 mg/kg/dan) na motornu spretnost pacova koji su razvili osteoartritis. Nije zabeležen statistički značajan uticaj ni najviših primenjenih doza ispitivanih tretmana na performanse životinja na *rotarod*-u tokom 5 minuta (sve *post-hoc* $P \geq 0,273$, dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima; **Slika 4.14**).



Slika 4.14. Primena vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) nije uticala na motorne performanse mužjaka (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom. Vreme koje su životinje provele na *rotarod*-u je mereno pre indukcije osteoartritisa (bazal) i u četiri vremenske tačke tokom 28 dana nakon injekcije monojodoacetata/ fiziološkog rastvora. VOR/DLK su primenjivani jednom dnevno tokom 28 dana. Statistička značajnost je određena korišćenjem dvofaktorske ANOVA sa ponovljenim merenjima, praćene *Tukey post-hoc* testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ($\pm$ standardna greška) vremena koje su životinje provele na *rotarod*-u.

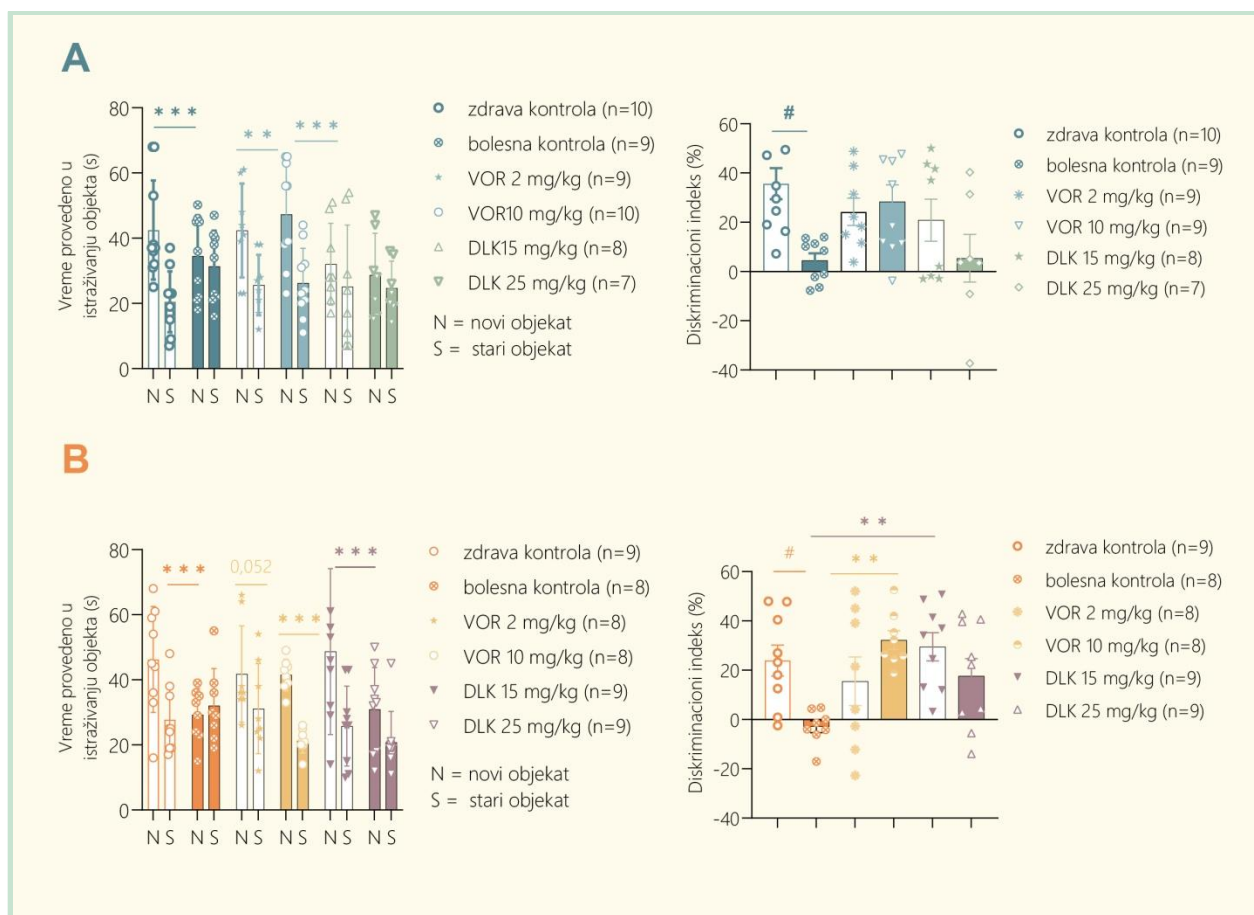
4.3. Uticaj vortiooksetina na kognitivne performanse životinja sa osteoartritisom

U testu prepoznavanja novog objekta primećeno je da razvoj hronične bolne preosetljivosti u modelu osteoartritisa izazvanog monojodoacetatom kod pacova prati i pogoršanje kognitivnih performansi, tj. pacovi u zdravoj kontrolnoj grupi su proveli značajno više vremena istražujući novi objekat u odnosu na stari (*post-hoc* $P < 0,001$ za životinje oba pola; **Slika 4.15**), dok kod pacova bolesne kontrolne grupe nije uočena razlika u vremenu koje su životinje provele istražujući stari i novi predmet (*post-hoc* $P = 0,488$ za mužjake pacova i *post-hoc* $P = 0,641$ za ženke pacova; **Slika 4.15**). Posledično, diskriminacioni indeksi kod bolesne kontrolne grupe su bili statistički značajno niži u poređenju sa istim parametrom kod zdrave kontrole (sve *post-hoc* $P = 0,015$ za mužjake pacova i *post-hoc* $P = 0,049$ za ženke pacova; **Slika 4.15**).

Ponavljana primena vortiooksetina je dovela do značajnog poboljšanja kognitivnih performansi pacova sa osteoartritisom izazvanim monojodoacetatom. Kod mužjaka pacova, obe testirane doze vortiooksetina (2 i 10 mg/kg/dan) su proizvele statistički značajan efekat i životinje su provele značajno više vremena istražujući novi objekat u odnosu na stari (svi *post-hoc* $P \leq 0,001$; **Slika 4.15**). Ovo je posledično dovelo do povećanja diskriminacionih indeksa u poređenju sa bolesnom kontrolom (*post-hoc* $P = 0,328$ za 2 mg/kg/dan i *post-hoc* $P = 0,111$ za 10 mg/kg/dan; **Slika 4.15**). Slični rezultati su zabeleženi i kod ženki pacova, životinje su značajno više vremena provodile istražujući novi predmet (*post-hoc* $P = 0,052$ za 2 mg/kg/dan i $P < 0,001$ za 10 mg/kg/dan; **Slika 4.15**), pa su i vrednosti diskriminacionog indeksa bile značajno veće u poređenju sa bolesnom kontrolnom grupom životinja (*post-hoc* $P = 0,364$ za dozu od 2 mg/kg/dan i *post-hoc* $P = 0,006$ za dozu 10 mg/kg/dan; **Slika 4.15**).

Kod mužjaka pacova, ponavljana primena duloksetina nije proizvela značajan efekat u testu prepoznavanja novog objekta; životinje su provele slično vreme istražujući novi i stari predmet (*post-hoc* $P = 0,155$ za dozu od 15 mg/kg/dan i *post-hoc* $P = 0,435$ za dozu od 25 mg/kg/dan; **Slika 4.15**). Manja testirana doza duloksetina (15 mg/kg/dan) kod mužjaka pacova je blago povećala diskriminacioni indeks, ali nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na bolesnu kontrolnu grupu (*post-hoc* $P = 0,536$ za dozu od 15 mg/kg/dan i *post-hoc* $P = 0,999$ za dozu od 25 mg/kg/dan; **Slika 4.15**).

Kod ženki pacova, obe testirane doze duloksetina (15 mg/kg/dan i 25 mg/kg/dan) su proizvele statistički značajan efekat u testu prepoznavanja novog objekta. Životinje tretirane manjom dozom duloksetina su provele značajno više vremena proučavajući novi predmet u poređenju sa poznatim predmetom (*post-hoc* $P < 0,001$; **Slika 4.15**) i njihovi diskriminacioni indeksi su bili značajno veći u poređenju sa ovim parametrom kod bolesne kontrolne grupe (*post-hoc* $P = 0,009$; **Slika 4.15**). Veća testirana doza duloksetina (25 mg/kg/dan) kod ženki pacova je proizvela manji efekat u ovom testu (*post-hoc* $P = 0,049$ za razliku u vremenu koje su životinje provele istražujući novi u odnosu na stari predmet i *post-hoc* $P = 0,223$ za diskriminacioni indeks u poređenju sa bolesnom kontrolom; **Slika 4.15**).



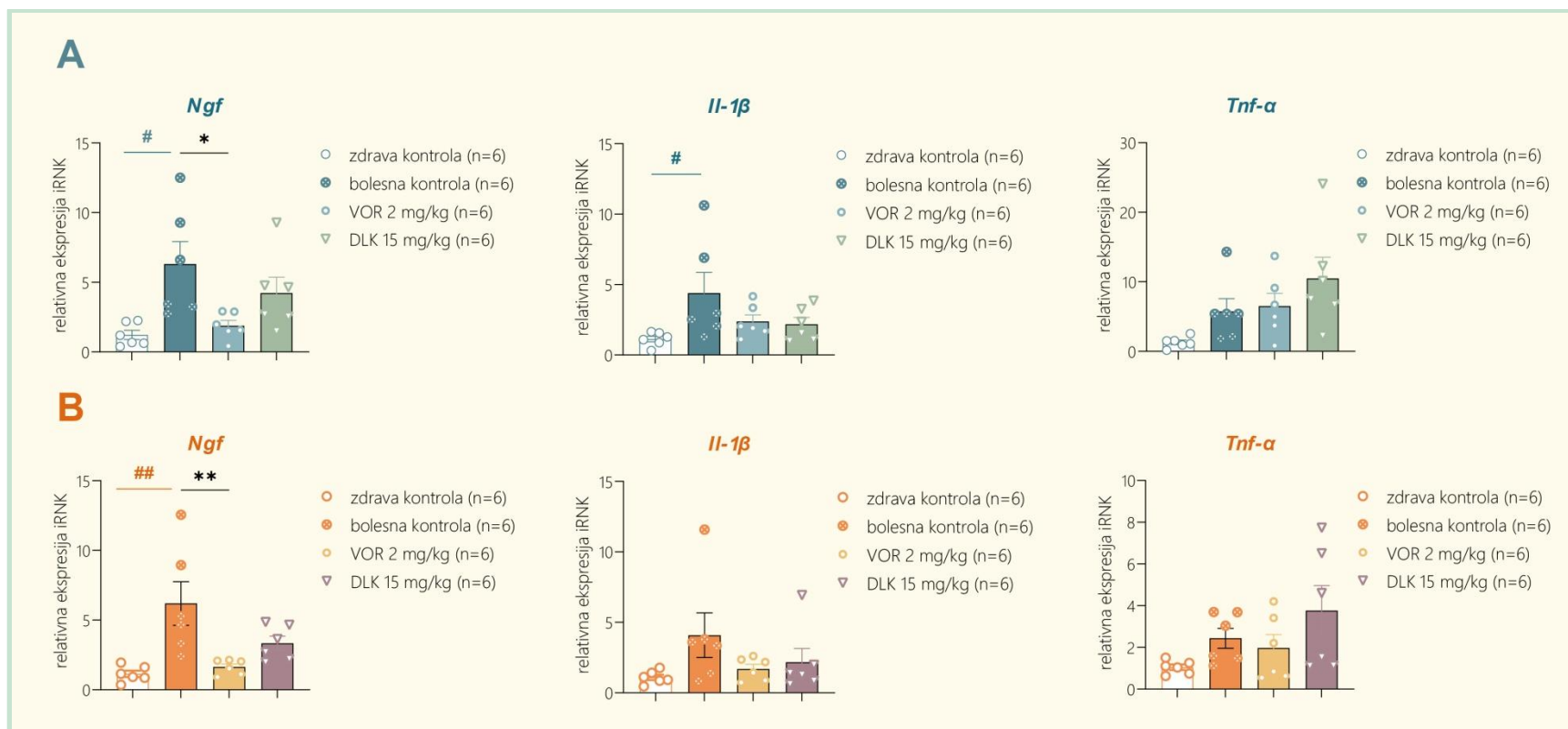
Slika 4.15. Uticaj vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) na kognitivne performanse u testu prepoznavanja novog objekta kod mužjaka (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom indukovanim injekcijom monojodoacetata. Rezultati su prikazani kao vreme (u sekundama) koje su životinje provele istražujući novi (N) i stari (S) objekat i diskriminacioni indeks dobijen 27. dana nakon indukcije osteoartritisa. VOR/DLK je primenjivan svakodnevno tokom 28 dana eksperimenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ($\pm$ standardna greška). Vreme provedeno u istraživanju N i S objekta je analizirano korišćenjem dvofaktorske ANOVA praćene *Tukey post-hoc* testom (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$), dok je razlika u diskriminacionim indeksima analizirana korišćenjem jednofaktorske ANOVA uz *Tukey post-hoc* test (# $P < 0,05$ za poređenje zdrave i bolesne kontrole; ** $P < 0,01$ za poređenje ispitivanih tretmana i bolesne kontrole).

4.4. Mehanizam dejstva vortioksetina u animalnom modelu osteoartritisa

4.4.1. Uticaj vortioksetina na gensku ekspresiju markera bolne presetljivosti u kolenu životinja sa osteoartritisom

Intraartikularna injekcija monojodoacetata dovela je do statistički značajnog povećanja nivoa iRNK za *Ngf* u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom kod životinja oba pola (*post-hoc* $P = 0,010$ kod mužjaka pacova i *post-hoc* $P = 0,002$ kod ženki pacova; **Slika 4.16**). Nivoi iRNK za *Il-1 β* su takođe bili povećani, ali je statistička značajnost postignuta samo kod mužjaka (*post-hoc* $P = 0,048$ kod mužjaka i *post-hoc* $P = 0,150$ kod ženki pacova; **Slika 4.16**). Nivo ekspresije iRNK za *Tnf- α* nije bio značajno povišen kod bolesne kontrolne grupe u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom kod životinja oba pola (*post-hoc* $P = 0,421$ kod mužjaka i *post-hoc* $P = 0,538$ kod ženki pacova; **Slika 4.16**). Sumarno, ekspresija inflamatornih medijatora (*Il-1 β* i *Ngf*) u tkivu kolena je povećana kod bolesnih kontrolnih grupa životinja oba pola 4 nedelje nakon indukcije osteoartritisa.

Ponavljana primena vortioksetina (2 mg/kg/dan tokom 28 dana) je značajno smanjila nivo iRNK za *Ngf* u kolenu životinja oba pola u poređenju sa bolesnom kontrolom (*post-hoc* $P = 0,030$ kod mužjaka pacova i *post-hoc* $P = 0,005$ kod ženki pacova; **Slika 4.16**). Smanjenje je bilo više od tri puta u odnosu na bolesnu kontrolu i bilo je uporedivo sa zdravom kontrolom (životinje koje su primile fiziološki rastvor). S druge strane, duloksetin (15 mg/kg/dan tokom 28 dana) nije značajno smanjio gensku ekspresiju *Ngf* (*post-hoc* $P = 0,49$ kod mužjaka pacova i *post-hoc* $P = 0,110$ kod ženki pacova; **Slika 4.16**).



Slika 4.16. Uticaj vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) na ekspresiju iRNK za *Ngf*, *Il-1 β* , i *Tnf- α* u kolenu mužjaka (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom izazvanim monoiodoacetatom. Koleno je izolovano 28 dana nakon injekcije monoiodoacetata/fiziološkog rastvora i ekspresija iRNK za *Ngf*, *Il-1 β* , i *Tnf- α* je određena primenom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. RT-*qPCR*). VOR/DLK su primenjivani svakodnevno tokom 28 dana. Statistička značajnost je određena između zdrave i bolesne kontrole ($^{\#}P < 0,05$, $^{\#\#}P < 0,01$), kao i između bolesne kontrole i tretmana ($^*P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$), korišćenjem jednofaktorske ANOVA praćene *Tukey post-hoc* testom. Skater dijagram predstavlja rezultate individualne životinje, sa srednjom vrednošću ($\pm$ standardna greška).

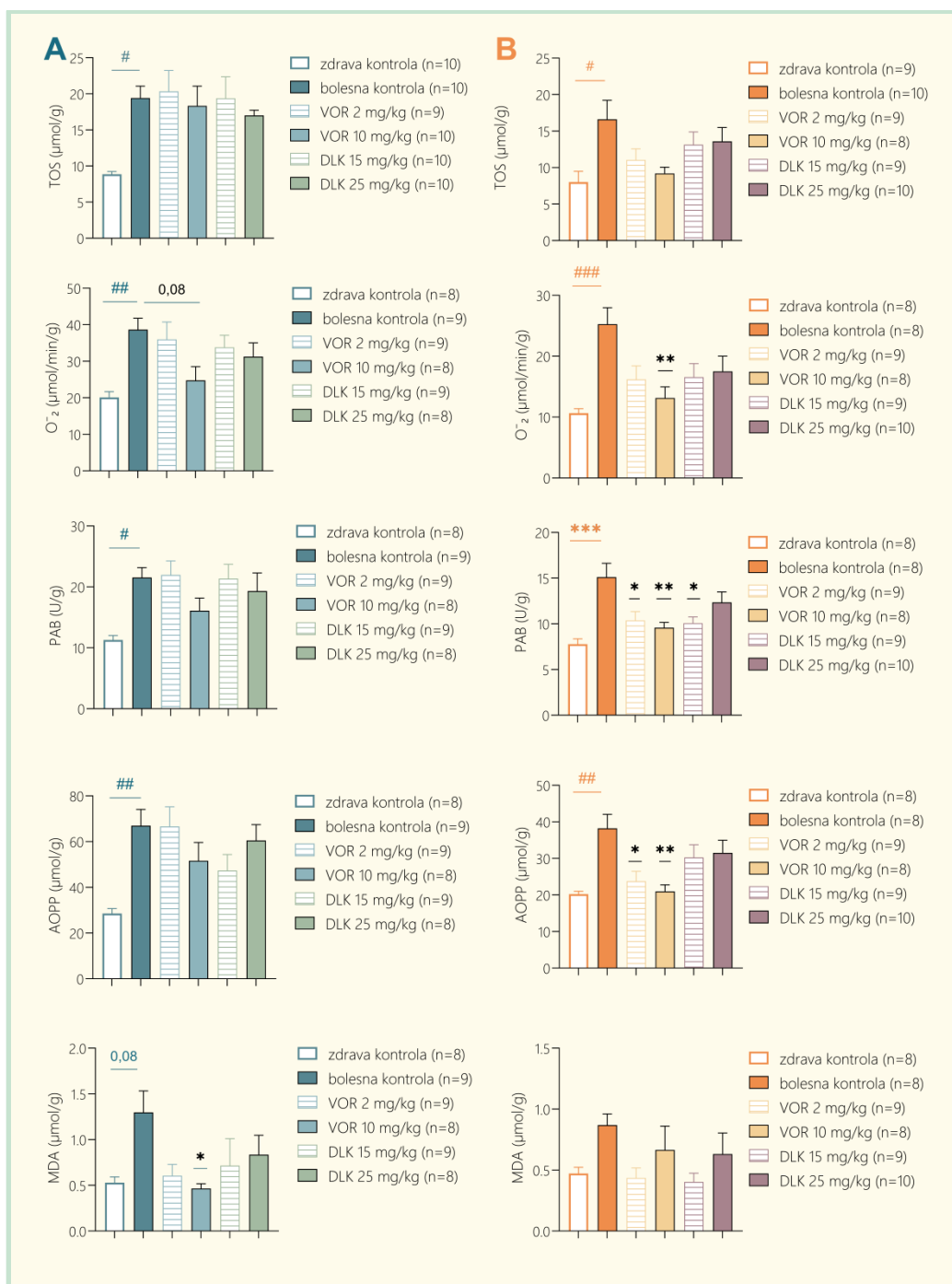
4.4.2. Uticaj vortiooksetina na parametre oksidativnog stresa u kolenu životinja sa osteoartritisom

Intraartikularna injekcija monojodoacetata dovela je do statistički značajnog povećanja nivoa prooksidanasa (TOS, $O_2^{\bullet-}$, PAB) i njihovih oksidacionih produkata (AOPP) u poređenju sa zdravom kontrolnom grupom životinja kod životinja oba pola (svi *post-hoc* $P \leq 0,02$; **Slika 4.17**). Nivo MDA je bio povećan kod mužjaka pacova, ali nije dostigao statističku značajnost (*post-hoc* $P = 0,08$), dok je kod ženki pacova izostalo ovo povećanje (*post-hoc* $P = 0,28$; **Slika 4.17**). Povećanje u nivoima parametara oksidativnog stresa je bilo izraženije kod mužjaka pacova; nivoi $O_2^{\bullet-}$, PAB i AOPP su bili značajno viši kod mužjaka u odnosu na ženke (svi *post-hoc* $P \leq 0,012$; **Tabela 4.3**).

Ponavljana primena veće doze vortiooksetina (10 mg/kg/dan tokom 28 dana) kod ženki pacova je značajno smanjila nivoe $O_2^{\bullet-}$, PAB i AOPP (svi *post-hoc* $P \leq 0,003$; **Slika 4.17**), dok je manja doza vortiooksetina (2 mg/kg/dan) statistički značajno smanjila nivoe PAB i AOPP (svi *post-hoc* $P = 0,02$). Vortiooksetin (10 mg/kg/dan tokom 28 dana) je pokazao manju efikasnost kod mužjaka pacova u smanjivanju parametara oksidativnog stresa i značajno je smanjio nivoe $O_2^{\bullet-}$ (*post-hoc* $P = 0,08$) i MDA (*post-hoc* $P = 0,04$; **Slika 4.17**). Ponavljana primena manje doze duloksetina (15 mg/kg/dan tokom 28 dana) kod ženki pacova je statistički značajno smanjila nivo PAB (*post-hoc* $P = 0,01$; **Slika 4.17**), dok nije imala statistički značajan uticaj na ostale markere oksidativnog oštećenja (svi *post-hoc* $P \leq 0,08$; **Slika 4.17**). Primena veće doze duloksetina (25 mg/kg/dan tokom 28 dana) kod ženki pacova nije imala značajan uticaj na parametre oksidativnog stresa u poređenju sa bolesnom kontrolom (svi *post-hoc* $P \geq 0,14$; **Slika 4.17**). Ponavljana primena duloksetina (15 i 25 mg/kg/dan tokom 28 dana) kod mužjaka pacova nije imala značajan uticaj na parametre oksidativnog stresa (svi *post-hoc* $P \geq 0,26$; **Slika 4.17**).

Tabela 4.3. Nivo markera oksidativnog oštećenja u modelu osteoartritisa izazvanog monojodoacetatom kod pacova *Wistar* soja: uticaj pola

Marker oksidativnog oštećenja	Bolesna kontrola			Zdrava kontrola		
	Mušjaci	Ženke	Mušjaci vs ženke poređenje	Mušjaci	Ženke	Mušjaci vs ženke poređenje
	Nivo markera oksidativnog oštećenja (srednja vrednost)		Studentov <i>t</i> -test	Nivo markera oksidativnog oštećenja (srednja vrednost)		Studentov <i>t</i> -test
TOS	19,43	16,61	$P = 0,370$	8,873	8,019	$P = 0,560$
$O_2^{\bullet-}$	38,65	25,25	$P = 0,006$	20,12	10,64	$P < 0,001$
PAB	21,54	15,11	$P = 0,012$	11,28	7,767	$P = 0,002$
AOPP	66,97	38,22	$P = 0,004$	28,57	20,21	$P = 0,002$
MDA	1,30	0,87	$P = 0,127$	0,530	0,472	$P = 0,490$



Slika 4.17. Uticaj vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) na markere oksidativnog stresa u kolenu mužjaka (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom izazvanim monojodoacetatom. Koleno je izolovano 28. dana nakon injekcije monojodoacetata/fiziološkog rastvora i nivoi totalnog oksidantnog statusa (TOS), superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$), prookisativnog-antioksidativnog balansa (PAB), proteinskih produkata uznapredovale oksidacije (AOPP) i malondialdehida (MDA) su određeni. VOR/DLK su primenjivani svakodnevno tokom 28 dana. Statistička značajnost je određena između zdrave i bolesne kontrole ($^{\#}P < 0,05$, $^{##}P < 0,01$, $^{###}P < 0,001$), kao i između bolesne kontrole i tretmana ($^*P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$), korišćenjem jednofaktorske ANOVA praćene *Tukey post-hoc* testom.

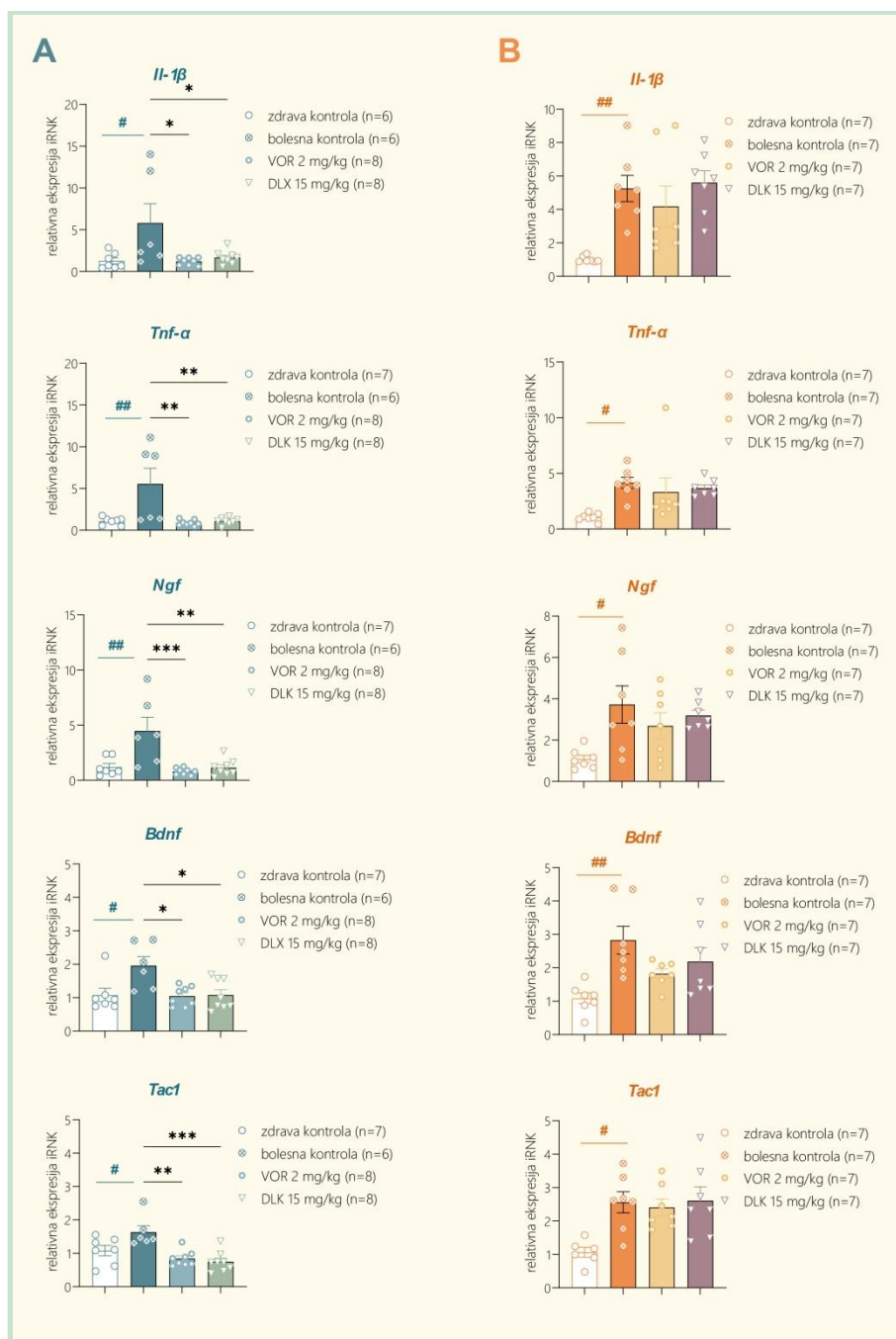
4.4.3. Uticaj vortioksetina na ekspresiju medijatora bolne preosetljivosti u L3-L5 spinalnim ganglijama i kičmenoj moždini životinja sa osteoartritisom

Intraartikularna injekcija monojodoacetata dovela je do statistički značajnog povećanja nivoa iRNK za *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Ngf*, *Bdnf* i *Tac1* (gen koji kodira supstancu P) u ipsilateralnim L3-L5 ganglijama dorzalnih korenova kičmene moždine u poređenju sa zdravom kontrolom kod životinja oba pola (svi *post-hoc* $P \leq 0,045$; **Slika 4.18**).

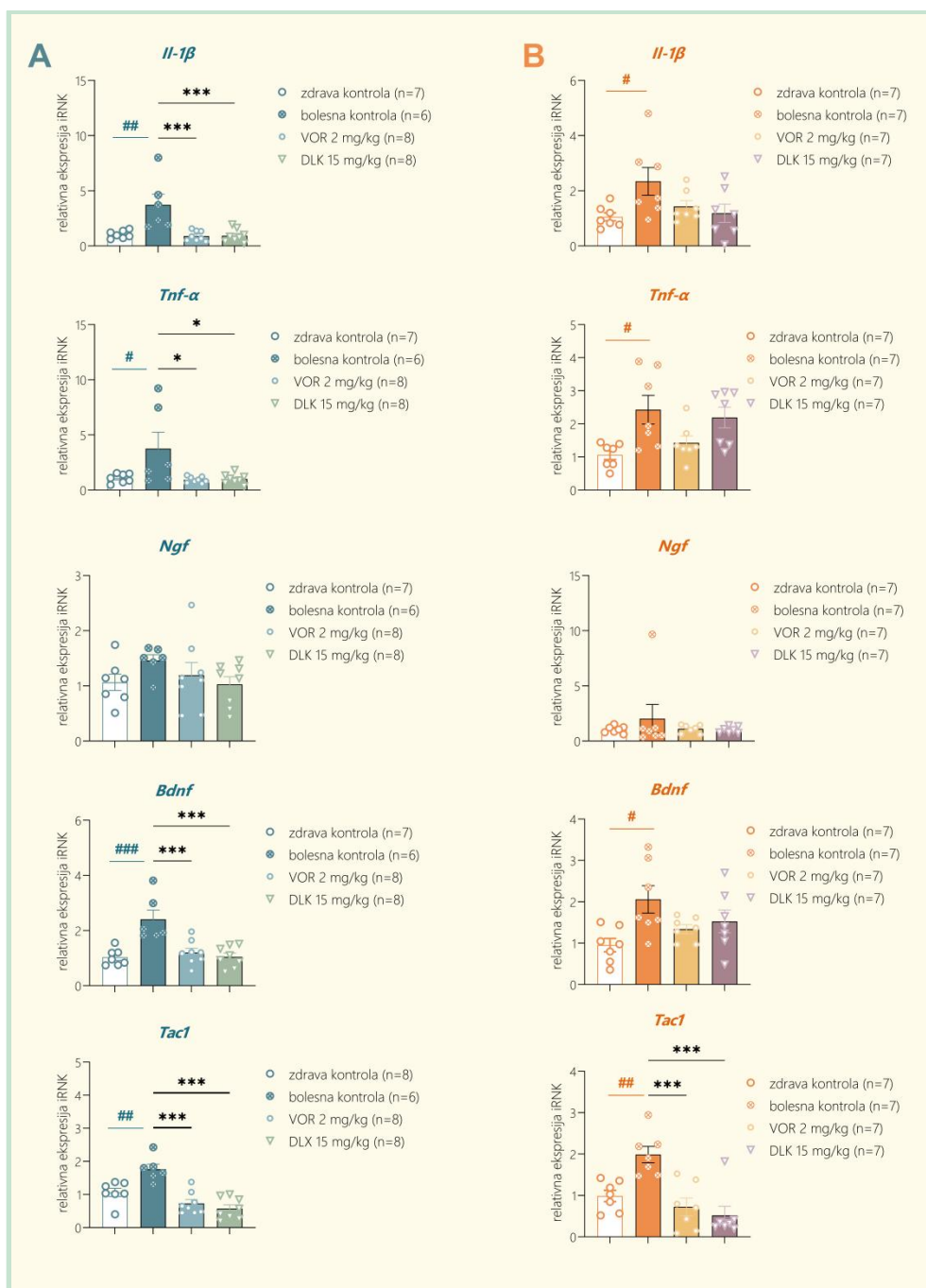
Ponavljana primena vortioksetina (2 mg/kg/dan tokom 28 dana) i duloksetina (15 mg/kg/dan tokom 28 dana) kod mužjaka pacova je dovela do statistički značajnog smanjenja ekspresije iRNK za *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Ngf*, *Bdnf* i *Tac1* u dorzalnim ganglijama u poređenju sa bolesnom kontrolnom grupom životinja (svi *post-hoc* $P \leq 0,020$; **Slika 4.18**). Suprotno, kod ženki pacova tretiranih antidepresivima nije zabeleženo smanjenje nivoa iRNK za ispitivane medijatore (svi *post-hoc* $P \geq 0,130$; **Slika 4.18**).

Slično, kod životinja oba pola tretiranih monojodoacetatom zabeleženo je statistički značajno povećanje ekspresije *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Bdnf* i *Tac1* u segmentu L3-L5 kičmene moždine u poređenju sa zdravom kontrolom (svi *post-hoc* $P \leq 0,040$; **Slika 4.19**).

Primena vortioksetina (2 mg/kg/dan tokom 28 dana) i duloksetina (15 mg/kg/dan tokom 28 dana) kod mužjaka pacova je značajno smanjila gensku ekspresiju *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Bdnf* i *Tac1* u kičmenoj moždini u poređenju sa bolesnom kontrolom (svi *post-hoc* $P \leq 0,030$; **Slika 4.19**). Kod ženki pacova, ponavljana primena antidepresiva je značajno smanjila samo ekspresiju *Tac1* na nivou L3-L5 segmenta kičmene moždine (*post-hoc* $P < 0,001$; **Slika 4.19**).



Slika 4.18. Uticaj vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) na ekspresiju iRNK za *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Ngf*, *Bdnf* i *Tac1* u L3-L5 spinalnim ganglijama (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom izazvanim monojodoacetatom. Ganglije su izolovane 28 dana nakon injekcije monojodoacetata/fiziološkog rastvora i ekspresija iRNK za *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Ngf*, *Bdnf* i *Tac1* je određena primenom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. RT-qPCR). VOR/DLK su primenjivani svakodnevno tokom 28 dana. Statistička značajnost je određena između zdrave i bolesne kontrole ($^{\#}P < 0,05$, $^{##}P < 0,01$), kao i između bolesne kontrole i tretmana ($^*P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$, $^{***}P < 0,001$), korišćenjem jednofaktorske ANOVA praćene *Tukey post-hoc* testom. Skater dijagram predstavlja rezultate individualne životinje, sa srednjom vrednošću ($\pm$ standardna greška).



Slika 4.19. Uticaj vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) na ekspresiju iRNK za *IL-1β*, *Tnf-α*, *Ngf*, *Bdnf* i *Tac1* u L3-L5 segmentu kičmene moždine mužjaka (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom izazvanim monojodoacetatom. Kičmena moždina je izolovana 28 dana nakon injekcije monojodoacetata/fiziološkog rastvora i ekspresija iRNK za *IL-1β*, *Tnf-α*, *Ngf*, *Bdnf* i *Tac1* je određena primenom kvantitativne lančane reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. RT-qPCR). VOR/DLK su primenjivani svakodnevno tokom 28 dana. Statistička značajnost je određena između zdrave i bolesne kontrole ($^{\#}P < 0,05$, $^{##}P < 0,01$, $^{###}P < 0,001$), kao i između bolesne kontrole i tretmana ($^*P < 0,05$, $^{***}P < 0,001$), korišćenjem jednofaktorske ANOVA praćene *Tukey post-hoc* testom. Skater dijagram predstavlja rezultate individualne životinje, sa srednjom vrednošću ($\pm$ standardna greška).

4.5. Uticaj vortioksetina na parametre redoks statusa i histološke promene kardiomiocita u modelu osteoartritisa

4.5.1. Uticaj vortioksetina na parametre oksidativnog stresa u srčanom mišiću životinja sa osteoartritisom

Indukcija osteoartritisa primenom injekcije monojodoacetata nije dovela do značajnih promena u parametarima redoks statusa u srcu životinja oba pola, preciznije nivoi parametara oksidativnog stresa (TOS, $O_2^{\bullet-}$, PAB, AOPP i MDA), kao i parametri antioksidativne zaštite (aktivnost SOD i nivo SH grupa) se nisu značajno razlikovali u odnosu na iste parametre u zdravoj kontrolnoj grupi životinja (svi *post-hoc* $P \geq 0,98$ za mužjake pacova i svi *post-hoc* $P \geq 0,92$ za ženke pacova; **Slika 4.20**).

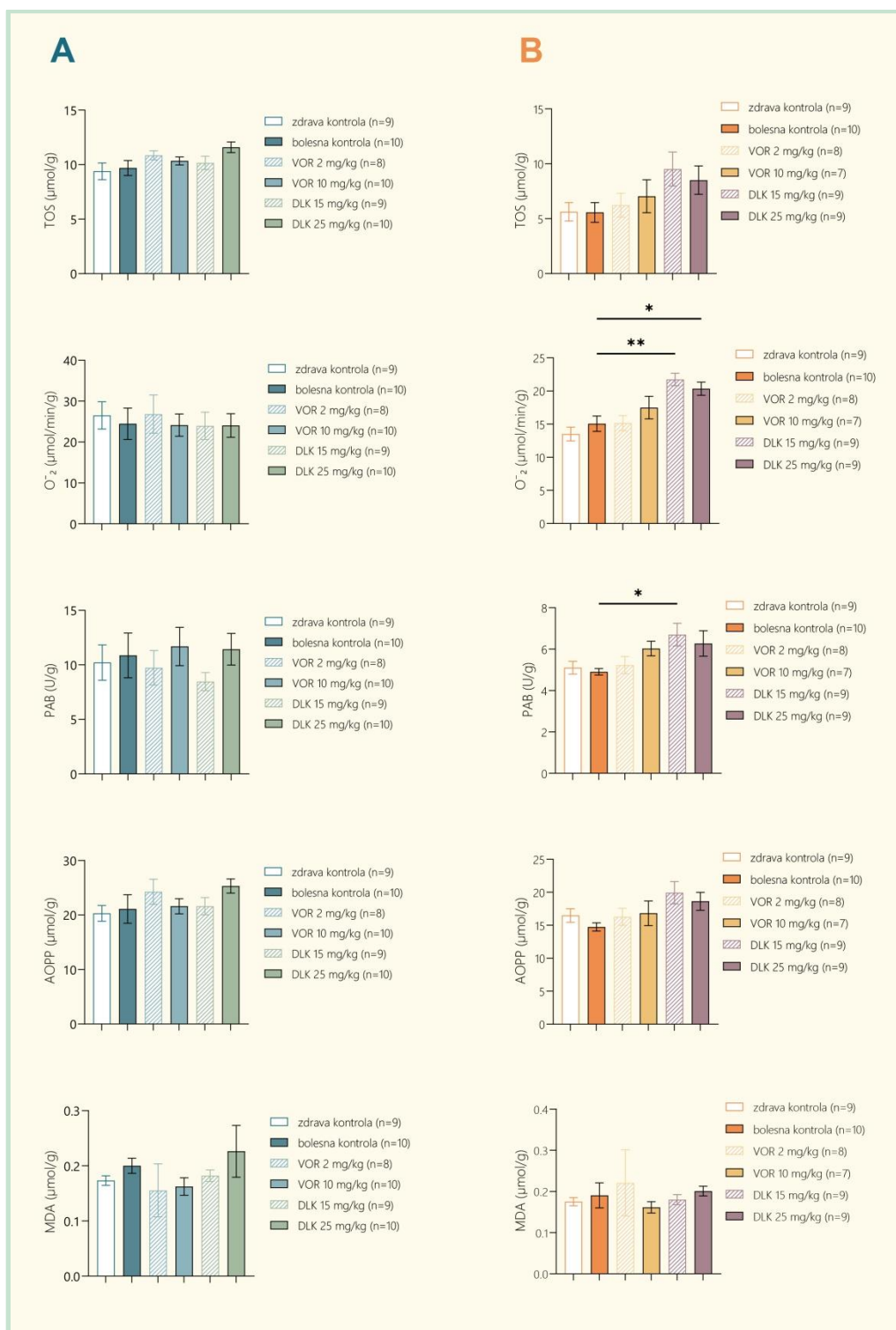
Ponavljana primena vortioksetina (2 i 10 mg/kg/dan tokom 28 dana) nije proizvela značajne promene u parametrima oksidativnog stresa u srčanom mišiću kod životinja oba pola (svi *post-hoc* $P \geq 0,73$ kod mužjaka i svi *post-hoc* $P \geq 0,47$ kod ženki pacova; **Slika 4.20**).

S druge strane, obe testirane doze duloksetina (15 i 25 mg/kg/dan tokom 28 dana) kod ženki pacova su dovele do statistički značajnog povećanja nivoa superoksid anjon radikala (svi *post-hoc* $P \leq 0,02$; **Slika 4.20**), dok je manja testirana doza duloksetina značajno povećala nivo PAB (*post-hoc* $P = 0,04$ i *post-hoc* $P = 0,19$ za doze 15 i 25 mg/kg/dan, redom; **Slika 4.20**).

Manja doza duloksetina je povećala nivo AOPP kod ženki pacova, ali ovo nije dostiglo statističku značajnost (*post-hoc* $P = 0,06$ i $P = 0,26$ za doze 15 i 25 mg/kg/day, redom; **Slika 4.20**), dok nivoi TOS i MDA nisu bili značajno povećani pod uticajem duloksetina kod ženki pacova (svi *post-hoc* $P \geq 0,17$; **Slika 4.20**).

Kod mužjaka pacova, ponavljana primena duloksetina (15 i 25 mg/kg/dan tokom 28 dana) nije imala statistički značajan uticaj na parametre oksidativnog stresa u srčanom mišiću (svi *post-hoc* $P \geq 0,17$; **Slika 4.20**).

Oba primenjena tretmana nisu imala statistički značajan uticaj na aktivnost SOD, kao i nivo SH grupa kod mužjaka i ženki pacova (svi *post-hoc* $P \geq 0,28$ za mužjake pacova i svi *post-hoc* $P \geq 0,28$ za ženke pacova; nije prikazano).



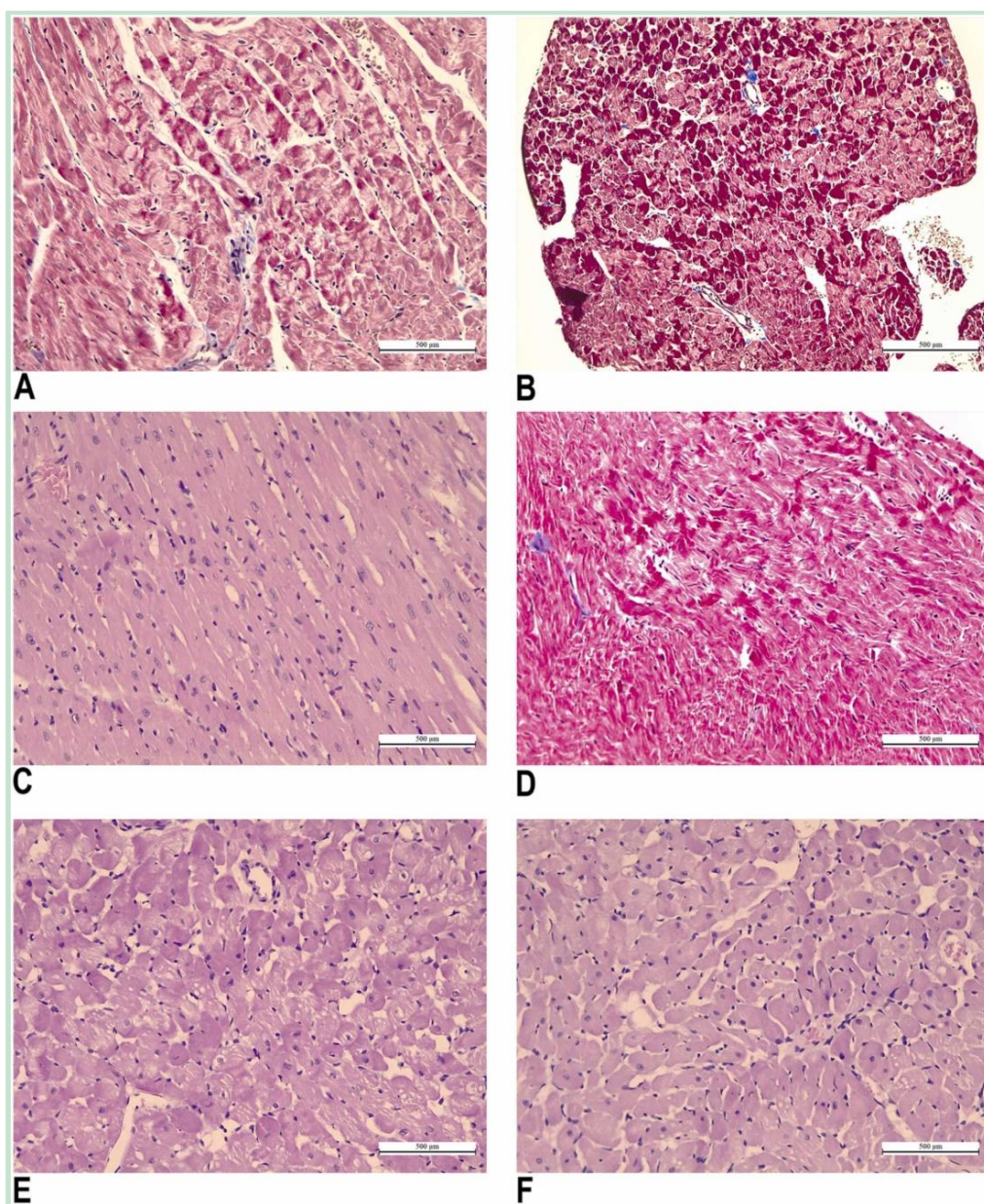
Slika 4.20. Uticaj vortiooksetina (VOR) i duloksetina (DLK) na parametre oksidativnog stresa u srčanom mišiću mužjaka (A) i ženki (B) pacova sa osteoartritisom izazvanim monojodoacetatom. Srce je izolovano 28. dana nakon injekcije monojodoacetata/fiziološkog rastvora i nivoi totalnog oksidantnog statusa (TOS), superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$), prookisativnog-antioksidativnog balansa (PAB), proteinskih produkata uznapredovale oksidacije (AOPP) i malondialdehida (MDA) su određeni. VOR/DLK su primenjivani svakodnevno tokom 28 dana. Statistička značajnost je određena između bolesne kontrole i tretmana (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$), korišćenjem jednofaktorske ANOVA praćene *Tukey post-hoc* testom.

4.5.2. Uticaj vortioksetina na histološke promene kardiomiocita životinja sa osteoartritisom

Indukcija osteoartritisa kod pacova oba pola nije dovela do značajnih histoloških promena u srčanom mišiću. U obe kontrolne grupe (zdrava i bolesna kontrola), kardiomiociti su imali pravilnu morfologiju (bez očigledne hipertrofije ili atrofije), pravilan raspored miofibrila i imali su jedno ili dva centralno locirana ovalna euhromatska jedra. Dodatno, nisu primećene ni promene u intersticijalnom tkivu, kao ni intersticijalnim krvnim sudovima (**Slika 4.21**).

Ponavljana primena vortioksetina (2 i 10 mg/kg/dan tokom 28 dana) nije dovela do značajnih promena u morfologiji kardiomiocita, intersticijalnog tkiva, kao ni intersticijalnih krvnih sudova kod životinja oba pola sa osteoartritisom izazvanim monojodoacetatom (nije prikazano).

S druge strane, kod mužjaka i ženki pacova tretiranih duloksetinom (15 i 25 mg/kg/dan tokom 28 dana) uočene su određene promene u morfologiji kardiomiocita. Najznačajnije promene su bile vakuolizacija kardiomiocita, intracelularni edem, hiperkontrakcija sarkomera i izvestan stepen kondenzacije citoplazme, fenomen *contraction band necrosis*, i u nekim uzorcima edem intersticijalnog tkiva i perivaskularni edem. Ove promene su bile izraženije u srčanom mišiću kod ženki tretiranih većom dozom duloksetina (25 mg/kg/dan) (**Slika 4.21**).



Slika 4.21. Histologija srčanog mišića pacova sa osteoartritisom tretiranih duloksetinom (DLK). (A) Mužjaci pacova tretirani duloksetinom (15 mg/kg) (Mason trihrom tehnika bojenja, uvećanje 200x). Kardiomiociti sa intracelularnim edemom i hiperkontrakcijom sarkomera. (B) Ženke pacova tretirane DLK (25 mg/kg) (Mason trihrom tehnika bojenja, uvećanje 100x). Subendokardijalni kardiomiociti sa intracelularnim edemom i hiperkontrakcijom sarkomera. (C) Ženke pacova tretirane DLK (25 mg/kg) (hematoksilin eozin tehnika bojenja, uvećanje 200x). Kardiomiociti sa izvesnom kondenzacijom eozinofilne citoplazme i fenomenom *contraction band necrosis*. (D) Ženke pacova tretirane DLK 25 mg/kg (hematoksilin eozin tehnika bojenja, uvećanje 100x). Subepikardni kardiomiociti sa oslabljenim, talasastim izgledom i hiperkontrakcijom sarkomera. (E i F) Ženke pacova tretirane DLK (25 mg/kg) (hematoksilin eozin tehnika bojenja, uvećanje 200x (E) ili 100x (F)). Ekstenzivna vakuolizacija kardiomiocita, intracelularni edem, hiperkontrakcija sarkomera, intersticijalni edem, kondenzacija citoplazme i fenomen *contraction band necrosis*.

5. Diskusija

5.1. Antinociceptivni efekti vortioksetina u akutnim modelima inflamatornog bola i mehanizam dejstva vortioksetina u animalnom modelu trigeminalnog bola

Vortioksetin je ostvario značajan i dozno-zavisan antinociceptivni efekat u akutnim modelima inflamatornog trigeminalnog, visceralnog i somatskog bola. Primena vortioksetina nije imala značajan uticaj na motorne performanse životinja u *rotarod* testu, ukazujući da antinociceptivni efekat vortioksetina u ovim modelima nije posledica motornog oštećenja ili sedacije eksperimentalnih životinja.

Efekti vortioksetina su bili prisustni u drugoj, ali ne i u prvoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Prva faza formalinskog testa je posledica direktne aktivacije nociceptora, dok je druga inflamatorna faza testa posledica oslobađanja inflamatornih medijatora i centralne senzitivizacije (Sawynok 2003). Luccarini i sar. (2004) su pokazali antinociceptivni efekat amitriptilina u orofacijalnom formalinskom testu; zanimljivo amitriptilin je pokazao efikasnost i u prvoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Ovo se može pripisati i metodološkim razlikama, ali moguće i drugačijem mehanizmu dejstva amitriptilina u poređenju sa vortioksetinom. Vortioksetin je pokazao povoljne efekte i kod pacijenata sa sindromom žarećih usta (Adamo i sar., 2020) što možda ukazuje da ovaj lek može biti koristan kod bolnih stanja u orofacijalnoj regiji.

Test grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom je model akutnog visceralnog bola i u eksperimentalnim uslovima se najčešće koristi kao skrining test za procenu analgetičke efikasnosti. U našem istraživanju, vortioksetin je smanjio broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživačkih grupa koji su pokazali da antidepresivi iz grupe *SSRI* (fluoksetin, fluvoxamin) i *SNRI* (milnacipran) pokazuju antinociceptivne efekte u testu grčeva (Aoki i sar., 2006; Singh i sar., 2001).

Karageninom izazvana inflamacija šape je široko korišćen akutni model inflamatornog bola, koji prate kardinalni znaci inflamacije, otok, crvenilo i bol. Injekcija karagenina dovodi do oslobađanja proinflamatornih medijatora, uključujući prostaglandine, supstancu P, bradikinin, proinflamatorne citokine i dr. (Morris 2003). Često se koristi kao skrining test za ispitivanje antiinflamatornih efekata različitih supstanci. Interesantno, Jones i sar. (2006) su pokazali da antidepresivi iz grupe *SNRI* (duloksetin i venlafaksin) smanjuju termičku i mehaničku preosetljivost u modelu karageninske inflamacije šape kod pacova, ali ne i antidepresivi iz grupe *SSRI* (paroksetin, sertralin, fluoksetin). Međutim, ova istraživačka grupa je pokazala da fluoksetin potencira antinociceptivni efekat tiazoksetina (inhibira preuzimanje noradrenalina), što ukazuje da verovatno dualni efekat, potenciranje noradrenergičke i serotonergičke neurotransmisije može biti od značaja za ublažavanje karageninom izazvane bolne preosetljivosti. Vortioksetin pokazuje multimodalnost u mehanizmu dejstva, što podrazumeva inhibiciju preuzimanja serotonina, ali i direktan uticaj na odgovarajuće serotonergičke receptore (Bang-Andersen i sar., 2011; Sanchez i sar., 2015). Pored toga, pokazano je da vortioksetin može povećati nivo noradrenalina čime se može objasniti efekat leka u ovom modelu (Micov i sar., 2020).

Inflamacija tkiva i povreda izazvane primenom formalina, sirćetne kiseline ili karagenina su povezani sa oslobađanjem proinflamatornih supstanci što dovodi do aktivacije i senzitivizacije nociceptora; hiperaktivnost i senzitivizacija nociceptora dovodi do senzitivizacije centralnih nociceptivnih puteva. Rezultati ovih eksperimenata ukazuju da bi vortioksetin mogao biti značajan u ublažavanju inflamatornih bolnih stanja.

5.1.1. Mehanizam dejstva vortiooksetina u modelu trigeminalnog bola

5.1.1.1. Učešće serotonergičkih 5-HT_{1B/1D} receptora u antinociceptivnom dejstvu vortiooksetina

Primena selektivnog antagoniste serotonergičkih 5-HT_{1B/1D} receptora (GR 127935) je značajno i dozno-zavisno umanjila antinociceptivni efekat vortiooksetina u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa, što ukazuje na značaj aktivacije 5-HT_{1B/1D} receptora u antinociceptivnom efektu ovog antidepresiva. Turan Yücel i sar. (2021) su pokazali učešće serotonergičkih 5-HT_{1A} receptora u antinociceptivnom dejstvu vortiooksetina.

Učešće serotonergičkih 5-HT_{1B/1D} receptora u antinociceptivnom efektu vortiooksetina je od posebnog značaja jer predstavlja ciljno mesto dejstva lekova iz grupe triptana, jednih od najznačajnijih lekova za ublažavanje bola u trigeminalnoj regiji (Zobdeh i sar., 2018). Sumatriptan, agonist 5-HT_{1B/1D} receptora, pokazao je dozno-zavisno antinociceptivni efekat u orofacijalnom formalinskom testu (Tomić i sar., 2015). Pokazano je da stimulacija 5-HT_{1B/1D} receptora inhibira transmisiju u trigeminalnom nucleusu, čime se blokira transmisija ka sekundarnom neuronu bolnog puta, a u periakveduktalnoj sivoj masi dolazi do aktivacije centralnih nishodnih puteva koji inhibiraju ekscitatorni put bola (Bartsch i sar., 2004; Levy i sar., 2004).

Interakcija vortiooksetina sa serotonergičnim 5-HT_{1B/1D} receptorima može se smatrati direktnom zbog sposobnosti vortiooksetina da se vezuje za te receptore, ali može biti i indirektna, posredstvom povećanja endogenog serotonina putem inhibicije SERT-a (Stahl 2015d). Vortiooksetin se vezuje za 5-HT_{1B/1D} receptore i ispoljava parcijalni agonizam na nivou 5-HT_{1B} i antagonizam na nivou 5-HT_{1D} receptora, pa je analgetski efekat kroz direktan uticaj na te receptore samo delimičan (Sanchez i sar., 2015). Međutim, gustina 5-HT_{1B} receptora je značajno veća od gustine 5-HT_{1D} receptora u centralnom nervnom sistemu (Barnes i Sharp 2019). Osim toga, vortiooksetin ima sposobnost da potencira oslobađanje serotonina (putem inhibicije SERT-a), što bi moglo omogućiti stimulaciju 5-HT_{1B/1D} receptora na indirektan način.

Dakle, čini se da direktna i indirektna interakcija vortiooksetina sa 5-HT_{1B/1D} receptorima na centralnim mestima transmisije/modulacije bola može doprineti njegovom analgetskom efektu.

5.1.1.2. Učešće adrenergičkih α_2 i β_1 receptora u antinociceptivnom dejstvu vortiooksetina

Rezultati naših eksperimenata su pokazali da je sistemska primena johimbina (selektivni antagonist α_2 adrenergičkih receptora) i metoprolola (selektivni antagonist β_1 adrenergičkih receptora) dozno-zavisno inhibirala antinociceptivni efekat vortiooksetina u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. S druge strane, kod primene prazosina (selektivni α_1 adrenergički antagonist) je izostao efekat inhibicije. Ovi rezultati ukazuju da antinociceptivnom efektu vortiooksetina u modelu trigeminalnog bola barem delom doprinosi i aktivacija adrenergičkih α_2 i β_1 receptora, ali ne i α_1 receptora. Ovo je u saglasnosti sa nalazom Turan Yücel i sar. (2023) koji su pokazali učešće adrenergičkih α_2 receptora u antinociceptivnom dejstvu vortiooksetina.

Vortiooksetin ne pokazuje afinitet za α adrenergičke receptore, pa je mehanizam aktivacije α_2 adrenergičkih receptora indirektan, povećanjem noradrenergičke neurotransmisije (Bang-Andersen i sar., 2011; Sanchez i sar., 2015). Pored toga, eksperimentalni podaci pokazuju da vortiooksetin može povećati nivo noradrenalina u različitim regijama centralnog nervnog sistema koje su značajne za modulaciju bola. Imajući u vidu da vortiooksetin ne inhibira značajno preuzimanje noradrenalina (Bang-Andersen i sar., 2011; Sanchez i sar., 2015), povećanje noradrenergičke neurotransmisije je verovatno posledica direktne modulacije serotonergičkih receptora. Smatra se da blokada serotonergičkih 5-HT₃ i aktivacija 5-HT_{1A} receptora dovodi do povećanja noradrenergičke neurotransmisije na nivou medijalnog prefrontalnog korteksa i ventralnog hipokampusa (Sanchez i sar., 2015). Pored toga, pokazano je da primena vortiooksetina povećava nivo noradrenalina u moždanom stablu miševa sa oksaliplatinom izazvanim neuropatskim bolom (Micov i sar., 2020). Stoga, pretpostavljamo da povećan nivo noradrenalina pod uticajem vortiooksetina aktivira α_2 i β_1 adrenergičke receptore.

Najveći broj studija o antinociceptivnim efektima noradrenalina je fokusirano na spinalnu modulaciju nociceptivne senzacije aktivacijom α_2 adrenergičkih receptora na nivou zadnjih rogova kičmene moždine; spinalna primena agonista α_2 adrenergičkih receptora dovodi do ublažavanja bolne senzacije kod eksperimentalnih životinja, ali i kod ljudi (Bahari i Meftahi 2019). Ipak, noradrenalin ima značajnu ulogu i u trigeminalnoj nocicepciji (Donertas-Ayaz i Caudle 2023). Elektrofiziološke studije su pokazale da različiti mehanizmi doprinose inhibitornom efektu noradrenalina na nivou trigeminalne regije. Noradrenalin dovodi do hiperpolarizacije neurona u trigeminalnom *subnucleus caudalis*-u aktivacijom α_2 i β adrenergičkih receptora, kao i aktivacijom α_2 adrenergičkih receptora u trigeminalnim ganglijama. Suprotno, aktivacija α_1 adrenergičkih receptora dovodi do depolarizacije neurona u trigeminalnom *subnucleus caudalis*-u (Donertas-Ayaz i Caudle 2023). Ovo ukazuje da α_2 i β adrenergički receptori posreduju u inhibiciji nociceptivne transmisije, dok α_1 receptori olakšavaju nociceptivnu transmisiju depolarizacijom neurona u trigeminalnom *subnucleus caudalis*-u (Donertas-Ayaz i Caudle 2023; Han i sar., 2007).

Pored toga, pokazano je da sistemska i intracisterna primena klonidina (selektivnog agoniste α_2 receptora) smanjuje bolno ponašanje u orofacijalnom formalinskom testu i karageninom indukovanim orofacijalnim bolom (Nag i Mokha 2016; Yoon i sar., 2015). S druge strane, adrenergički α_1 receptori izgleda imaju pronociceptivnu ulogu u trigeminalnoj regiji, što objašnjava izostanak inhibitornog uticaja prazosina u našem eksperimentu (Han i sar., 2007; Wang i sar., 2013).

5.1.1.3. Uloga holinergičkih receptora u antinociceptivnom dejstvu vortioksetina

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da antinociceptivnom dejstvu vortioksetina u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa doprinose i muskarinski i α_7 nikotinski holinergički receptori. Vortioksetin ima nizak afinitet za holinergičke receptore, pa je aktivacija holinergičkih receptora verovatno posledica povećanja nivoa acetilholina. Različiti serotonergički receptori koji su ciljno mesto dejstva vortioksetina, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, i 5-HT₃, uključeni su u oslobađanje acetilholina, direktnim uticajem na holinergičke neurone ili preko GABA-ergičkih interneurona, u zavisnosti od regije mozga (Fink i Gothert, 2007). Stimulacijom serotonergičkih 5-HT_{1A} receptora, povećava se oslobađanje acetilholina u korteksu i hipokampusu. Suprotno, aktivacija 5-HT_{1B} receptora ima inhibitorni uticaj na holinergičke neurone (Stahl 2015a, 2015b). Vortioksetin je parcijalni agonist 5-HT_{1B} receptora i moguće funkcionalni antagonist, pa uticajem na heteroreceptore lokalizovane na holinergičkim neuronima, vortioksetin verovatno dezinhibira ove neurone i povećava oslobađanje acetilholina (Stahl 2015a, 2015b). Aktivacija serotonergičkih 5-HT₃ receptora takođe ima inhibitorni uticaj na oslobađanje acetilholina. Preciznije, stimulacija 5-HT₃ receptora stimuliše inhibitorne GABA-ergičke interneurone čime se posledično inhibira oslobađanje acetilholina iz presinaptičkog nervnog završetka (Stahl 2015a, 2015b). Nasuprot tome, vortioksetin blokira 5-HT₃ receptore, inhibiraju se GABA-ergički interneuroni i posledično se dezinhibira oslobađanje acetilholina tj. povećava se njegov nivo (Bang-Andersen i sar., 2011; Mørk i sar., 2013; Pehrson i sar., 2013).

Od muskarinskih receptora, najveći značaj u inhibiciji nociceptivnih informacija u trigeminalnoj regiji imaju M₂ receptori. Pretkliničke studije su pokazale da peroralna primena agonista M₂ receptora ublažava bolno ponašanje u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa, dok su *in vitro* eksperimenti pokazali da acetilholin aktivacijom muskarinskih M₂ receptora inhibira kapsaicinom-indukovano oslobađanje CGRP (Dussor i sar., 2004). Dodatno, Jeong i sar. (2013) su pokazali da aktivacija presinaptičkih M₂ receptora inhibira oslobađanje glutamata u medularnom dorzalnom rogu (kao posledica blokade voltažno-zavisnih Ca²⁺ kanala), kao i da inhibitori acetilholin-esteraze potenciraju ove efekte.

Rezultati naše studije su ukazali i na značaj nikotinskih α_7 holinergičkih receptora u ostvarivanju antinociceptivnih efekata vortioksetina u orofacijalnom formalinskom testu. Yousofizadeh i sar. (2015) su pokazali da mikroinjekcija mekamilamina (antagonist nikotinskih receptora) u ventralni orbitalni korteks inhibira antinociceptivni efekat epibatidina (agonista nikotinskih holinergičkih receptora) u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa. Ventralni orbitalni korteks daje projekcije koje inervišu strukture moždanog stabla kao što je PAG, koja ima važnu ulogu u nishodnoj modulaciji bola (Hoover i Vertes 2011). Novija

istraživanja ukazuju da je upravo α_7 podtip nikotinskih receptora značajan u aktivaciji nishodnih modulatornih puteva poreklom iz PAG (Sullere i sar., 2023; Umana i sar., 2017). Dodatno, sistemska, kao i primena u ventralnu PAG selektivnog agoniste α_7 nikotinskih receptora proizvodi antinociceptivni efekat u klasičnom formalinskom testu (Umana i sar., 2017).

O značaju holinergičke neurotransmisije u modulaciji trigeminalne nocicepcije, govori i podatak da je donepezil (inhibitor acetilholin-esteraze) tokom profilaktičke primene ublažio napade migrene kod pacijenata sa migrenoznom glavoboljom; efekat je bio uporediv sa propranololom (Nicolodi i sar., 2002).

5.1.1.4. Uloga kanabinoidnih receptora u antinociceptivnom dejstvu vortiooksetina

Sistemska primena selektivnih antagonista kanabinoidnih CB₁ i CB₂ receptora je dozno-zavisno umanjila antinociceptivni efekat vortiooksetina u drugoj fazi orofacijalnog formalinskog testa, što ukazuje na značaj aktivacije ovih receptora u antinociceptivnom dejstvu vortiooksetina. Prema dostupnim literaturnim podacima, vortiooksetin ne pokazuje afinitet za CB₁ receptore, dok podaci za CB₂ receptore ne postoje (Bang-Andersen i sar., 2011). Pokazano je da serotonin može povećati nivo endokanabinoida u centralnom nervnom sistemu, pa pretpostavljamo da i vortiooksetin povećanjem serotonergičke neurotransmisije utiče na nivo endokanabinoida (Best i sar., 2008).

Eksperimentalni podaci ukazuju da deficijencija na nivou endokanabinoidnog sistema ima ulogu u patofiziologiji bolova koji potiču iz trigeminalne regije, uključujući i migrenoznu glavobolju (Greco i sar., 2010, 2014, 2018). Kanabinoidni CB₁ receptori su široko distribuirani u regijama nervnog sistema, uključujući i sistem za nishodnu modulaciju bola (PAG, RVM). Endokanabinoidi aktivacijom CB₁ receptora na nivou PAG inhibiraju transmisiju nociceptivnih signala na spinalnom nivou. Slično utiču na spinalnom nivou, endokanabinoidi aktivacijom CB₁ receptora inhibiraju nocicepciju na nivou trigeminovaskularnog sistema (Akerman i sar., 2013). Ovo je posledica inhibicije oslobađanja neurotransmitera poput glutamata i GABA-e (Akerman i sar., 2013).

5.1.1.5. Uloga adenozijskih A₁ receptora u antinociceptivnom dejstvu vortiooksetina

Naše istraživanje je pokazalo uključenost adenozijskih A₁ receptora u antinociceptivnom dejstvu vortiooksetina u modelu trigeminalnog bola. Vortiooksetin ne pokazuje afinitet za adenozijske A₁ receptore (Bang-Andersen i sar., 2011), pa je ovaj efekat verovatno posredovan povećanjem nivoa endogenog adenozina. Eksperimentalne studije ukazuju da serotonin i noradrenalin mogu povećati nivo adenozina na nivou zadnjih rogova kičmene moždine (Sawynok i Liu 2003a), pa uzimajući u obzir uključenost serotonergičke i noradrenergičke neurotransmisije u mehanizmu dejstva vortiooksetina (Sanchez i sar., 2015), možemo zaključiti da vortiooksetin na ovaj način povećava nivo adenozina.

Adenozijski A₁ receptori su eksprimirani u trigeminovaskularnom sistemu gde modulišu nociceptivnu transmisiju i regulišu oslobađanje vazoaktivnih neuropeptida (Goadsby i sar., 2002; Lu i sar., 2016). Goadsby i sar. (2002) su pokazali da aktivacija adenozijskih A₁ receptora inhibira trigeminovaskularnu aktivaciju uticajem na trigeminalni nukleus, kao i inhibicijom oslobađanja CGRP. Pored toga, Choi i sar. (2011) su pokazali da aktivacija presinaptičkih A₁ receptora smanjuje oslobađanje glutamata iz primarnih trigeminalnih aferentnih neurona. Prema tome, možemo pretpostaviti da vortiooksetin ispoljava analgetski efekat u orofacijalnom formalinskom testu, barem delimično tako što povećava nivo endogenog adenozina, koji putem presinaptičkih A₁ receptora inhibira oslobađanje glutamata na primarnoj sinapsi u meduli.

5.2. Efekti vortiooksetina u modelu osteoartritisa

5.2.1. Antinociceptivni efekti vortiooksetina u modelu osteoartritisa

Model osteoartritisa indukovan monojodoacetatom je dobro okarakterisan hemijski indukovan model; injekcija monojodoacetata dovodi do progresivne destrukcije hrskavice i subhondralne kosti u kolenu. Dodatno, ovaj model u više aspekata oponaša osteoarthritis u humanoj populaciji, dok klinički relevantni analgetici pokazuju efikasnost čime se povećava prediktivna vrednost modela (de Sousa Valente 2019). Rezultati ove doktorske disertacije su potvrdili da u ovom modelu dolazi do razvoja bolne preosetljivosti i dodatno poboljšali bihevioralnu karakterizaciju modela uključivanjem životinja oba pola. Iako se osteoarthritis češće javlja kod osoba ženskog pola, pretkliničke studije nedovoljno koriste ženke glodara u istraživanjima, tako da direktno poređenje između polova uglavnom nedostaje (Malfait i Miller 2020). Naše istraživanje nije pokazalo značajnije razlike između polova u razvoju bolne preosetljivosti; jedino su u von Frey testu uočene diskretne razlike koje se mogu pripisati razlikama u telesnoj masi između mužjaka i ženki pacova.

Produžena 4-nedeljna primena vortiooksetina je značajno poboljšala deficit u težini oslanjanja na povređeni ekstremitet, kao i mehaničku i hladnu preosetljivost kod životinja oba pola. Ovi efekti su bili uporedivi sa efektima duloksetina, leka koji je zvanično odobren za ublažavanje bola kod osteoartritisa od strane regulatornih tela (Kolasinski i sar., 2019). Značajno je naglasiti da 28-dnevni tretman kod pacova koreliše sa periodom oko dve godine kod ljudi (Sengupta 2013). Iako je teško praviti ekstrapolacije podataka sa životinja na humanu populaciju, ovakav dizajn studije povećava prediktivnu vrednost dobijenih rezultata. Dodatno, korišćeni bihevioralni testovi ilustruju različite aspekte bola kod osteoartritisa. Test procene raspoređivanja težine oslanjanja između zdravog i bolesnog ekstremiteta ukazuje na funkcionalnu onesposobljenost zahvaćenog zgloba, dok je mehanička preosetljivost šape u von Frey testu indikativna razvoju bola van povređene regije (posledica centralnih nociplastičnih promena). Pacijenti sa osteoartritisom kolena često osećaju bol prilikom pokreta zglobova, ali određena grupa pacijenata takođe razvije i bol distalno od inicijalnog oštećenja zgloba (Arendt-Nielsen i sar., 2010).

Produžena primena vortiooksetina i duloksetina nije imala značajan uticaj na motorne performanse životinja oba pola sa osteoartritisom u *rotarod* testu, ukazujući da antinociceptivni efekat vortiooksetina/duloksetina u ovom modelu nije posledica motornog oštećenja ili sedacije eksperimentalnih životinja.

Prethodne studije su pokazale antinociceptivnu efikasnost vortiooksetina u različitim animalnim modelima neuropatskog bola, što je delom očekivano imajući u vidu značaj antidepresiva u lečenju neuropatskih bolnih stanja (Micov i sar., 2020; Zuena i sar., 2018). S druge strane, rezultati ove doktorske disertacije su po prvi put pokazali efekte vortiooksetina u modelu osteoartritisa kod mužjaka i ženki pacova.

Smatra se da disregulacija na nivou sistema nishodne modulacije bola, disbalans između nishodnih inhibitornih, koji su dominantni i nishodnih facilitatornih puteva, doprinosi tzv. fenomenu hronifikacije bola (engl. *pain chronification*) kod različitih bolnih stanja uključujući i osteoarthritis (Ossipov i sar., 2014). Pored toga, promene na nivou nishodnih puteva kontrole bola su uočene i u modelu osteoartritisa izazvanim monojodoacetatom (Lockwood i sar., 2019; Yoneda i sar., 2020). Pokazano je da smanjenje descendente noradrenergičke modulacije doprinosi razvoju bolne preosetljivosti kod životinja sa osteoartritisom izazvanim monojodoacetatom (Lockwood i sar., 2019). U prilog tome govore podaci da primena lekova koji inhibiraju preuzimanje noradrenalina i potenciraju noradrenergičku neurotransmisiju poput milnaciprana, antidepresiva iz grupe *SNRI*, smanjuju bolnu preosetljivost u istom modelu aktivirajući α_2 adrenergičke receptore (Burnham i Dickenson 2013). Efekat vortiooksetina u našem istraživanju se može objasniti na ovaj način, imajući u vidu da je pokazano da lek može povećati nivo noradrenalina u moždanom stablu miševa sa oksaliplatinom izazvanom

neuropatijom (Micov i sar., 2020), dok su rezultati ove disertacije pokazali uključenost α_2 adrenergičkih receptora u antinociceptivnom efektu vortiooksetina u modelu inflamatornog trigeminalnog bola.

S druge strane, disregulacija nishodne serotonergičke modulacije takođe doprinosi razvoju hroničnog bola u modelu osteoartritisa (Lockwood i sar., 2019; Rahman i sar., 2009). Smatra se da aktivacija ekscitatornih spinalnih 5-HT₃ receptora doprinosi facilitaciji bola, spinalnoj hiperekscitabilnosti i bihevioralnoj preosetljivosti u modelu osteoartritisa izazvanog monojodoacetatom. S druge strane, 5-HT₇ receptori imaju inhibični efekat na bolno ponašanje (Lockwood i sar., 2019; Rahman i sar., 2009). Vortiooksetin se ponaša kao potentni antagonist 5-HT₃ receptora čime se barem delom može objasniti efekat u ovom modelu. S druge strane, lek poseduje antagonističku aktivnost na nivou 5-HT₇ receptora čime bi se potencijalno umanjilo antinociceptivno dejstvo leka. Međutim, afinitet leka za 5-HT₇ receptore je značajno manji i verovatno ne dolazi do izražaja u rasponu doza (2-10 mg/kg pacova) korišćenim u ovoj studiji (De Diego-Adeliño i sar., 2022; Sanchez i sar., 2015).

5.2.2. Uticaj vortiooksetina na opštu dobrobit životinja u testu kopanja

Kopanje je urođeno, spontano i samonagrađujuće ponašanje glodara (Deacon, 2006, 2009). Imajući u vidu da kopanje oslikava opštu dobrobit životinja (engl. *general well-being*), u eksperimentalnim uslovima se nekada koristi i kao mera spontanog bolnog ponašanja (Andrews i sar., 2012; Wodarski i sar., 2016). Međutim, u našim eksperimentalnim uslovima nije uočeno smanjenje aktivnosti kopanja nakon injekcije monojodoacetata, što je u suprotnosti sa drugim studijama koje su koristile modele inflamiranog zgloba kolena (Djuretić i sar., 2021; Rutten i sar., 2014). U saglasnosti sa našim nalazom je rezultat koji su dobili Bryden i sar. (2015), koji su koristili isti model osteoartritisa; u unilateralnom modelu osteoartritisa izazvanim monojodoacetatom nisu uočene promene u aktivnosti kopanja kod pacova, dok je nakon bilateralne indukcije osteoartritisa ova inherentna aktivnost glodara bila smanjena (verovatno zbog fizički značajne onesposobljenosti). Stoga, kako je u osnovi kopanje jedna samonagrađujuća aktivnost glodara, ona ne mora nužno biti narušena kod životinja koje osećaju bol, što imamo u konkretnom slučaju. Možemo pretpostaviti da u našim eksperimentalnim uslovima kopanje oslikava prirodnu motivaciju životinja i poredi se sa aktivnostima svakodnevnog života u humanoј populaciji (Deacon, 2006, 2009).

S druge strane, interesantno, ponavljana primena duloksetina je značajno i dozno-zavisno smanjila aktivnost kopanja kod životinja oba pola, dok vortiooksetin nije uticao na aktivnost kopanja. Pad u količini iskopanog materijala pod uticajem duloksetina je bio izraženiji kod ženki pacova, što ukazuje da su životinje ženskog pola osetljivije na ovaj efekat antidepresiva.

Antidepresivi iz grupe SSRI i reboksetin (antidepresiv koji inhibira preuzimanje noradrenalina) su smanjili još jedan pozitivno motivisan oblik ponašanja, trčanje miševa na pokretnom točku (Weber i sar., 2009). Ovo se delom može pripisati uticaju lekova na dopaminergički mezolimbčki sistem, poznat kao i put nagrade. Ovaj put čine projekcije iz regije ventralnog tegmentuma srednjeg mozga do strijatuma (projekcije ka *nucleus accumbens*-u u ventralnom strijatumu su najznačajniji anatomske supstrat uključen u put nagrade), prefrontalnog korteksa, amigdale, hipokampusu i mnogih drugih struktura limbickog sistema (Lewis i sar., 2022). McCabe i sar. (2009) su pokazali da antidepresivi iz grupe SSRI mogu umanjiti neuralnu aktivnost koju aktivira nagrada, ali i averzivni stimuli. Dodatno, ponavljana primena antidepresiva iz grupe SSRI (citalopram i escitalopram) je smanjila aktivnost dopaminergičkih neurona u regiji ventralnog tegmentuma (Dremencov i sar., 2009). Pored toga, pokazano je da serotonergičke i noradrenergičke projekcije iz moždanog stabla mogu smanjiti aktivnost neurona iz regije ventralnog tegmentuma srednjeg mozga (Guiard i sar., 2008). Ovim se delom objašnjava izostanak efekata antidepresiva kod pacijenata kod kojih je prisutna smanjena motivacija i anhedonija, a kao

jedan od neželjenih efekata antidepresiva opisuje se i emocionalna zaravljenost, koju karakteriše ograničenje emocija, emocionalna ravnodušnost, smanjena motivacija i apatija (Ma i sar., 2021; Price i sar., 2009).

Stoga, pretpostavljamo da je duloksetin u našem eksperimentu uticajem na serotonergičku i noradrenergičku neurotransmisiju smanjio aktivnost dopaminergičkih neurona u regiji ventralnog tegmentuma srednjeg mozga. Posledično, došlo je do smanjenja aktivnosti koje aktivira put nagrade. S druge strane, u poređenju sa drugim antidepresivima koji inhibiraju preuzimanje serotonina, vortiooksetin značajno manje inhibira aktivnost neurona ventralnog tegmentuma što može objasniti i naš eksperimentalni nalaz (Ebrahimzadeh i sar., 2018; Pehrson i sar., 2013). Ovo se barem delom može pripisati direktnom uticaju leka na serotonergičke 5-HT_{1A} receptore koji direktno stimulišu dopaminergičke neurone u regiji ventralnog tegmentuma (Ebrahimzadeh i sar., 2018). Pored toga, u kliničkim uslovima je pokazano da vortiooksetin poboljšava emocionalnu zaravljenost kod pacijenata sa velikim depresivnim poremećajem kod kojih je bio neadekvatan odgovor na terapiju antidepresivima iz grupe SSRI/SNRI (Fagiolini i sar., 2021).

5.3. Uticaj vortiooksetina na kognitivne performanse životinja sa osteoartritisom

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da kod životinja sa osteoartritisom dolazi do smanjenja kognitivnih performansi u testu prepoznavanja novog objekta. Ovo je u saglasnosti sa nalazima drugih istraživačkih grupa koji su pokazali oštećenje u različitim kognitivnim domenima kod životinja sa monojodoacetatom indukovanim osteoartritisom (Carcolé i sar., 2019; Negrete i sar., 2017; La Porta i sar., 2015). Iako sve više studija, kliničkih i pretkliničkih, ukazuje da hronični bol može dovesti od oštećenja memorije, mehanizmi koji leže u osnovi kognitivne disfunkcije ostaju i dalje nerazjašnjeni (Cowen i sar., 2018; Han i sar., 2024). Jedan od potencijalnih mehanizama uključuju i strukturne promene na nivou hipokampusa i prefrontalnog korteksa (Han i sar., 2024; Phelps i sar., 2021).

Vortiooksetin je poboljšao kognitivne performanse kod životinja oba pola sa osteoartritisom, efekat je bio dozno-zavisan. Veliki broj podataka iz pretkliničkih i kliničkih studija govori o prokognitivnim svojstvima vortiooksetina. Ranije studije su pokazale da vortiooksetin može poboljšati performanse u testu prepoznavanja novog objekta, kako kod zdravih životinja, tako i u različitim animalnim modelima koji su povezani sa kognitivnom disfunkcijom (Bennabi i sar., 2019; du Jardin i sar., 2014; Jiang i sar., 2020). Naše istraživanje je po prvi put pokazalo povoljan efekat vortiooksetina na kognitivne performanse životinja u modelu hroničnog bola. Prokognitivna svojstva vortiooksetina se pripisuju modulaciji različitih neurotransmiterskih sistema važnih u kontroli kognitivnih funkcija, sa posebnim fokusom na povećanje glutamatergičke neurotransmisije u medijalnom prefrontalnom korteksu i hipokampusu, regijama mozga koje imaju važnu ulogu u kognitivnim procesima, uključujući i prepoznavanje novog objekta (Chao i sar., 2020; Dale i sar., 2018). S druge strane, strukturne ili funkcionalne promene na nivou prefrontalnog korteksa i hipokampusa (Han i sar., 2024; Mutso i sar., 2012) su uočene i u modelima hroničnog bola.

Smatra se da je prokognitivni efekat vortiooksetina posledica blokade prevashodno 5-HT₃ receptora na nivou GABA-ergičkih interneurona, čime se dezinhbibira aktivnost glutamatergičkih piramidalnih neurona u hipokampusu i prefrontalnom korteksu, kao posledica smanjenja GABA-ergičke inhibicije (Pehrson i Sanchez 2014; Riga i sar., 2016). Povećanju glutamatergičke neurotransmisije pored blokade 5-HT₃ receptora, verovatno doprinosi i agonizam na nivou 5-HT_{1A} receptora čime se takođe inhibiraju GABA-ergički interneuroni (Stahl 2015c). Ova multimodalnost u mehanizmu dejstva vortiooksetina može objasniti razlike u odnosu na antidepresive iz grupe SSRI u uticaju na funkciju hipokampusa i prefrontalnog korteksa. Antidepresivi iz grupe SSRI povećavaju nivo serotonina svuda gde postoje serotonergički nervni završeci i neto efekat na oslobađanje glutamata je kompleksan, sa mogućim i ekscitatornim i inhibitornim efektima. Ipak, studije sa dugotrajnom

primenom *SSRI* kod životinja ukazuju na smanjenje aktivnosti piramidalnih neurona i posledično smanjeno oslobađanje glutamata (Stahl 2015c). Interesantno, sub-hronična primena vortioksetina, ali ne i escitaloprama je smanjila kognitivne deficite izazvane deplecijom serotonina kod pacova što ukazuje da verovatno drugi mehanizmi, a ne inhibicija SERT-a doprinose prokognitivnim efektima vortioksetina (Riga i sar., 2020).

Pored toga, pokazano je da vortioksetin može ublažiti kognitivno oštećenje indukovano fenciklidinom (antagonista NMDA receptora) u testu prepoznavanja novog objekta (Pehrson i sar., 2018). Imajući u vidu da je i u modelu hroničnog bola pokazano da dolazi do disfunkcije glutamatergičke neurotransmisije na nivou hipokampusa i smanjenja kognitivnih performansi u testu prepoznavanja novog objekta (Xiong i sar., 2020), pretpostavljamo da je uticaj vortioksetina na kognitivne performanse u testu prepoznavanja novog objekta i u našem istraživanju, barem delom posledica uticaja leka na NMDA-posredovanu glutamatergičku neurotransmisiju.

Veza između holinergičke neurotransmisije i kognitivnih funkcija je dobro dokumentovana; poboljšanje u kognitivnim funkcijama je uočeno nakon primene holinomimetika, dok se oštećenje kognitivnih funkcija javlja nakon primene antagonista holinergičkih receptora (poput skopolamina) (Pehrson i sar. 2016). Pokazano je da gubitak ekscitatorne holinergičke modulacije na nivou medijalnog prefrontalnog korteksa može imati važnu ulogu u nastanku kognitivne disfunkcije i u modelu neuropatskog bola (Radzicki i sar., 2017). Kao što je gorespomenuto, eksperimentalni nalazi ukazuju da vortioksetin može povećati nivo acetilholina u medijalnom prefrontalnom korteksu i hipokampusu (Bennabi i sar., 2019; Sanchez i sar., 2015), dok su rezultati ove doktorske disertacije pokazali učešće muskarinskih holinergičkih receptora u dejstvu vortioksetina. Pehrson i sar. (2016) su pokazali da akutna primena vortioksetina poboljšava kognitivne performanse u testu prepoznavanja novog objekta kod životinja kod kojih je deficit u memoriji izazvan primenom skopolamina. Stoga, pretpostavljamo da i u našem eksperimentu, efektima vortioksetina na kognitivne performanse, barem delom, doprinosi uticaj na holinergičku neurotransmisiju.

S druge strane, duloksetin nije ispoljio dozno-zavisan efekat u testu prepoznavanja novog objekta; niža testirana doza je poboljšala kognitivne performanse u većem stepenu u poređenju sa višom dozom istog leka kod ženki pacova sa osteoartritisom. Sličan efekat je zabeležen i kod mužjaka pacova, iako efekat nije bio statistički značajan. Odsustvo dozno-zavisnog efekta duloksetina u testu prepoznavanja novog objekta se može pripisati kompleksnom uticaju serotonina i noradrenalina na funkciju hipokampusa. Serotonin može i da stimuliše i da inhibira funkciju hipokampusa, zavisno od (pod)tipa receptora koji se aktivira i njegove lokalizacije; serotonergički receptori su eksprimirani i na ekscitatornim ćelijama i na inhibitornim interneuronima, pa neto efekat povećanja nivoa serotonina zavisi od lokalne koncentracije serotonina, zastupljenosti različitih populacija serotoninskih receptora i gustine receptora na odgovarajućoj populaciji ćelija (Dale i sar., 2016; Coray i Quednow 2022). U skladu sa tim, podaci o uticaju antidepresiva iz grupe *SSRI* na funkciju hipokampusa su nekonzistentni. Postoje podaci koji ukazuju da *SSRI* mogu poboljšati kognitivne deficite kod pacijenata sa depresijom, ali isto tako da mogu i pogoršati pamćenje. Deplecija L-triptofana, prekursora serotonina, dovodi do smanjenja performansi u testu prepoznavanja novog objekta kod glodara. S druge strane i primena *SSRI* u većim dozama može izazvati deficite u prostornoj memoriji, dok u manjim dozama izostaje ovaj efekat (Coray i Quednow 2022).

Za razliku od serotonina, noradrenalin je uglavnom u vezi sa stimulacijom funkcije hipokampusa. Štaviše, za antidepresive iz grupe inhibitora preuzimanja noradrenalina (atomoksetin i reboksetin), kao i duloksetin je pokazano da mogu poboljšati kognitivne performanse u testu prepoznavanja novog objekta kod zdravih životinja (Feltmann i sar., 2015). Za duloksetin postoje podaci da može ublažiti deficit pamćenja i u modelu hroničnog bola kod pacova što je praćeno u testu prepoznavanja novog objekta (Phelps i sar., 2021). Dodatno, atomoksetin je i zvanično odobren kod poremećaja pažnje sa hiperaktivnošću (engl. *attention deficit hyperactivity disorder*, *ADHD*; Cortese 2020). Pretpostavljamo da duloksetin u većoj dozi značajno povećava nivo serotonina, čime se neutrališu njegovi korisni efekti koji se primećeni sa nižom dozom. Dodatno, naš

eksperimentalni nalaz je u skladu i sa kliničkim podacima koji ukazuju na konzistentniji prokognitivni efekat vortiooksetina u odnosu na druge antidepresive (Blumberg i sar., 2020).

5.4. Mehanizam dejstva vortiooksetina u modelu osteoartritisa

5.4.1. Uticaj vortiooksetina na markere bolne preosetljivosti u kolenu životinja sa osteoartritisom

Injekcija monojodoacetata u našim eksperimentalnim uslovima je značajno povećala ekspresiju inflamatornih medijatora, *Il-1 β* i *Ngf*, 28 dana nakon indukcije osteoartritisa kod životinja oba pola u poređenju sa zdravim životinjama. Ovo je u saglasnosti sa nalazima drugih istraživačkih grupa, koji su pokazali povećanje koncentracije ili genske ekspresije inflamatornih medijatora u kolenu pacova sa osteoartritisom (Orita i sar., 2011; Zhang i sar., 2013). Ekspresija *Tnf- α* nije bila značajno povišena u poređenju sa zdravom kontrolom; pik koncentracije *Tnf- α* je uočen 4. dana od injekcije monojodoacetata (Zhang i sar., 2013), što može objasniti odsustvo značajnog povećanja ekspresije iRNK za *Tnf- α* u našem eksperimentu 28. dana od indukcije osteoartritisa.

Ponavljana primena vortiooksetina je značajno smanjila ekspresiju gena za *Ngf* u kolenu pacova oba pola. Ovo je jedan od najznačajnijih nalaza našeg istraživanja, imajući u vidu da se nervni faktor rasta nameće kao jedan od najvažnijih medijatora koji doprinosi nastanku bola kod osteoartritisa (Wise i sar., 2021). U prilog tome govore i rezultati studija koje pokazuju da monoklonska antitela usmerena prema NGF značajno smanjuju bol i poboljšavaju funkciju zglobova kod pacijenata sa osteoartritisom kolena ili kuka (Schmelz i sar., 2019).

Oštećenje zglobova povećava ekspresiju i/ili dovodi do povećanog oslobađanja NGF od strane imunskih i neimunskih ćelija kao što su hondrociti i sinoviociti. Pokazano je da stimulacija hondrocita različitim proinflamatornim medijatorima, uključujući i *Il-1 β* ili mehaničkim stresom povećava ekspresiju gena za *Ngf* (Pecchi i sar., 2014; Blaney Davidson i sar., 2015). Inflamacija, kao i mehaničko opterećenje zglobova u osteoartritisu dovode do aktivacije NF- κ B, transkripcionog faktora koji povećava ekspresiju gena za različite inflamatorne medijatore (Choi i sar., 2019; Kapoor i sar., 2010). S druge strane, inhibitori NF- κ B smanjuju indukovanu ekspresiju gena za *Il-1 β* u kulturi hondrocita (Choi i sar., 2018, 2019).

U *ex vivo* studiji na izolovanim humanim makrofagama izloženim proinflamatornim stimulusom, pokazano je da vortiooksetin smanjuje aktivaciju NF- κ B (Talmon i sar., 2018). U našoj studiji, vortiooksetin je doveo do približno dvostrukog smanjenja ekspresije gena za *Il-1 β* u poređenju sa bolesnom kontrolnom grupom životinja, što se može objasniti uticajem na NF- κ B. Iako nismo ispitivali celularne mehanizme koji doprinose efektima vortiooksetina u modelu osteoartritisa, pretpostavljamo da se ovi efekti mogu dovesti u vezu sa glavnim targetima vortiooksetina, SERT, 5-HT₃ i 5-HT_{1B/1D} receptorima (De Diego-Adeliño i sar., 2022). O značaju inhibicije SERT ukazuju podaci da antidepresivi iz grupe SSRI (fluoksetin i sertralin) mogu sprečiti aktivaciju NF- κ B u ćelijama mikroglije (Du i sar., 2014; Lu i sar., 2019). Dodatno, sam serotonin može umanjiti aktivaciju NF- κ B (Talmon i sar., 2018). S druge strane, ovom efektu vortiooksetina može doprineti i aktivacija 5-HT_{1B/1D} receptora; pokazano je da sumatriptan smanjuje nivo NF- κ B u uzorcima jezika pacova sa oralnim mukozitisom (Ala i sar., 2020). Pored toga, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali uključenost serotonergičkih 5-HT_{1B/1D} receptora u antinociceptivnom dejstvu vortiooksetina u modelu trigeminalnog bola.

Međutim, serotonin može i povećati nivo proinflamatornih medijatora aktivacijom 5-HT₃, 5-HT₄, i 5-HT₇ receptora u ćelijama humanih monocita (Dürk i sar., 2005). Ovim se može objasniti zašto vortiooksetin koji blokira 5-HT₃ i 5-HT₇ receptore smanjuje ekspresiju *Ngf*, za razliku od duloksetina koji ne poseduje direktan uticaj na serotonergičke receptore i ne smanjuje gensku ekspresiju *Ngf*.

Sposobnost vortiooksetina da smanji gensku ekspresiju *Ngf* mogla bi imati važne kliničke implikacije jer se nervni faktor rasta nameće kao atraktivno ciljno mesto lekova u terapiji bola kod osteoartritisa. Međutim, ne smemo da prenebregnemo zdravstvene rizike koje nosi blokada NGF. Iako su monoklonska antitela usmerena prema NGF pokazala efikasnost u ublažavanju bola kod pacijenata sa osteoartritisom, ovi lekovi nisu izašli na tržište zbog povećanog rizika od osteonekroze i rapidno progresivnog osteoartritisa (Lane i Corr 2017). Rizik je bio dozno-zavisan i povećavao se kada su se lekovi koristili zajedno sa NSAID (Schmelz i sar., 2019). Iako nije razjašnjen mehanizam u osnovi ovih neželjenih efekata, kao jedno od objašnjenja se navodi da analgetički efekat pod uticajem ovih lekova dovodi do prekomerne upotrebe zglobova, što posledično ubrzava progresiju bolesti (Teichtahl i Cicuttini 2016; Wise i sar., 2021). Blokada NGF može imati i direktan efekat na kost ili hrskavicu. Dodatno, neželjeni efekti blokade NGF su verovatno posledica poremećaja fizioloških funkcija NGF, koje uključuju preživljavanje perifernih senzornih neurona, obnovu hrskavice i formiranje kostiju izazvano opterećenjem težinom (Schmelz i sar., 2019; Tomlinson i sar., 2017; Wise i sar., 2021).

Važno je naglasiti da je u našem istraživanju vortiooksetin smanjio ekspresiju gena za *Ngf* do nivoa izmerenog kod zdravih životinja (zdrava kontrola), pa pretpostavljamo da primena vortiooksetina ne bi dovela do oštećenja zglobova.

5.4.2. Uticaj vortiooksetina na markere oksidativnog oštećenja u kolenu životinja sa osteoartritisom

U našem eksperimentu je pokazano da injekcija monojodoacetata povećava markere oksidativnog stresa u kolenu pacova sa osteoartritisom. Ovo je u saglasnosti sa drugim studijama u kojima su koristili isti model osteoartritisa (Lu i sar., 2018; Yamada i sar., 2019). Rezultati ove doktorske disertacije su proširili ovaj nalaz korišćenjem životinja oba pola; efekti su bili prisutni i kod mužjaka i kod ženki pacova, ali su nivoi O_2^- , PAB i AOPP bili značajno viši kod mužjaka pacova u poređenju sa životinjama suprotnog pola, što ukazuje na izraženije oksidativno oštećenje kod mužjaka.

Ponavljana primena vortiooksetina je smanjila parametre oksidativnog stresa u kolenu pacova oba pola, za razliku od duloksetina. Antioksidativna svojstva vortiooksetina su prepoznata i na izolovanim humanim makrofagama tretiranim supstancom koji izaziva snažan oksidativni udar, gde je vortiooksetin sprečio porast nivoa superoksidnog anjona (Talmon i sar., 2018). Dodatno, vortiooksetin je smanjio oksidativno oštećenje u mozgu pacova u modelu stresa (Akyuz i sar., 2024). Antioksidativna svojstva vortiooksetina se takođe mogu pripisati blokadi serotoninских 5-HT₃ receptora za koju je pokazano da doprinosi neuroprotektivnim efektima nakon oksidativnog oštećenja (Gupta i sar., 2015, 2016).

Ovaj efekat vortiooksetina je bio izraženiji kod ženki pacova što se delom može pripisati i izraženijem oksidativnom oštećenju kod mužjaka pacova. Dodatno, u *in vitro* studiji na humanim sinoviocitima je pokazano da su ćelije ženskih donora otpornije na nepovoljne uslove sredine (inflamacija i oksidativni stres) u poređenju sa istim ćelijama muškaraca. Kod sinoviocita ženskih donora pokazana je veća otpornost, brže zarastanje mikro-rana i niža produkcija reaktivnih kiseoničnih jedinjenja u odnosu na ćelije muških donora kada se izlože inflamatornim medijatorima, što ukazuje na niži kapacitet odbrane od oksidativnog stresa kod muškaraca (Veronesi i sar., 2022). Jedno od objašnjenja može biti uticaj estrogenih hormona; protektivni efekat estrogeni hormoni ostvaruju povećanjem ekspresije gena za antioksidantne proteine, kao i uticajem na mitohondrijsku DNK, što dovodi do smanjenog stvaranja reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (Tower i sar., 2020).

5.4.3. Uticaj vortiooksetina na markere bolne preosetljivosti ipsilateralno u spinalnim ganglijama i kičmenoj moždini u predelu L3-L5 kod životinja sa osteoartritisom

Neuroinflamacija unutar perifernog i centralnog nervnog sistema se sve više prepoznaje kao jedan od mehanizama koji doprinosi razvoju hroničnog bola, uključujući i bol kod osteoartritisa (Ji i sar., 2014, 2018; Wood i sar., 2022). Primena monojodoacetata u našoj studiji je značajno povećala gensku ekspresiju proinflamatornih citokina i neuromodulatora u L3-L5 segmentu spinalnih ganglija i kičmenoj moždini životinja oba pola. Ovi rezultati su u saglasnosti sa nalazima drugih istraživačkih grupa koji su pokazali povećan nivo inflamatornih medijatora u istom modelu (Im i sar., 2010; Lockwood i sar., 2019; Miller i sar., 2014). Dodatno, ranije studije su pokazale infiltraciju makrofaga u spinalnim ganglijama (Raoof i sar., 2021) i povećanu proliferaciju i aktivaciju mikroglija (Ogbonna i sar., 2013; Sagar i sar., 2011; Thakur i sar., 2012) na nivou kičmene moždine u modelu osteoartritisa indukovano monojodoacetatom. Stoga, pretpostavljamo da i u našoj studiji povećana aktivnost makrofaga i mikroglija doprinosi razvoju centralne senzitivizacije i održavanju hroničnog bola.

Ponavljana primena vortiooksetina i duloksetina je značajno smanjila nivoe iRNK za *IL-1 β* , *Tnf- α* , *Ngf*, *Bdnf* i *Tac1* u lumbarnim L3-L5 ganglijama dorzalnih korenova kičmene moždine, kao i *IL-1 β* , *Tnf- α* , *Bdnf* i *Tac1* na nivou lumbarnog L3-L5 dela kičmene moždine. Interesantno, ovi efekti su bili polno-specifični tj. prisutni samo kod mužjaka, ali ne i ženki pacova.

Dobijene polno-specifične razlike u uticaju vortiooksetina i duloksetina na markere neuroinflamacije u našem istraživanju se mogu barem delom objasniti uključenosti različitih ćelija imunskog sistema u nastanku bolne preosetljivosti kod mužjaka i ženki pacova (Gregus i sar., 2021; Mapplebeck i sar., 2016; Sorge i sar., 2015). Kod mužjaka značajniju ulogu igraju ćelije mikroglija, dok kod ženki T-ćelije adaptivnog imunskog sistema doprinose održavanju hroničnog bola (ova razlika izgleda da je povezana sa uticajem polnih hormona – testosteron potiskuje aktivnost/diferencijaciju proinflamatornih T-ćelija, za razliku od estrogena koji ih stimuliše; mužjaci se stoga oslanjaju na ćelije mikroglije za održavanje centralne komponente hroničnog bola; Sorge i Totsch, 2017). Pokazano je da inhibitori aktivacije mikroglija mogu ublažiti bolnu preosetljivost kod mužjaka, ali ne i kod ženki (Gregus i sar., 2021; Mogil 2020; Rosen i sar., 2017; Sorge i sar., 2015). Jedna od ključnih razlika između polova uočena je u ekspresiji purinergičkih P2X4 receptora, koji su povećano eksprimirani na ćelijama mikroglije kod mužjaka, ali ne i kod ženki (Mapplebeck i sar., 2016, 2018). Pokazano je da inhibicija spinalnih purinergičkih P2X4 receptora ublažava bolnu preosetljivost kod mužjaka, ali ne i kod ženki miševa. Dodatno, pokazano je da aktivacija purinergičkih P2X4 receptora dovodi do oslobađanja BDNF iz ćelija mikroglija, ali i povećane ekspresije BDNF (Trang i sar., 2009). BDNF dovodi do nishodne regulacije kalijum-hloridnog kotransportera KCC2, što povećava ekscitabilnost spinalnih neurona (Ma i sar., 2021).

Za duloksetin je pokazano da može smanjiti aktivaciju mikroglija u dorzalnim rogovima kičmene moždine u modelu osteoartritisa izazvanim monojodoacetatom (Kawarai i sar., 2019), kao i modelu bolne dijabetesne neuropatije (Tawfik i sar., 2018). Dodatno, i za druge antidepresive iz grupe SSRI (fluoksetin) i SNRI (atomoksetin) je pokazano da mogu inhibirati aktivaciju mikroglija (Zhang i sar., 2018; Zychowska i sar., 2015). Pored toga, za duloksetin (Yamashita i sar., 2016) kao i druge antidepresive koji inhibiraju preuzimanje noradrenalina i/ili serotonina (paroksetin, fluoksetin, maprotilin, klomipramin) je pokazano da mogu inhibirati P2X4 receptore (Nagata i sar., 2009; Yamashita i sar., 2016). Ovim, barem delom, možemo objasniti rezultate našeg istraživanja; oba antidepresiva su verovatno inhibirala aktivaciju mikroglija, preciznije inhibirali su aktivaciju purinergičkih P2X4 receptora, za koje je pokazano da su povećano eksprimirani kod mužjaka glodara (Mapplebeck i sar., 2018). Dodatno, oba leka su inhibirala ekspresiju iRNK za BDNF kod mužjaka, ali ne i kod ženki, a imajući u vidu vezu između P2X4 receptora i BDNF, pretpostavljamo da polni dimorfizam u ekspresiji P2X4 receptora može barem delom objasniti dobijene polne razlike u našoj studiji.

Kod mužjaka pacova sa povredom neurona je uočeno da spinalna primena agoniste 5-HT₃ receptora dovodi do hiperaktivacije glia ćelija, neuralne hiperekscitabilnosti i razvoja bolne preosetljivosti, što je bilo ublaženo

primenom antagoniste 5-HT₃ receptora (Guo i sar., 2014). Ovim se može objasniti i efekat vortioksetina u našem istraživanju, inhibicijom SERT i blokadom 5-HT₃ receptora, vortioksetin je verovatno inhibirao aktivaciju glija ćelija i doveo do nishodne regulaciju medijatora neuroinflamacije kod mužjaka pacova.

Kod inflamacije perifernog tkiva, T-ćelije (uglavnom Th1) migriraju u kičmenu moždinu i oslobađaju medijatore koji doprinose razvoju hroničnog bola (Yang i sar., 2022). Među serotonergičkim receptorima eksprimiranim na površini T limfocita, najvažniju ulogu imaju 5-HT_{1B} receptori (Yin i sar., 2006). Direktnom i indirektnom aktivacijom serotonergičkih 5-HT_{1B} receptora, vortioksetin bi mogao doprineti aktivaciji T limfocita, što može objasniti odsustvo efekta na smanjenje ekspresije medijatora bolne preosetljivosti kod ženki pacova. Ipak, potrebne su dodatne studije kako bismo bolje razumeli polni dimorfizam u efektima vortioksetina u našem eksperimentalnom istraživanju.

5.5. Uticaj vortioksetina i duloksetina na parametre redoks statusa u srcu životinja sa osteoartritisom

Indukcija osteoartrisa u našim eksperimentalnim uslovima nije dovela do promena redoks statusa u srcu životinja sa osteoartritisom u poređenju sa zdravom grupom životinja. Dodatno, kod životinja sa osteoartritisom nisu uočene histološke promene kardiomiocita. Osteoartritis je neretko udružen sa kardiovaskularnim bolestima. Smatra se da nizak stepen inflamacije postoji kod pacijenata sa osteoartritisom i dovodi se u vezu sa kardiom metaboličkim komorbiditetima (Robinson i sar., 2016).

Vortioksetin nije imao uticaj na parametre redoks statusa, kao i morfologiju kardiomiocita kod životinja sa osteoartritisom. Suprotno, ponavljana primena duloksetina je dovela do povećanja parametara oksidativnog stresa u srčanom mišiću ženki pacova sa osteoartritisom. Dodatno, kod životinja oba pola je došlo do morfoloških promena kardiomiocita, ali je efekat bio izraženiji kod ženki pacova tretiranih većom dozom duloksetina. Uočili smo vakuolizaciju kardiomiocita, za koju se smatra da je posledica oštećenja mitohondrija u uslovima povećanog oksidativnog stresa (Sharma i sar., 2020).

Vortioksetin se smatra generalno bezbednim antidepresivom i njegova primena nije u vezi sa kardiovaskularnim neželjenim efektima (Behlke i sar., 2021). Dodatno, vortioksetin je pokazao antioksidativna svojstva u modelu Alchajmerove bolesti (Caruso i sar., 2021), kao i na izolovanim monocitima (Talmon i sar., 2018). Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da vortioksetin smanjuje parametre oksidativnog stresa u kolenu pacova sa osteoartritisom.

Za duloksetin postoje podaci da može dovesti do oksidativnog oštećenja jetre i mozga miševa (Álvarez-González i sar., 2021). Oksidativno oštećenje jetre od strane duloksetina je pokazano i u *in vitro* studiji i smatra se da je u osnovi hepatotoksičnosti koja se može videti kod terapijske primene duloksetina (Liu i sar., 2022; Richard i sar., 2023). Pretpostavlja se da su za oksidativno oštećenje odgovorni metaboliti duloksetina, koji nastaju pod uticajem CYP1A2 i CYP2D6 izoenzima (Liu i sar., 2022). Važno je naglasiti da je CYP1A2 takođe eksprimiran na srčanom mišiću i da je njegova ekspresija veća kod ženki pacova u odnosu na mužjake (Gerges i sar., 2023). Ovaj nalaz može objasniti polno-specifične razlike dobijene u našem istraživanju tj. povećanje markera redoks statusa kod ženki tretiranih duloksetinom (i izraženije histološke promene kardiomiocita), ali ne i kod mužjaka pacova. Koliko je nama poznato, za sada ne postoji podaci koji ukazuju na kardiotoksični potencijal duloksetina kod ljudi. Međutim, obe izoforme CYP450 enzima koje su uključene u metabolizam duloksetina su eksprimirane i na humanom srcu što ukazuje da bi se oksidativno oštećenje moglo videti i u humanoj populaciji (Minamiyama i sar., 1999; Thum i Borlak 2000). Duloksetin može dovesti do kardiovaskularnih neželjenih efekata, posebno kod starijih pacijenata i onim sa kardiovaskularnim komorbiditetima, ali su oni uglavnom blagi; najčešće se javlja blaga tahikardija i porast krvnog pritiska (Behlke i sar., 2021; Park i sar., 2020). Kao što je gore spomenuto, primena duloksetina tokom 28 dana odgovara vremenu od oko 2 godine kod ljudi (Sengupta 2013). Iako je teško vršiti ekstrapolaciju podataka sa životinja na

humanu populaciju, naši rezultati ukazuju da duloksetin poseduje potencijal za oštećenje srca nakon produžene primene (verovatno nekoliko godina).

6. Zaključak

1. Antinociceptivni efekti vortioksetina u akutnim modelima inflamatornog bola i mehanizam dejstva vortioksetina u akutnom modelu trigeminalnog bola

Vortioksetin je ostvario dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u akutnim modelima inflamatornog trigeminalnog, visceralnog i somatskog bola. Ovo ukazuje da bi vortioksetin mogao biti efikasan u terapiji inflamatornih bolnih stanja. Dodatno, primena vortioksetina nije dovela do motorne onesposobljenosti životinja na *rotarod*-u što ukazuje da ovi efekti nisu posledica motorne inkoordinacije ili sedacije eksperimentalnih životinja.

Korišćenjem standardnog farmakološkog pristupa, pokazali smo da vortioksetin svoje efekte u modelu trigeminalnog bola, barem delom, ostvaruje aktivacijom serotonergičkih 5-HT_{1B/1D} receptora, adrenergičkih α_2 i β_1 receptora, muskarinskih i nikotinskih α_7 receptora, kanabinoidnih CB₁ i CB₂ receptora i adenozičkih A₁ receptora.

2. Antinociceptivni efekat vortioksetina u modelu osteoartritisa

Vortioksetin je dozno-zavisno umanjio bolnu preosetljivost u modelu osteoartritisa kod pacova oba pola; efekat je bio uporediv sa duloksetinom, lekom koji se koristi kao jedna od alternativnih opcija za lečenje bola kod osteoartritisa u humanoj populaciji. Ovo je verovatno jedan od najznačajnijih nalaza ove doktorske disertacije jer korišćeni model poseduje dobru translacionu vrednost. Dodatno, uključivanjem životinja oba pola smo povećali prediktivnu vrednost dobijenih rezultata. Iako se osteoartritis značajno češće viđa kod osoba ženskog pola, prekliničke studije dominantno koriste mužjake u istraživanjima. Rezultati ove doktorske disertacije su dali detaljnu bihejvioralnu karakterizaciju modela sa direktnim poređenjem između polova.

3. Mehanizam dejstva vortioksetina u animalnom modelu osteoartritisa.

3.1. Vortioksetin smanjuje gensku ekspresiju *Ngf* i parametre oksidativnog stresa u kolenu pacova sa osteoartritisom: prednosti nad duloksetinom

Vortioksetin (za razliku od duloksetina) je smanjio ekspresiju iRNK za *Ngf* u kolenu pacova sa osteoartritisom; efekat je bio prisutan kod životinja oba pola. Dodatno, lek je smanjio nivo markera oksidativnog oštećenja u kolenu pacova; efekat je bio izraženiji kod ženki pacova. Imajući u vidu da se nervni faktor rasta spominje kao jedan od najznačajnijih medijatora koji doprinose bolnoj preosetljivosti kod osteoartritisa, kao i da su lekovi usmereni prema NGF značajno ublažili bol kod ljudi, ovaj nalaz može imati značajne kliničke implikacije. Važno je još jednom naglasiti da je vortioksetin smanjio nivo ekspresije iRNK za *Ngf* do nivoa koji je bio prisutan kod zdravih životinja, čime se verovatno ne očekuju neželjeni efekti koji su pratili blokadu NGF kod ljudi.

3.2. Vortioksetin smanjuje gensku ekspresiju markera neuroinflamacije u spinalnim ganglijama i kičmenoj moždini kod mužjaka, ali ne i ženki pacova sa osteoartritisom

Vortioksetin i duloksetin su smanjili nivo iRNK za *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Ngf*, *Bdnf* i *Tac1* u ganglijama dorzalnih korenova kičmene moždine, kao i *Il-1 β* , *Tnf- α* , *Bdnf* i *Tac1* u kičmenoj moždini mužjaka, ali ne i ženki pacova sa osteoartritisom. Ovaj nalaz verovatno upućuje na polno-specifične razlike u imunskom odgovoru. Sve više podataka ukazuje da kod mužjaka veću ulogu imaju ćelije mikroglije, dok kod ženki značajniju ulogu imaju T-ćelije adaptivnog imunskog odgovora. Ipak, potrebne su dodatne studije da bismo utvrdili mehanizam u osnovi dobijenih polno-specifičnih razlika.

4. Vortioksetin poboljšava kognitivne performanse životinja sa osteoartritisom: prednosti nad duloksetinom

Danas je prepoznato da je bol jedno multidimenzionalno iskustvo i da pacijenti sa hroničnim bolnim stanjima, uključujući i osteoartritis, neretko imaju narušen kvalitet života, ali i probleme sa učenjem, pamćenjem i održavanjem pažnje. Rezultati ove doktorske disertacije su pratili efekte lekova na bolnu preosetljivost, ali i

prisutne komorbiditete koje srećemo kod pacijenata sa osteoartritisom i koje čine sastavni deo terapijskog pristupa pacijentima sa hroničnim bolom kroz vizuru biopsihosocijalnog modela.

Vortioksetin je poboljšao kognitivne performanse kod životinja oba pola u testu prepoznavanja novog objekta; efekat je bio dozno-zavisan. Manja doza duloksetina je poboljšala kognitivne performanse životinja sa osteoartritisom, ali ne i veća. Dobijeni nalaz ukazuje na nedvosmislenu prednost vortioksetina u poređenju sa duloksetinom. Iako lekovi pokazuju poredbene antinociceptivne efekte, vortioksetin ostvaruje povoljniji efekat na kognitivnu funkciju.

5. Bezbednosni profil vortioksetina: vortioksetin ne narušava opštu dobrobit životinja u testu kopanja, motornu spretnost u *rotarod* testu i redoks status kardiomiocita u modelu osteoartritisa: prednosti nad duloksetinom

Vortioksetin, za razliku od duloksetina, nije narušio aktivnost kopanja (surogat za opštu dobrobit eksperimentalnih životinja (engl. *well-being*)) kod životinja sa osteoartritisom. Interesantno, duloksetin je dozno-zavisno umanjio aktivnost kopanja kod životinja oba pola; efekat je bio izraženiji kod ženki.

Vortioksetin nije imao značajan uticaj na parametre redoks statusa u srcu pacova sa osteoartritisom, za razliku od duloksetina koji je povećao nivo markera oksidativnog stresa u srcu pacova sa osteoartritisom. Dodatno, vortioksetin nije doveo do značajnijih histoloških promena kardiomiocita. S druge strane, duloksetin je doveo do izvesnih morfoloških promena kardiomiocita koje ukazuju na oksidativno oštećenje; ove promene su bile izraženije kod ženki pacova. Na kraju, ovi eksperimentalni nalazi ukazuju na povoljniji bezbednosni profil vortioksetina nakon produžene primene. Iako lekovi pokazuju poredbene antinociceptivne efekte, vortioksetin ostvaruje više povoljnih efekata; ne narušava opštu dobrobit životinja i ne pokazuje kardiotoksični potencijal.

7. Literatura

1. Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.* 2020 Mar;104(2):293-311.
2. Adães S, Almeida L, Potes CS, Ferreira AR, Castro-Lopes JM, Ferreira-Gomes J, Neto FL. Glial activation in the collagenase model of nociception associated with osteoarthritis. *Mol Pain.* 2017 Jan;13:1744806916688219.
3. Adamo D, Calabria E, Coppola N, Pecoraro G, Mignogna MD. Vortioxetine as a new frontier in the treatment of chronic neuropathic pain: a review and update. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2021 Sep 3;11:20451253211034320.
4. Akerman S, Holland PR, Lasalandra MP, Goadsby PJ. Endocannabinoids in the brainstem modulate dural trigeminovascular nociceptive traffic via CB1 and "triptan" receptors: implications in migraine. *J Neurosci.* 2013 Sep 11;33(37):14869-77.
5. Akyuz Cim EF, Suleyman Z, Suleyman H, Yazici GN, Coban TA. Effect of Sertraline and Vortioxetine on Stress-Induced Brain Injury in Rats: Biochemical and Histopathological Evaluations. *Clin Neuropsychopharmacol.* 2024 Nov-Dec 01;47(6):213-217.
6. Álvarez-González I, Camacho-Cantera S, Gómez-González P, Barrón MJR, Morales-González JA, Madrigal-Santillán EO, Paniagua-Pérez R, Madrigal-Bujaidar E. Genotoxic and oxidative effect of duloxetine on mouse brain and liver tissues. *Sci Rep.* 2021 Mar 25;11(1):6897.
7. Andrews N, Legg E, Lisak D, Issop Y, Richardson D, Harper S, Pheby T, Huang W, Burgess G, Machin I, Rice AS. Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur J Pain.* 2012 Apr;16(4):485-95.
8. Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother.* 2020 Sep;129:110452.
9. Aoki M, Tsuji M, Takeda H, Harada Y, Nohara J, Matsumiya T, Chiba H. Antidepressants enhance the antinociceptive effects of carbamazepine in the acetic acid-induced writhing test in mice. *Eur J Pharmacol.* 2006 Nov 21;550(1-3):78-83.
10. Apkarian AV, Sosa Y, Sonty S, Levy RM, Harden RN, Parrish TB, Gitelman DR. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J Neurosci.* 2004 Nov 17;24(46):10410-5.
11. Apkarian VA, Hashmi JA, Baliki MN. Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain.* 2011 Mar;152(3 Suppl):S49-S64.
12. Arendt-Nielsen L, Nie H, Laursen MB, Laursen BS, Madeleine P, Simonsen OH, Graven-Nielsen T. Sensitization in patients with painful knee osteoarthritis. *Pain.* 2010 Jun;149(3):573-581.
13. Attal N, Masselin-Dubois A, Martinez V, Jayr C, Albi A, Fermanian J, Bouhassira D, Baudic S. Does cognitive functioning predict chronic pain? Results from a prospective surgical cohort. *Brain.* 2014 Mar;137(Pt 3):904-17.
14. Avila-Rojas SH, Velázquez-Lagunas I, Salinas-Abarca AB, Barragán-Iglesias P, Pineda-Farias JB, Granados-Soto V. Role of spinal 5-HT_{5A}, and 5-HT_{1A/1B/1D}, receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Brain Res.* 2015 Oct 5;1622:377-85.
15. Bahari Z, Meftahi GH. Spinal α_2 -adrenoceptors and neuropathic pain modulation; therapeutic target. *Br J Pharmacol.* 2019 Jul;176(14):2366-2381.
16. Bang-Andersen B, Ruhland T, Jørgensen M, Smith G, Frederiksen K, Jensen KG, Zhong H, Nielsen SM, Hogg S, Mørk A, Stensbøl TB. Discovery of 1-[2-(2,4-dimethylphenylsulfanyl)phenyl]piperazine (Lu AA21004): a novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder. *J Med Chem.* 2011 May 12;54(9):3206-21.
17. Bannister K, Dickenson AH. The plasticity of descending controls in pain: translational probing. *J Physiol.* 2017 Jul 1;595(13):4159-4166.

18. Bannister K, Dickenson AH. What do monoamines do in pain modulation? *Curr Opin Support Palliat Care*. 2016 Jun;10(2):143-8.
19. Baral P, Udit S, Chiu IM. Pain and immunity: implications for host defence. *Nat Rev Immunol*. 2019 Jul;19(7):433-447.
20. Bardin L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav Pharmacol*. 2011 Sep;22(5-6):390-404.
21. Bardoni R. Serotonergic Modulation of Nociceptive Circuits in Spinal Cord Dorsal Horn. *Curr Neuropharmacol*. 2019;17(12):1133-1145.
22. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999 Aug;38(8):1083-152. doi: 10.1016/s0028-3908(99)00010-6. PMID: 10462127.
23. Bartsch T, Knight YE, Goadsby PJ. Activation of 5-HT(1B/1D) receptor in the periaqueductal gray inhibits nociception. *Ann Neurol*. 2004 Sep;56(3):371-81. doi: 10.1002/ana.20193. PMID: 15349864.
24. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009 Oct 16;139(2):267-84.
25. Bayne T, Brainard D, Byrne RW, Chittka L, Clayton N, Heyes C, Mather J, Ölveczky B, Shadlen M, Suddendorf T, Webb B. What is cognition? *Curr Biol*. 2019 Jul 8;29(13):R608-R615.
26. Beery AK. Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. *Curr Opin Behav Sci*. 2018 Oct;23:143-149.
27. Behlke LM, Lenze EJ, Carney RM. The Cardiovascular Effects of Newer Antidepressants in Older Adults and Those With or At High Risk for Cardiovascular Diseases. *CNS Drugs*. 2020 Nov;34(11):1133-1147.
28. Bennabi D, Haffen E, Van Waes V. Vortioxetine for Cognitive Enhancement in Major Depression: From Animal Models to Clinical Research. *Front Psychiatry*. 2019 Nov 6;10:771.
29. Best AR, Regehr WG. Serotonin evokes endocannabinoid release and retrogradely suppresses excitatory synapses. *J Neurosci*. 2008 Jun 18;28(25):6508-15.
30. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1306-11.
31. Blaney Davidson EN, van Caam AP, Vitters EL, Bennink MB, Thijssen E, van den Berg WB, Koenders MI, van Lent PL, van de Loo FA, van der Kraan PM. TGF- β is a potent inducer of Nerve Growth Factor in articular cartilage via the ALK5-Smad2/3 pathway. Potential role in OA related pain? *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 Mar;23(3):478-86.
32. Blumberg MJ, Vaccarino SR, McInerney SJ. Pro-cognitive Effects of Antidepressants and Other Therapeutic Agents in Major Depressive Disorder: A Systematic Review. *J Clin Psychiatry*. 2020 Jul 21;81(4):19r13200.
33. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Varani K. Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects? *Trends Pharmacol Sci*. 2016 Jun;37(6):419-434.
34. Bryden LA, Nicholson JR, Doods H, Pekcec A. Deficits in spontaneous burrowing behavior in the rat bilateral monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: an objective measure of pain-related behavior and analgesic efficacy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 Sep;23(9):1605-12.
35. Bryk M, Starowicz K. Cannabinoid-based therapy as a future for joint degeneration. Focus on the role of CB₂ receptor in the arthritis progression and pain: an updated review. *Pharmacol Rep*. 2021 Jun;73(3):681-699.
36. Burnham LJ, Dickenson AH. The antinociceptive effect of milnacipran in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain and its relation to changes in descending inhibition. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013 Mar;344(3):696-707.
37. Burnstock G, Sawynok J. Adenosine Triphosphate and Adenosine Receptors and Pain. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, eds. *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press, 2010: 303-226.

38. Bushnell MC, Ceko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Jul;14(7):502-11.
39. Cao B, Xu Q, Shi Y, Zhao R, Li H, Zheng J, Liu F, Wan Y, Wei B. Pathology of pain and its implications for therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Jun 8;9(1):155.
40. Caraci F, Merlo S, Drago F, Caruso G, Parenti C, Sortino MA. Rescue of Noradrenergic System as a Novel Pharmacological Strategy in the Treatment of Chronic Pain: Focus on Microglia Activation. *Front Pharmacol*. 2019 Sep 12;10:1024.
41. Carcolé M, Zamanillo D, Merlos M, Fernández-Pastor B, Cabañero D, Maldonado R. Blockade of the Sigma-1 Receptor Relieves Cognitive and Emotional Impairments Associated to Chronic Osteoarthritis Pain. *Front Pharmacol*. 2019 May 3;10:468.
42. Caruso G, Grasso M, Fidilio A, Torrisi SA, Musso N, Geraci F, Tropea MR, Privitera A, Tascadda F, Puzzo D, Salomone S, Drago F, Leggio GM, Caraci F. Antioxidant Activity of Fluoxetine and Vortioxetine in a Non-Transgenic Animal Model of Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol*. 2021 Dec 24;12:809541.
43. Chao OY, de Souza Silva MA, Yang YM, Huston JP. The medial prefrontal cortex - hippocampus circuit that integrates information of object, place and time to construct episodic memory in rodents: Behavioral, anatomical and neurochemical properties. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020 Jun;113:373-407.
44. Chen G, Zhang YQ, Qadri YJ, Serhan CN, Ji RR. Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain. *Neuron*. 2018 Dec 19;100(6):1292-1311.
45. Chen JF, Lee CF, Chern Y. Adenosine receptor neurobiology: overview. *Int Rev Neurobiol*. 2014;119:1-49.
46. Chen Q, Heinricher MM. Descending Control Mechanisms and Chronic Pain. *Curr Rheumatol Rep*. 2019 Mar 4;21(5):13.
47. Choi IS, Cho JH, Jang IS. A₁ receptors inhibit glutamate release in rat medullary dorsal horn neurons. *Neuroreport*. 2011 Oct 5;22(14):711-5.
48. Choi MC, Jo J, Park J, Kang HK, Park Y. NF- κ B Signaling Pathways in Osteoarthritic Cartilage Destruction. *Cells*. 2019 Jul 17;8(7):734.
49. Choi MC, Maruyama T, Chun CH, Park Y. Alleviation of Murine Osteoarthritis by Cartilage-Specific Deletion of I κ B ζ . *Arthritis Rheumatol*. 2018 Sep;70(9):1440-1449.
50. Cohen E, Lee YC. A Mechanism-Based Approach to the Management of Osteoarthritis Pain. *Curr Osteoporos Rep*. 2015 Dec;13(6):399-406.
51. Cohen SP, Vase L, Hooten WM. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *Lancet*. 2021 May 29;397(10289):2082-2097.
52. Conaghan PG, Cook AD, Hamilton JA, Tak PP. Therapeutic options for targeting inflammatory osteoarthritis pain. *Nat Rev Rheumatol*. 2019 Jun;15(6):355-363.
53. Cook AD, Christensen AD, Tewari D, McMahon SB, Hamilton JA. Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. *Trends Immunol*. 2018 Mar;39(3):240-255.
54. Coray R, Quednow BB. The role of serotonin in declarative memory: A systematic review of animal and human research. *Neurosci Biobehav Rev*. 2022 Aug;139:104729.
55. Cortese S. Pharmacologic Treatment of Attention Deficit-Hyperactivity Disorder. *N Engl J Med*. 2020 Sep 10;383(11):1050-1056.
56. Cowen P, Sherwood AC. The role of serotonin in cognitive function: evidence from recent studies and implications for understanding depression. *J Psychopharmacol*. 2013 Jul;27(7):575-83.
57. Cowen SL, Phelps CE, Navratilova E, McKinzie DL, Okun A, Husain O, Gleason SD, Witkin JM, Porreca F. Chronic pain impairs cognitive flexibility and engages novel learning strategies in rats. *Pain*. 2018 Jul;159(7):1403-1412.
58. Dale E, Grunnet M, Pehrson AL, Frederiksen K, Larsen PH, Nielsen J, Stensbøl TB, Ebert B, Yin H, Lu D, Liu H, Jensen TN, Yang CR, Sanchez C. The multimodal antidepressant vortioxetine may

- facilitate pyramidal cell firing by inhibition of 5-HT₃ receptor expressing interneurons: An in vitro study in rat hippocampus slices. *Brain Res.* 2018 Jun 15;1689:1-11.
59. Dale E, Pehrson AL, Jeyarajah T, Li Y, Leiser SC, Smagin G, Olsen CK, Sanchez C. Effects of serotonin in the hippocampus: how SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS Spectr.* 2016 Apr;21(2):143-61.
 60. Damien J, Colloca L, Bellei-Rodriguez CE, Marchand S. Pain Modulation: From Conditioned Pain Modulation to Placebo and Nocebo Effects in Experimental and Clinical Pain. *Int Rev Neurobiol.* 2018;139:255-296.
 61. De Diego-Adelino J, Crespo JM, Mora F, Neyra A, Iborra P, Gutiérrez-Rojas L, Salonia SF. Vortioxetine in major depressive disorder: from mechanisms of action to clinical studies. An updated review. *Expert Opin Drug Saf.* 2022 May;21(5):673-690.
 62. De Felice M, Ossipov MH. Cortical and subcortical modulation of pain. *Pain Manag.* 2016 Apr;6(2):111-20.
 63. de Sousa Valente J. The Pharmacology of Pain Associated With the Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis. *Front Pharmacol.* 2019 Sep 18;10:974.
 64. Deacon RM. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc.* 2006;1(1):118-21.
 65. Deacon RM. Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behav Brain Res.* 2009 Jun 8;200(1):128-33.
 66. Denk F, Bennett DL, McMahon SB. Nerve Growth Factor and Pain Mechanisms. *Annu Rev Neurosci.* 2017 Jul 25;40:307-325.
 67. Dickenson, Anthony H. The Neurobiology of Chronic Pain States. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine.* 2019; 20 (8): 426–29.
 68. Dietz BW, Nakamura MC, Bell MT, Lane NE. Targeting Nerve Growth Factor for Pain Management in Osteoarthritis-Clinical Efficacy and Safety. *Rheum Dis Clin North Am.* 2021 May;47(2):181-195.
 69. Ding X, Gao X, Wang Z, Jiang X, Lu S, Xu J, Qin G, Gu Z, Huang D. Preoperative Chronic and Acute Pain Affects Postoperative Cognitive Function Mediated by Neurotransmitters. *J Mol Neurosci.* 2021 Mar;71(3):515-526.
 70. Djuretić J, Dimitrijević M, Stojanović M, Stevuljević JK, Hamblin MR, Micov A, Stepanović-Petrović R, Leposavić G. Infrared radiation from cage bedding moderates rat inflammatory and autoimmune responses in collagen-induced arthritis. *Sci Rep.* 2021 Feb 3;11(1):2882.
 71. Donertas-Ayaz B, Caudle RM. Locus coeruleus-noradrenergic modulation of trigeminal pain: Implications for trigeminal neuralgia and psychiatric comorbidities. *Neurobiol Pain.* 2023 Mar 20;13:100124.
 72. Draper-Joyce CJ, Bhola R, Wang J, Bhattarai A, Nguyen ATN, Cowie-Kent I, O'Sullivan K, Chia LY, Venugopal H, Valant C, Thal DM, Wootten D, Panel N, Carlsson J, Christie MJ, White PJ, Scammells P, May LT, Sexton PM, Danev R, Miao Y, Glukhova A, Imlach WL, Christopoulos A. Positive allosteric mechanisms of adenosine A₁ receptor-mediated analgesia. *Nature.* 2021 Sep;597(7877):571-576.
 73. Dremencov E, El Mansari M, Blier P. Effects of sustained serotonin reuptake inhibition on the firing of dopamine neurons in the rat ventral tegmental area. *J Psychiatry Neurosci.* 2009 May;34(3):223-9. PMID: 19448853; PMCID: PMC2674976.
 74. du Jardin KG, Jensen JB, Sanchez C, Pehrson AL. Vortioxetine dose-dependently reverses 5-HT depletion-induced deficits in spatial working and object recognition memory: a potential role for 5-HT_{1A} receptor agonism and 5-HT₃ receptor antagonism. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014 Jan;24(1):160-71.
 75. Du RW, Du RH, Bu WG. β -Arrestin 2 mediates the anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2014 Sep;9(4):582-90.

76. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010 Nov;120(11):3760-72.
77. Dürk T, Panther E, Müller T, Sorichter S, Ferrari D, Pizzirani C, Di Virgilio F, Myrtek D, Norgauer J, Idzko M. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HT₁R subtypes. *Int Immunol*. 2005 May;17(5):599-606.
78. Dussor GO, Helesic G, Hargreaves KM, Flores CM. Cholinergic modulation of nociceptive responses in vivo and neuropeptide release in vitro at the level of the primary sensory neuron. *Pain*. 2004 Jan;107(1-2):22-32.
79. Ebrahimzadeh M, El Mansari M, Blier P. Partial inhibition of catecholamine activity and enhanced responsiveness to NMDA after sustained administration of vortioxetine. *Neuropharmacology*. 2018 Jan;128:425-432.
80. Fagiolini A, Florea I, Loft H, Christensen MC. Effectiveness of Vortioxetine on Emotional Blunting in Patients with Major Depressive Disorder with inadequate response to SSRI/SNRI treatment. *J Affect Disord*. 2021 Mar 15;283:472-479.
81. Feltmann K, Konradsson-Geuken Å, De Bundel D, Lindskog M, Schilström B. Antidepressant drugs specifically inhibiting noradrenaline reuptake enhance recognition memory in rats. *Behav Neurosci*. 2015 Dec;129(6):701-8.
82. Fillingim RB. Individual differences in pain: understanding the mosaic that makes pain personal. *Pain*. 2017 Apr;158 Suppl 1(Suppl 1):S11-S18.
83. Finn DP, Haroutounian S, Hohmann AG, Krane E, Soliman N, Rice ASC. Cannabinoids, the endocannabinoid system, and pain: a review of preclinical studies. *Pain*. 2021 Jul 1;162(Suppl 1):S5-S25.
84. Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS. Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. *Physiol Rev*. 2021 Jan 1;101(1):259-301.
85. Fitzcharles MA, Cohen SP, Clauw DJ, Littlejohn G, Usui C, Häuser W. Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions. *Lancet*. 2021 May 29;397(10289):2098-2110.
86. Fu K, Robbins SR, McDougall JJ. Osteoarthritis: the genesis of pain. *Rheumatology (Oxford)*. 2018 May 1;57(suppl_4):iv43-iv50.
87. Garcia-Larrea L, Peyron R. Pain matrices and neuropathic pain matrices: a review. *Pain*. 2013 Dec;154 Suppl 1:S29-S43.
88. GBD 2021 Diseases and Injuries Collaborators. Global incidence, prevalence, years lived with disability (YLDs), disability-adjusted life-years (DALYs), and healthy life expectancy (HALE) for 371 diseases and injuries in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet*. 2024 May 18;403(10440):2133-2161.
89. GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990-2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Rheumatol*. 2023 Aug 21;5(9):e508-e522.
90. Geraghty T, Winter DR, Miller RJ, Miller RE, Malfait AM. Neuroimmune interactions and osteoarthritis pain: focus on macrophages. *Pain Rep*. 2021 Mar 9;6(1):e892.
91. Gerges SH, El-Kadi AOS. Sexual Dimorphism in the Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Rat Heart, Liver, Kidney, Lung, Brain, and Small Intestine. *Drug Metab Dispos*. 2023 Jan;51(1):81-94.
92. Gerrits MMJG, van Oppen P, van Marwijk HWJ, Penninx BWJH, van der Horst HE. Pain and the onset of depressive and anxiety disorders. *Pain*. 2014 Jan;155(1):53-59.
93. Goadsby PJ, Hoskin KL, Storer RJ, Edvinsson L, Connor HE. Adenosine A1 receptor agonists inhibit trigeminovascular nociceptive transmission. *Brain*. 2002 Jun;125(Pt 6):1392-401.
94. Greco R, Demartini C, Zanaboni AM, Piomelli D, Tassorelli C. Endocannabinoid System and Migraine Pain: An Update. *Front Neurosci*. 2018 Mar 19;12:172.
95. Greco R, Gasperi V, Maccarrone M, Tassorelli C. The endocannabinoid system and migraine. *Exp Neurol*. 2010 Jul;224(1):85-91.

96. Greco R, Mangione AS, Sandrini G, Nappi G, Tassorelli C. Activation of CB2 receptors as a potential therapeutic target for migraine: evaluation in an animal model. *J Headache Pain*. 2014 Mar 17;15(1):14.
97. Gregus AM, Levine IS, Eddinger KA, Yaksh TL, Buczynski MW. Sex differences in neuroimmune and glial mechanisms of pain. *Pain*. 2021 Aug 1;162(8):2186-2200.
98. Guiard BP, El Mansari M, Merali Z, Blier P. Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008 Aug;11(5):625-39.
99. Guida F, Luongo L, Marmo F, Romano R, Iannotta M, Napolitano F, Belardo C, Marabese I, D'Aniello A, De Gregorio D, Rossi F, Piscitelli F, Lattanzi R, de Bartolomeis A, Usiello A, Di Marzo V, de Novellis V, Maione S. Palmitoylethanolamide reduces pain-related behaviors and restores glutamatergic synapses homeostasis in the medial prefrontal cortex of neuropathic mice. *Mol Brain*. 2015 Aug 12;8:47.
100. Guo W, Miyoshi K, Dubner R, Gu M, Li M, Liu J, Yang J, Zou S, Ren K, Noguchi K, Wei F. Spinal 5-HT₃ receptors mediate descending facilitation and contribute to behavioral hypersensitivity via a reciprocal neuron-glial signaling cascade. *Mol Pain*. 2014 Jun 9;10:35.
101. Gupta D, Prabhakar V, Radhakrishnan M. 5HT₃ receptors: Target for new antidepressant drugs. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 May;64:311-25.
102. Gupta D, Radhakrishnan M, Kurhe Y. Effect of a novel 5-HT₃ receptor antagonist 4i, in corticosterone-induced depression-like behavior and oxidative stress in mice. *Steroids*. 2015 Apr;96:95-102.
103. Hadi MA, McHugh GA, Closs SJ. Impact of Chronic Pain on Patients' Quality of Life: A Comparative Mixed-Methods Study. *J Patient Exp*. 2019 Jun;6(2):133-141.
104. Han S, Ren J, Li Z, Wen J, Jiang B, Wei X. Deactivation of dorsal CA1 pyramidal neurons projecting to medial prefrontal cortex contributes to neuropathic pain and short-term memory impairment. *Pain*. 2024 May 1;165(5):1044-1059.
105. Han S, Wang J, Zhang W, Tian X. Chronic Pain-Related Cognitive Deficits: Preclinical Insights into Molecular, Cellular, and Circuit Mechanisms. *Mol Neurobiol*. 2024 Oct;61(10):8123-8143.
106. Han SK, Park JR, Park SA, Chun SW, Lee JC, Lee SY, Ryu PD, Park SJ. Noradrenaline inhibits substantia gelatinosa neurons in mice trigeminal subnucleus caudalis via alpha(2) and beta adrenoceptors. *Neurosci Lett*. 2007 Jan 10;411(2):92-7.
107. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Sep;7(9):759-70.
108. Hayashi Y. Molecular mechanism of hippocampal long-term potentiation - Towards multiscale understanding of learning and memory. *Neurosci Res*. 2022 Feb;175:3-15.
109. Hayashida KI, Obata H. Strategies to Treat Chronic Pain and Strengthen Impaired Descending Noradrenergic Inhibitory System. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 14;20(4):822.
110. Heinricher MM, Fields HL. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon S, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, editors. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6th ed. London: Elsevier; 2013. p. 129–42
111. Hoegh M, Bannister K. Pain Science in Practice (Part 6): *How Does Descending Modulation of Pain Work?*. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2024 Feb;54(2):97-100.
112. Holland N, Robbins TW, Rowe JB. The role of noradrenaline in cognition and cognitive disorders. *Brain*. 2021 Sep 4;144(8):2243-2256.
113. Hone AJ, McIntosh JM. Nicotinic acetylcholine receptors: Therapeutic targets for novel ligands to treat pain and inflammation. *Pharmacol Res*. 2023 Apr;190:106715.
114. Hoover WB, Vertes RP. Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. *J Comp Neurol*. 2011 Dec 15;519(18):3766-801.

115. Huang IC, Chang TS, Chen C, Sung JY. Effect of Vortioxetine on Cognitive Impairment in Patients With Major Depressive Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2022 Dec 12;25(12):969-978.
116. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019 Apr 27;393(10182):1745-1759.
117. Im HJ, Kim JS, Li X, Kotwal N, Sumner DR, van Wijnen AJ, Davis FJ, Yan D, Levine B, Henry JL, Desevré J, Kroin JS. Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum*. 2010 Oct;62(10):2995-3005.
118. Inoue K, Tsuda M. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci*. 2018 Mar;19(3):138-152.
119. Javorac D, Tatović S, Anđelković M, Repić A, Baralić K, Djordjevic AB, Mihajlović M, Stevuljević JK, Đukić-Ćosić D, Čurčić M, Antonijević B, Bulat Z. Low-lead doses induce oxidative damage in cardiac tissue: Subacute toxicity study in Wistar rats and Benchmark dose modelling. *Food Chem Toxicol*. 2022 Mar;161:112825.
120. Jeong SG, Choi IS, Cho JH, Jang IS. Cholinergic modulation of primary afferent glutamatergic transmission in rat medullary dorsal horn neurons. *Neuropharmacology*. 2013 Dec;75:295-303.
121. Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*. 2013 Dec;154 Suppl 1(0 1):S10-S28.
122. Ji RR, Cheng J, Ji J. Neuroimmune Interactions in Pain: Mechanisms and Therapeutics. 2023. p. 1–364.
123. Ji RR, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W. Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology*. 2018 Aug;129(2):343-366.
124. Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 Jul;13(7):533-48.
125. Jiang LX, Huang GD, Su F, Wang H, Zhang C, Yu X. Vortioxetine administration attenuates cognitive and synaptic deficits in 5×FAD mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2020 Apr;237(4):1233-1243.
126. Jones CK, Eastwood BJ, Need AB, Shannon HE. Analgesic effects of serotonergic, noradrenergic or dual reuptake inhibitors in the carrageenan test in rats: evidence for synergism between serotonergic and noradrenergic reuptake inhibition. *Neuropharmacology*. 2006 Dec;51(7-8):1172-80.
127. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Jan;7(1):33-42.
128. Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA*. 2021 Feb 9;325(6):568-578.
129. Kawai Y, Orita S, Nakamura J, Miyamoto S, Suzuki M, Inage K, Hagiwara S, Suzuki T, Nakajima T, Akazawa T, Ohtori S. Changes in proinflammatory cytokines, neuropeptides, and microglia in an animal model of monosodium iodoacetate-induced hip osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2018 Nov;36(11):2978-2986.
130. Kawai Y, Orita S, Nakamura J, Miyamoto S, Suzuki M, Inage K, Hagiwara S, Suzuki T, Nakajima T, Akazawa T, Ohtori S. Analgesic Effect of Duloxetine on an Animal Model of Monosodium Iodoacetate-Induced Hip Osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2020 Feb;38(2):422-430.
131. Kędziora M, Boccella S, Marabese I, Mlost J, Infantino R, Maione S, Starowicz K. Inhibition of anandamide breakdown reduces pain and restores LTP and monoamine levels in the rat hippocampus via the CB₁ receptor following osteoarthritis. *Neuropharmacology*. 2023 Jan 1;222:109304.
132. Keogh E. Sex and gender differences in pain: past, present, and future. *Pain*. 2022 Nov 1;163(Suppl 1):S108-S116.
133. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, Callahan L, Copenhaver C, Dodge C, Felson D, Gellar K, Harvey WF, Hawker G, Herzig E, Kwoh CK, Nelson AE, Samuels J, Scanzello C, White D, Wise B, Altman RD, DiRenzo D, Fontanarosa J, Giradi G, Ishimori M, Misra

- D, Shah AA, Shmagel AK, Thoma LM, Turgunbaev M, Turner AS, Reston J. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2020 Feb;72(2):149-162.
134. Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Stefanovic A, Gojkovic T, Joksic J, Sopic M, Gulan B, Janac J, Milosevic S. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis*. 2015 Jul;241(1):192-8.
135. Kuner R, Kuner T. Cellular Circuits in the Brain and Their Modulation in Acute and Chronic Pain. *Physiol Rev*. 2021 Jan 1;101(1):213-258.
136. Kwilas AJ, Ellis A, Wieseler J, Loram L, Favret J, McFadden A, Springer K, Falci S, Rieger J, Maier SF, Watkins LR. Sustained reversal of central neuropathic pain induced by a single intrathecal injection of adenosine A_{2A} receptor agonists. *Brain Behav Immun*. 2018 Mar;69:470-479.
137. La Porta C, Bura SA, Llorente-Onaindia J, Pastor A, Navarrete F, García-Gutiérrez MS, De la Torre R, Manzanares J, Monfort J, Maldonado R. Role of the endocannabinoid system in the emotional manifestations of osteoarthritis pain. *Pain*. 2015 Oct;156(10):2001-2012.
138. Lane NE, Corr M. Osteoarthritis in 2016: Anti-NGF treatments for pain - two steps forward, one step back? *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Jan 25;13(2):76-78.
139. Laumet G, Ma J, Robison AJ, Kumari S, Heijnen CJ, Kavelaars A. T Cells as an Emerging Target for Chronic Pain Therapy. *Front Mol Neurosci*. 2019 Sep 11;12:216.
140. Levy D, Jakubowski M, Burstein R. Disruption of communication between peripheral and central trigeminovascular neurons mediates the antimigraine action of 5HT 1B/1D receptor agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 23;101(12):4274-9.
141. Liu J, Li R, Zhang T, Xue R, Li T, Li Z, Zhuang X, Wang Q, Chen YA, Dong J, Zhang Y, Wang Y. High-content imaging of human hepatic spheroids for researching the mechanism of duloxetine-induced hepatotoxicity. *Cell Death Dis*. 2022 Aug 1;13(8):669.
142. Liu MG, Chen J. Preclinical research on pain comorbidity with affective disorders and cognitive deficits: Challenges and perspectives. *Prog Neurobiol*. 2014 May;116:13-32.
143. Llorca-Torrallba M, Borges G, Neto F, Mico JA, Berrocoso E. Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation. *Neuroscience*. 2016 Dec 3;338:93-113.
144. Lockwood S, Dickenson AH. What goes up must come down: insights from studies on descending controls acting on spinal pain processing. *J Neural Transm (Vienna)*. 2020 Apr;127(4):541-549.
145. Lockwood SM, Bannister K, Dickenson AH. An investigation into the noradrenergic and serotonergic contributions of diffuse noxious inhibitory controls in a monoiodoacetate model of osteoarthritis. *J Neurophysiol*. 2019 Jan 1;121(1):96-104.
146. Lockwood SM, Lopes DM, McMahon SB, Dickenson AH. Characterisation of peripheral and central components of the rat monoiodoacetate model of Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019 Apr;27(4):712-722.
147. Lu W, Li B, Chen J, Su Y, Dong X, Su X, Gao L. Expression of calcitonin gene-related peptide, adenosine A_{2A} receptor and adenosine A₁ receptor in experiment rat migraine models. *Biomed Rep*. 2016 Mar;4(3):379-383.
148. Lu Y, Xu X, Jiang T, Jin L, Zhao XD, Cheng JH, Jin XJ, Ma J, Piao HN, Piao LX. Sertraline ameliorates inflammation in CUMS mice and inhibits TNF- α -induced inflammation in microglia cells. *Int Immunopharmacol*. 2019 Feb;67:119-128.
149. Luccarini P, Perrier L, Dégoulange C, Gaydier AM, Dallel R. Synergistic antinociceptive effect of amitriptyline and morphine in the rat orofacial formalin test. *Anesthesiology*. 2004 Mar;100(3):690-6.
150. Luongo L, Guida F, Maione S, Jacobson KA, Salvemini D. Adenosine Metabotropic Receptors in Chronic Pain Management. *Front Pharmacol*. 2021 Apr 16;12:651038.
151. Ma H, Cai M, Wang H. Emotional Blunting in Patients With Major Depressive Disorder: A Brief Non-systematic Review of Current Research. *Front Psychiatry*. 2021 Dec 14;12:792960.

152. Ma JJ, Zhang TY, Diao XT, Yao L, Li YX, Suo ZW, Yang X, Hu XD, Liu YN. BDNF modulated KCC2 ubiquitylation in spinal cord dorsal horn of mice. *Eur J Pharmacol*. 2021 Sep 5;906:174205.
153. Mahableshwarkar AR, Zajecka J, Jacobson W, Chen Y, Keefe RS. A Randomized, Placebo-Controlled, Active-Reference, Double-Blind, Flexible-Dose Study of the Efficacy of Vortioxetine on Cognitive Function in Major Depressive Disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2015 Jul;40(8):2025-37.
154. Majeed MH, Sherazi SAA, Bacon D, Bajwa ZH. Pharmacological Treatment of Pain in Osteoarthritis: A Descriptive Review. *Curr Rheumatol Rep*. 2018 Nov 21;20(12):88.
155. Malfait AM, Miller RE, Block JA. Targeting neurotrophic factors: Novel approaches to musculoskeletal pain. *Pharmacol Ther*. 2020 Jul;211:107553.
156. Malfait AM, Miller RE, Miller RJ. Basic Mechanisms of Pain in Osteoarthritis: Experimental Observations and New Perspectives. *Rheum Dis Clin North Am*. 2021 May;47(2):165-180.
157. Malfait AM, Miller RE. Why we should study osteoarthritis pain in experimental models in both sexes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020 Apr;28(4):397-399.
158. Malfait AM, Schnitzer TJ. Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Nov;9(11):654-64.
159. Mapplebeck JCS, Beggs S, Salter MW. Sex differences in pain: a tale of two immune cells. *Pain*. 2016 Feb;157 Suppl 1:S2-S6.
160. Mapplebeck JCS, Dalgarno R, Tu Y, Moriarty O, Beggs S, Kwok CHT, Halievski K, Assi S, Mogil JS, Trang T, Salter MW. Microglial P2X4R-evoked pain hypersensitivity is sexually dimorphic in rats. *Pain*. 2018 Sep;159(9):1752-1763.
161. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, Goldring SR, Jones G, Teichtahl AJ, Pelletier JP. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Oct 13;2:16072.
162. Mary M. Heinricher and Howard L. Fields. Central Nervous System Mechanisms of Pain Modulation In: McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013:129-142.
163. Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*. 2017 Feb 2;19(1):18.
164. McCabe C, Mishor Z, Cowen PJ, Harmer CJ. Diminished neural processing of aversive and rewarding stimuli during selective serotonin reuptake inhibitor treatment. *Biol Psychiatry*. 2010 Mar 1;67(5):439-45.
165. McCarberg B, Peppin J. Pain Pathways and Nervous System Plasticity: Learning and Memory in Pain. *Pain Med*. 2019 Dec 1;20(12):2421-2437.
166. Micov AM, Tomić MA, Todorović MB, Vuković MJ, Pecikoza UB, Jasnic NI, Djordjevic JD, Stepanović-Petrović RM. Vortioxetine reduces pain hypersensitivity and associated depression-like behavior in mice with oxaliplatin-induced neuropathy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2020 Dec 20;103:109975.
167. Milić M, Timić T, Joksimović S, Biawat P, Rallapalli S, Divljaković J, Radulović T, Cook JM, Savić MM. PWZ-029, an inverse agonist selective for α s GABAA receptors, improves object recognition, but not water-maze memory in normal and scopolamine-treated rats. *Behav Brain Res*. 2013 Mar 15;241:206-13.
168. Miller RE, Miller RJ, Malfait AM. Osteoarthritis joint pain: the cytokine connection. *Cytokine*. 2014 Dec;70(2):185-93.
169. Miller RE, Tran PB, Ishihara S, Syx D, Ren D, Miller RJ, Valdes AM, Malfait AM. Microarray analyses of the dorsal root ganglia support a role for innate neuro-immune pathways in persistent pain in experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020 May;28(5):581-592.
170. Miller RJ, Malfait AM, Miller RE. The innate immune response as a mediator of osteoarthritis pain. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020 May;28(5):562-571.

171. Minamiyama Y, Takemura S, Akiyama T, Imaoka S, Inoue M, Funae Y, Okada S. Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels. *FEBS Lett.* 1999 Jun 11;452(3):165-9.
172. Mogil JS, Parisien M, Esfahani SJ, Diatchenko L. Sex differences in mechanisms of pain hypersensitivity. *Neurosci Biobehav Rev.* 2024 Aug;163:105749.
173. Mogil JS. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nat Rev Neurosci.* 2020 Jul;21(7):353-365.
174. Mørk A, Montezinho LP, Miller S, Trippodi-Murphy C, Plath N, Li Y, Gulinello M, Sanchez C. Vortioxetine (Lu AA21004), a novel multimodal antidepressant, enhances memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013 Apr;105:41-50.
175. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol.* 2003;225:115-21.
176. Motzkin JC, Basbaum AI, Crowther AJ. Neuroanatomy of the nociceptive system: From nociceptors to brain networks. *Int Rev Neurobiol.* 2024;179:1-39.
177. Murthy SE, Loud MC, Daou I, Marshall KL, Schwaller F, Kühnemund J, Francisco AG, Keenan WT, Dubin AE, Lewin GR, Patapoutian A. The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice. *Sci Transl Med.* 2018 Oct 10;10(462):eaat9897.
178. Muscatello MRA, Zoccali RA, Pandolfo G, Mangano P, Lorusso S, Cedro C, Battaglia F, Spina E, Bruno A. Duloxetine in Psychiatric Disorders: Expansions Beyond Major Depression and Generalized Anxiety Disorder. *Front Psychiatry.* 2019 Oct 25;10:772.
179. Mutso AA, Radzicki D, Baliki MN, Huang L, Banisadr G, Centeno MV, Radulovic J, Martina M, Miller RJ, Apkarian AV. Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *J Neurosci.* 2012 Apr 25;32(17):5747-56.
180. Nag S, Mokha SS. Activation of the trigeminal $\alpha 2$ -adrenoceptor produces sex-specific, estrogen dependent thermal antinociception and antihyperalgesia using an operant pain assay in the rat. *Behav Brain Res.* 2016 Nov 1;314:152-8.
181. Nagata K, Imai T, Yamashita T, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain.* 2009 Apr 23;5:20.
182. Nalepa I, Vetulani J, Borghi V, Kowalska M, Przewlocka B, Roman A, Pavone F. Changes induced by formalin pain in central $\alpha 1$ -adrenoceptor density are modulated by adenosine receptor agonists. *J Neural Transm (Vienna).* 2010 May;117(5):549-58.
183. Naser PV, Kuner R. Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain. *Neuroscience.* 2018 Sep 1;387:135-148.
184. Navratilova E, Porreca F. Reward and motivation in pain and pain relief. *Nat Neurosci.* 2014 Oct;17(10):1304-12.
185. Naylor B, Hesam-Shariati N, McAuley JH, Boag S, Newton-John T, Rae CD, Gustin SM. Reduced Glutamate in the Medial Prefrontal Cortex Is Associated With Emotional and Cognitive Dysregulation in People With Chronic Pain. *Front Neurol.* 2019 Dec 3;10:1110.
186. Negrete R, García Gutiérrez MS, Manzanares J, Maldonado R. Involvement of the dynorphin/KOR system on the nociceptive, emotional and cognitive manifestations of joint pain in mice. *Neuropharmacology.* 2017 Apr;116:315-327.
187. Nicholas M, Vlaeyen JWS, Rief W, Barke A, Aziz Q, Benoliel R, Cohen M, Evers S, Giamberardino MA, Goebel A, Korwisi B, Perrot S, Svensson P, Wang SJ, Treede RD; IASP Taskforce for the Classification of Chronic Pain. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. *Pain.* 2019 Jan;160(1):28-37.
188. Nicholas MK. The biopsychosocial model of pain 40 years on: time for a reappraisal? *Pain.* 2022 Nov 1;163(Suppl 1):S3-S14.
189. Nicolodi M, Galeotti N, Ghelardini C, Bartolini A, Sicuteri F. Central cholinergic challenging of migraine by testing second-generation anticholinesterase drugs. *Headache.* 2002 Jul-Aug;42(7):596-602.

190. Nir RR, Yarnitsky D. Conditioned pain modulation. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2015 Jun;9(2):131-7.
191. Ogbonna AC, Clark AK, Gentry C, Hobbs C, Malcangio M. Pain-like behaviour and spinal changes in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis in C57Bl/6 mice. *Eur J Pain*. 2013 Apr;17(4):514-26.
192. O'Neill TW, Felson DT. Mechanisms of Osteoarthritis (OA) Pain. *Curr Osteoporos Rep*. 2018 Oct;16(5):611-616.
193. Orita S, Ishikawa T, Miyagi M, Ochiai N, Inoue G, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Toyone T, Aoki Y, Kubo T, Takahashi K, Ohtori S. Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011 Jun 16;12:134.
194. Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014 Jun;8(2):143-51.
195. Palazzo E, Luongo L, Novellis V, Rossi F, Maione S. The Role of Cannabinoid Receptors in the Descending Modulation of Pain. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010 Aug 16;3(8):2661-2673.
196. Pan TT, Pan F, Gao W, Hu SS, Wang D. Involvement of Macrophages and Spinal Microglia in Osteoarthritis Pain. *Curr Rheumatol Rep*. 2021 Apr 24;23(5):29.
197. Park K, Kim S, Ko YJ, Park BJ. Duloxetine and cardiovascular adverse events: A systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Res*. 2020 May;124:109-114.
198. Pecchi E, Priam S, Gosset M, Pigenet A, Sudre L, Laiguillon MC, Berenbaum F, Houard X. Induction of nerve growth factor expression and release by mechanical and inflammatory stimuli in chondrocytes: possible involvement in osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther*. 2014 Jan 20;16(1):R16.
199. Pecikoza UB, Tomić MA, Micov AM, Stepanović-Petrović RM. Metformin Synergizes With Conventional and Adjuvant Analgesic Drugs to Reduce Inflammatory Hyperalgesia in Rats. *Anesth Analg*. 2017 Apr;124(4):1317-1329.
200. Pehrson AL, Cremers T, Bétry C, van der Hart MG, Jørgensen L, Madsen M, Haddjeri N, Ebert B, Sanchez C. Lu AA21004, a novel multimodal antidepressant, produces regionally selective increases of multiple neurotransmitters--a rat microdialysis and electrophysiology study. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2013 Feb;23(2):133-45.
201. Pehrson AL, Hillhouse TM, Haddjeri N, Rovera R, Porter JH, Mørk A, Smagin G, Song D, Budac D, Cajina M, Sanchez C. Task- and Treatment Length-Dependent Effects of Vortioxetine on Scopolamine-Induced Cognitive Dysfunction and Hippocampal Extracellular Acetylcholine in Rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016 Sep;358(3):472-82.
202. Pehrson AL, Pedersen CS, Tølbøl KS, Sanchez C. Vortioxetine Treatment Reverses Subchronic PCP Treatment-Induced Cognitive Impairments: A Potential Role for Serotonin Receptor-Mediated Regulation of GABA Neurotransmission. *Front Pharmacol*. 2018 Mar 6;9:162.
203. Pehrson AL, Sanchez C. Serotonergic modulation of glutamate neurotransmission as a strategy for treating depression and cognitive dysfunction. *CNS Spectr*. 2014 Apr;19(2):121-33.
204. Persson MSM, Sarmanova A, Doherty M, Zhang W. Conventional and biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs for osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Rheumatology (Oxford)*. 2018 Oct 1;57(10):1830-1837.
205. Phelps CE, Navratilova E, Porreca F. Chronic Pain Produces Reversible Memory Deficits That Depend on Task Difficulty in Rats. *J Pain*. 2021a Nov;22(11):1467-1476.
206. Phelps CE, Navratilova E, Porreca F. Cognition in the Chronic Pain Experience: Preclinical Insights. *Trends Cogn Sci*. 2021b May;25(5):365-376.
207. Price J, Cole V, Goodwin GM. Emotional side-effects of selective serotonin reuptake inhibitors: qualitative study. *Br J Psychiatry*. 2009 Sep;195(3):211-7.

208. Rahman W, Bauer CS, Bannister K, Vonsy JL, Dolphin AC, Dickenson AH. Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. *Mol Pain*. 2009 Aug 7;5:45.
209. Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020 Sep 1;161(9):1976-1982.
210. Raoof R, Martin Gil C, Lafeber FPJG, de Visser H, Prado J, Versteeg S, Pascha MN, Heinemans ALP, Adolfs Y, Pasterkamp J, Wood JN, Mastbergen SC, Eijkelkamp N. Dorsal Root Ganglia Macrophages Maintain Osteoarthritis Pain. *J Neurosci*. 2021 Sep 29;41(39):8249-8261.
211. Raoof R, Willemen HLD, Eijkelkamp N. Divergent roles of immune cells and their mediators in pain. *Rheumatology (Oxford)*. 2018 Mar 1;57(3):429-440.
212. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008 Mar;22(3):659-61.
213. Richard MJ, Driban JB, McAlindon TE. Pharmaceutical treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2023 Apr;31(4):458-466.
214. Riga M. S., Sanchez C., Celada P., Artigas F. (2016). Involvement of 5-HT₃ receptors in the action of vortioxetine in rat brain: focus on glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neuropharmacology* 108 73–81. 10.1016/j.neuropharm.2016.04.023
215. Riga MS, Sanchez C, Celada P, Artigas F. Sub-chronic vortioxetine (but not escitalopram) normalizes brain rhythm alterations and memory deficits induced by serotonin depletion in rats. *Neuropharmacology*. 2020 Nov 1;178:108238.
216. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, Sokolove J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Oct;12(10):580-92.
217. Rosa-Casillas M, Basbaum AI. Rostral ventral medulla circuits regulate both the sensory and affective dimensions of neuropathic pain: a commentary on Dogrul et al. *Pain*. 2025 Jan 1;166(1):7-8.
218. Rosen S, Ham B, Mogil JS. Sex differences in neuroimmunity and pain. *J Neurosci Res*. 2017 Jan 2;95(1-2):500-508. Mapplebeck JCS, Beggs S, Salter MW. Sex differences in pain: a tale of two immune cells. *Pain*. 2016 Feb;157 Suppl 1:S2-S6.
219. Rutten K, Schiene K, Robens A, Leipelt A, Pasqualon T, Read SJ, Christoph T. Burrowing as a non-reflex behavioural readout for analgesic action in a rat model of sub-chronic knee joint inflammation. *Eur J Pain*. 2014 Feb;18(2):204-12.
220. Sagar DR, Burston JJ, Hathway GJ, Woodhams SG, Pearson RG, Bennett AJ, Kendall DA, Scammell BE, Chapman V. The contribution of spinal glial cells to chronic pain behaviour in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritic pain. *Mol Pain*. 2011 Nov 17;7:88.
221. Salat K, Furgala-Wojas A. Serotonergic Neurotransmission System Modulator, Vortioxetine, and Dopaminergic D₂/D₃ Receptor Agonist, Ropinirole, Attenuate Fibromyalgia-Like Symptoms in Mice. *Molecules*. 2021 Apr 20;26(8):2398.
222. Sanchez C, Asin KE, Artigas F. Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: review of preclinical and clinical data. *Pharmacol Ther*. 2015 Jan;145:43-57.
223. Sawynok J, Liu XJ. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol*. 2003a Apr;69(5):313-40.
224. Sawynok J, Liu XJ. The Formalin Test: Characteristics and Usefulness of the Model. *Reviews in Analgesia*. 2003b;7(2):145-63.
225. Sawynok J. Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience*. 2016 Dec 3;338:1-18.
226. Schieker M, Conaghan PG, Mindeholm L, Praetgaard J, Solomon DH, Scotti C, Gram H, Thuren T, Roubenoff R, Ridker PM. Effects of Interleukin-1 β Inhibition on Incident Hip and Knee

- Replacement : Exploratory Analyses From a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann Intern Med.* 2020 Oct 6;173(7):509-515.
227. Schmelz M, Mantyh P, Malfait AM, Farrar J, Yaksh T, Tive L, Viktrup L. Nerve growth factor antibody for the treatment of osteoarthritis pain and chronic low-back pain: mechanism of action in the context of efficacy and safety. *Pain.* 2019 Oct;160(10):2210-2220.
 228. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013 Jun;4(6):624-30. PMID: 23930179; PMCID: PMC3733029.
 229. Sharma S, Bhattarai S, Ara H, Sun G, St Clair DK, Bhuiyan MS, Kevil C, Watts MN, Dominic P, Shimizu T, McCarthy KJ, Sun H, Panchatcharam M, Miriyala S. SOD2 deficiency in cardiomyocytes defines defective mitochondrial bioenergetics as a cause of lethal dilated cardiomyopathy. *Redox Biol.* 2020 Oct;37:101740.
 230. Singh VP, Jain NK, Kulkarni SK. On the antinociceptive effect of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor. *Brain Res.* 2001 Oct 12;915(2):218-26.
 231. Sirucek L, Ganley RP, Zeilhofer HU, Schweinhardt P. Diffuse noxious inhibitory controls and conditioned pain modulation: a shared neurobiology within the descending pain inhibitory system? *Pain.* 2023 Mar 1;164(3):463-468.
 232. Sorge RE, Mapplebeck JC, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander JK, Martin LJ, Austin JS, Sotocinal SG, Chen D, Yang M, Shi XQ, Huang H, Pilon NJ, Bilan PJ, Tu Y, Klip A, Ji RR, Zhang J, Salter MW, Mogil JS. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci.* 2015 Aug;18(8):1081-3.
 233. Sorge RE, Totsch SK. Sex Differences in Pain. *J Neurosci Res.* 2017 Jun;95(6):1271-1281.
 234. Stahl SM. Modes and nodes explain the mechanism of action of vortioxetine, a multimodal agent (MMA): blocking 5HT₃ receptors enhances release of serotonin, norepinephrine, and acetylcholine. *CNS Spectr.* 2015a Oct;20(5):455-9.
 235. Stahl SM. Modes and nodes explain the mechanism of action of vortioxetine, a multimodal agent (MMA): actions at serotonin receptors may enhance downstream release of four pro-cognitive neurotransmitters. *CNS Spectr.* 2015b Dec;20(6):515-9.
 236. Stahl SM. Modes and nodes explain the mechanism of action of vortioxetine, a multimodal agent (MMA): modifying serotonin's downstream effects on glutamate and GABA (gamma amino butyric acid) release. *CNS Spectr.* 2015c Aug;20(4):331-6.
 237. Stahl SM. Modes and nodes explain the mechanism of action of vortioxetine, a multimodal agent (MMA): enhancing serotonin release by combining serotonin (5HT) transporter inhibition with actions at 5HT receptors (5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT₇ receptors). *CNS Spectr.* 2015d Apr;20(2):93-7.
 238. Stepanovic-Petrovic RM, Micov AM, Tomic MA, Kovacevic JM, Boškovic BD. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. *Anesthesiology.* 2014 Mar;120(3):737-50.
 239. Sullere S, Kunczt A, McGehee DS. A cholinergic circuit that relieves pain despite opioid tolerance. *Neuron.* 2023 Nov 1;111(21):3414-3434.e15.
 240. Takano S, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Fujimaki H, Aikawa J, Iwase D, Minatani A, Iwabuchi K, Takaso M. Nerve Growth Factor Regulation by TNF- α and IL-1 β in Synovial Macrophages and Fibroblasts in Osteoarthritic Mice. *J Immunol Res.* 2016;2016:5706359.
 241. Tallarida RJ, Murray RB. Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs. New York: Springer Verlag, 1986.
 242. Tallarida RJ. Drug Synergism and Dose-effect Data Analysis. 1st ed. Boca Raton, USA: Chapman & Hall/CRC; 2000.
 243. Talmon M, Rossi S, Pastore A, Cattaneo CI, Brunelleschi S, Fresu LG. Vortioxetine exerts anti-inflammatory and immunomodulatory effects on human monocytes/macrophages. *Br J Pharmacol.* 2018 Jan;175(1):113-124.

244. Tang S, Zhang C, Oo WM, Fu K, Risberg MA, Bierma-Zeinstra SM, Neogi T, Atukorala I, Malfait AM, Ding C, Hunter DJ. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2025 Feb 13;11(1):10.
245. Tanga, F. Y., Raghavendra, V., & DeLeo, J. A. (2004). Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochemistry international*, 45(2-3), 397–407.
246. Tawfik MK, Helmy SA, Badran DI, Zaitone SA. Neuroprotective effect of duloxetine in a mouse model of diabetic neuropathy: Role of glia suppressing mechanisms. *Life Sci*. 2018 Jul 15;205:113-124.
247. Teichtahl AJ, Cicuttini FM. Editorial: Pain Relief in Osteoarthritis: The Potential for a Perfect Storm. *Arthritis Rheumatol*. 2016 Feb;68(2):270-3.
248. Thakur M, Rahman W, Hobbs C, Dickenson AH, Bennett DL. Characterisation of a peripheral neuropathic component of the rat monoiodoacetate model of osteoarthritis. *PLoS One*. 2012;7(3):e33730.
249. Thum T, Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet*. 2000 Mar 18;355(9208):979-83.
250. Tilleux S, Berger J, Hermans E. Induction of astrogliosis by activated microglia is associated with a down-regulation of metabotropic glutamate receptor 5. *J Neuroimmunol*. 2007 Sep;189(1-2):23-30.
251. Toma W, Ulker E, Alqasem M, AlSharari SD, McIntosh JM, Damaj MI. Behavioral and Molecular Basis of Cholinergic Modulation of Pain: Focus on Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Top Behav Neurosci*. 2020;45:153-166.
252. Tomić MA, Pecikoza UB, Micov AM, Popović BV, Stepanović-Petrović RM. The effects of levetiracetam, sumatriptan, and caffeine in a rat model of trigeminal pain: interactions in 2-component combinations. *Anesth Analg*. 2015 Jun;120(6):1385-93.
253. Tomlinson RE, Li Z, Li Z, Minichiello L, Riddle RC, Venkatesan A, Clemens TL. NGF-TrkA signaling in sensory nerves is required for skeletal adaptation to mechanical loads in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 May 2;114(18):E3632-E3641.
254. Tower J, Pomatto LCD, Davies KJA. Sex differences in the response to oxidative and proteolytic stress. *Redox Biol*. 2020 Apr;31:101488.
255. Tracey I, Mantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*. 2007 Aug 2;55(3):377-91.
256. Tran PB, Miller RE, Ishihara S, Miller RJ, Malfait AM. Spinal microglial activation in a murine surgical model of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017 May;25(5):718-726.
257. Trang T, Beggs S, Wan X, Salter MW. P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurosci*. 2009 Mar 18;29(11):3518-28.
258. Turan Yücel N, Kandemir Ü, Demir Özkay Ü, Can ÖD. 5-HT_{1A} Serotonergic, α -Adrenergic and Opioidergic Receptors Mediate the Analgesic Efficacy of Vortioxetine in Mice. *Molecules*. 2021 May 28;26(11):3242.
259. Turan Yücel N, Kandemir Ü, Üçel Uİ, Demir Özkay Ü, Can ÖD. Catecholaminergic and Cholinergic Systems Mediate Beneficial Effect of Vortioxetine on Diabetes-Induced Neuropathic Pain. *Biomedicines*. 2023 Apr 10;11(4):1137.
260. Tyrtysnaia A, Bondar A, Konovalova S, Manzhulo I. Synaptamide Improves Cognitive Functions and Neuronal Plasticity in Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 26;22(23):12779.
261. Umana IC, Daniele CA, Miller BA, Abburi C, Gallagher K, Brown MA, Mason P, McGehee DS. Nicotinic modulation of descending pain control circuitry. *Pain*. 2017 Oct;158(10):1938-1950.
262. van den Hoogen NJ, Harding EK, Davidson CED, Trang T. Cannabinoids in Chronic Pain: Therapeutic Potential Through Microglia Modulation. *Front Neural Circuits*. 2022 Jan 7;15:816747.

263. Veronesi F, Contartese D, Borsari V, Pagani S, Fini M, De Mattei M, Tschon M. Ageing and Osteoarthritis Synergically Affect Human Synovocyte Cells: An In Vitro Study on Sex Differences. *J Clin Med*. 2022 Nov 30;11(23):7125.
264. Walstab J, Rappold G, Niesler B. 5-HT(3) receptors: role in disease and target of drugs. *Pharmacol Ther*. 2010 Oct;128(1):146-69.
265. Wang H, Xie YF, Chiang CY, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Central α -adrenoceptors contribute to mustard oil-induced central sensitization in the rat medullary dorsal horn. *Neuroscience*. 2013 Apr 16;236:244-52.
266. Wang XQ, Zhong XL, Li ZB, Wang HT, Zhang J, Li F, Zhang JY, Dai RP, Xin-Fu Z, Li CQ, Li ZY, Bi FF. Differential roles of hippocampal glutamatergic receptors in neuropathic anxiety-like behavior after partial sciatic nerve ligation in rats. *BMC Neurosci*. 2015 Mar 14;16:14.
267. Weber M, Talmon S, Schulze I, Boeddinghaus C, Gross G, Schoemaker H, Wicke KM. Running wheel activity is sensitive to acute treatment with selective inhibitors for either serotonin or norepinephrine reuptake. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009 May;203(4):753-62.
268. Wise BL, Seidel MF, Lane NE. The evolution of nerve growth factor inhibition in clinical medicine. *Nat Rev Rheumatol*. 2021 Jan;17(1):34-46.
269. Wodarski R, Delaney A, Ultenius C, Morland R, Andrews N, Baastrup C, Bryden LA, Caspani O, Christoph T, Gardiner NJ, Huang W, Kennedy JD, Koyama S, Li D, Ligocki M, Lindsten A, Machin I, Pekcec A, Robens A, Rotariu SM, Vo S, Segerdahl M, Stenfors C, Svensson CI, Treede RD, Uto K, Yamamoto K, Rutten K, Rice AS. Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study. *Pain*. 2016 Oct;157(10):2350-65.
270. Woller SA, Eddinger KA, Corr M, Yaksh TL. An overview of pathways encoding nociception. *Clin Exp Rheumatol*. 2017 Sep-Oct;35 Suppl 107(5):40-46. Epub 2017 Sep 29. PMID: 28967373; PMCID: PMC6636838.
271. Wood MJ, Miller RE, Malfait AM. The Genesis of Pain in Osteoarthritis: Inflammation as a Mediator of Osteoarthritis Pain. *Clin Geriatr Med*. 2022 May;38(2):221-238.
272. Xiong B, Zhang W, Zhang L, Huang X, Zhou W, Zou Q, Manyande A, Wang J, Tian Y, Tian X. Hippocampal glutamatergic synapses impairment mediated novel-object recognition dysfunction in rats with neuropathic pain. *Pain*. 2020 Aug;161(8):1824-1836.
273. Yamada EF, Salgueiro AF, Goulart ADS, Mendes VP, Anjos BL, Folmer V, da Silva MD. Evaluation of monosodium iodoacetate dosage to induce knee osteoarthritis: Relation with oxidative stress and pain. *Int J Rheum Dis*. 2019 Mar;22(3):399-410.
274. Yamashita T, Yamamoto S, Zhang J, Kometani M, Tomiyama D, Kohno K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Tsuda M. Duloxetine Inhibits Microglial P2X4 Receptor Function and Alleviates Neuropathic Pain after Peripheral Nerve Injury. *PLoS One*. 2016 Oct 21;11(10):e0165189.
275. Yang JX, Wang HF, Chen JZ, Li HY, Hu JC, Yu AA, Wen JJ, Chen SJ, Lai WD, Wang S, Jin Y, Yu J. Potential Neuroimmune Interaction in Chronic Pain: A Review on Immune Cells in Peripheral and Central Sensitization. *Front Pain Res (Lausanne)*. 2022 Jul 4;3:946846.
276. Yao Q, Wu X, Tao C, Gong W, Chen M, Qu M, Zhong Y, He T, Chen S, Xiao G. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Feb 3;8(1):56.
277. Yin J, Albert RH, Tretiakova AP, Jameson BA. 5-HT(1B) receptors play a prominent role in the proliferation of T-lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 2006 Dec;181(1-2):68-81.
278. Yoneda S, Kasai E, Matsuo M, Tamano R, Sakurai Y, Asaki T, Fujita M. Duloxetine ameliorates the impairment of diffuse noxious inhibitory control in rat models of peripheral neuropathic pain and knee osteoarthritis pain. *Neurosci Lett*. 2020 Jun 11;729:134990.

279. Yoon SY, Kang SY, Kim HW, Kim HC, Roh DH. Clonidine Reduces Nociceptive Responses in Mouse Orofacial Formalin Model: Potentiation by Sigma-1 Receptor Antagonist BD1047 without Impaired Motor Coordination. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(9):1320-7.
280. Yousofizadeh S, Tamaddonfard E, Farshid AA. The role of nicotinic acetylcholine and opioid systems of the ventral orbital cortex in modulation of formalin-induced orofacial pain in rats. *Eur J Pharmacol.* 2015 Jul 5;758:147-52.
281. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol.* 2020 Jun 15;877:173090.
282. Zhang RX, Ren K, Dubner R. Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Sep;21(9):1308-15.
283. Zhang TT, Xue R, Fan SY, Fan QY, An L, Li J, Zhu L, Ran YH, Zhang LM, Zhong BH, Li YF, Ye CY, Zhang YZ. Ammoxetine attenuates diabetic neuropathic pain through inhibiting microglial activation and neuroinflammation in the spinal cord. *J Neuroinflammation.* 2018 Jun 7;15(1):176.
284. Zuenä AR, Maftai D, Alemà GS, Dal Moro F, Lattanzi R, Casolini P, Nicoletti F. Multimodal antidepressant vortioxetine causes analgesia in a mouse model of chronic neuropathic pain. *Mol Pain.* 2018 Jan-Dec;14:1744806918808987.
285. Zychowska M, Rojewska E, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. The influence of microglia activation on the efficacy of amitriptyline, doxepin, milnacipran, venlafaxine and fluoxetine in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2015 Feb 15;749:115-23.
286. Zylka MJ. Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. *Trends Mol Med.* 2011 Apr;17(4):188-96.

Biografija

Katarina Nastić je rođena 27.02.1995. godine u Kruševcu. Farmaceutski fakultet, Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2014/15. godine i diplomirala 2019. godine sa prosečnom ocenom 9,41. Tokom studiranja bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i Fonda za mlade talente Republike Srbije - Dositeja.

Doktorske akademske studije (modul Farmakologija) na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je školske 2019/2020. godine. Specijalističke akademske studije (studijski program Farmakoterapija u farmaceutskoj praksi) završila je 2022. godine. U oktobru 2019. godine se zaposlila kao istraživač-pripravnik na Katedri za farmakologiju na istom fakultetu. Od oktobra 2020. godine je zaposlena kao saradnik u nastavi, a u novembru 2021. izabrana je u zvanje asistenta.

Katarina Nastić učestvuje u pripremi i izvođenju praktične nastave iz obaveznih predmeta Farmakologija 1, Farmakologija 2 i Farmakoterapija, kao i iz izbornog predmeta Farmakoterapija u pedijatriji. Dodatno, učestvuje u pripremi i izvođenju radionica u okviru akademske specijalizacije Farmakoterapija u farmaceutskoj praksi. Član je Komisije za praćenje i unapređenje kvaliteta poslediplomske nastave.

Od 2020. godine je angažovana u sklopu institucionalnog finansiranja naučnoistraživačkog rada na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Od januara 2022. do decembra 2024. godine bila je angažovana kao istraživač na projektu u okviru Programa IDEJE, Fonda za nauku Republike Srbije pod nazivom: „*Multimodal control of chronic pain and comorbidities with atypical analgesics – “two birds with one stone”*”. Oblast istraživanja Katarine Nastić je farmakologija bola. Član je Međunarodnog udruženja za proučavanje bola (IASP) i Društva za Neuronauku Srbije (DNS). Do sada je kao ko-autor publikovala 5 radova u međunarodnim časopisima, 1 rad u nacionalnom časopisu i 8 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima. Takođe, bila je učesnik letnje škole u organizaciji Evropske federacije za proučavanje bola u Krakovu, *EFIC Pain School on Translational Pain Research* (Krakov, jun 2024.).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора КАТАРИНА НАСТИЋ

Број индекса 19/19

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ВОРТИОКСЕТИН У ИНФЛАМАТОРНИМ МОДЕЛИМА
БОЛА: МЕХАНИЗАМ ДЕЈСТВА, УТИЦАЈ НА КОГНИТИВНЕ
СПОСОБНОСТИ И ОКСИДО-РЕДУКЦИОНИ СТАТУС
КАРДИОМИОЦИТА

- 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, 4. 7. 2025.

К. Настић

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора КАТАРИНА НАСТИЋ

Број индекса 19119

Студијски програм ДАС - ФАРМАКОЛОГИЈА

Наслов рада ВОРТИОКСЕТИН У ИНФРАКТОРНИМ МОДЕЛИМА БОКА: МЕХАНИЗМ ДЕЈСТВА, УТИЦАЈ НА КОГНИТИВНЕ СПОСОБНОСТИ И ОКСИДАТИВНО-РЕАКЦИОНИ СТАТУС КАРДИОМИОЦИТА

Ментор ПРОФ. ДР РАДИЦА СТЕПАНОВИЋ-ПЕТРОВИЋ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена 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, 4. 7. 2025.

К. Настич

Изјава о коришћењу

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

Вортиоксетин у информаторним моделама
БОЛА: МЕХАНИЗАМ ДЕЈСТВА УТИЦАЈ НА КОГНИТИВНЕ
СПОСОБНОСТИ И ОКСИДО-РЕДУКЦИОНИ СТАТУС КАРДИОМИОЦИТА
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, 4. 7. 2025.

JKasmita

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.