

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Dragana P. Srebro

Farmakodinamska ispitivanja magnezijum-
sulfata i dizocilpina u modelima somatskog
i visceralnog bola kod pacova

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2015. godina

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Dragana P. Srebro

Pharmacodynamic evaluation of
magnesium sulfate and dizocilpine in
models of somatic and visceral pain in rats

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTOR:

Prof. dr Sonja Vučković,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu,

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Milica Prostran,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu,
predsednik komisije

Prof. dr Radan Stojanović,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu,

Prof. dr Slobodan Janković,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

Datum i mesto odbrane: _____

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Milici Prostran na podršci i savetima. U okviru projekta (br. 175023) čiji je ona rukovodilac realizovana je ova disertacija.

Posebno se zahvaljujem svom mentoru prof. dr Sonji Vučković koja je nesebično podelila svoje znanje sa mnom i uvela me u svet nauke. Takođe, i na izuzetno prijatnoj saradnji.

Posebnu zahvalnost dugujem porodici i prijateljima koji su bili uz mene sve vreme i pružili mi veliku podršku.

Mojim roditeljima i bratu posvećujem ovaj rad sa velikom zahvalnošću i ljubavlju.

Dragana Srebro

Farmakodinamska ispitivanja magnezijum-sulfata i dizocilpina u modelima somatskog i visceralnog bola kod pacova

SAŽETAK

Uvod: Magnezijum je mineral koji u organizmu ima brojne uloge. On je kofaktor u više od 300 enzimskih reakcija, održava membranski potencijal, ima modulatorno dejstvo na jonske kanale, neurotransmisiju, i drugo. Magnezijum je i endogeni nekompetitivni voltažno-zavisni blokator jonskog kanala *N*-metil-D-aspartat (NMDA) receptora. Njegovo uklanjanje iz jonskog kanala NMDA receptora je prvi korak u aktivaciji ovog receptora. Dizocilpin (MK-801) je nekompetitivni antagonist NMDA receptora. Dizocilpin se koristi za istraživanja u neurofarmakologiji. Aktivacija NMDA receptora ima važnu ulogu u nastanku i održavanju inflamatornog bola. Ova aktivacija vodi ka povećanoj sintezi azot oksida (NO), signalnog molekula sa dvostrukim dejstvom na bol. Za nastanak bola su bitni i drugi receptori, kao što su kanali za prolazne receptorske potencijale (TRP), kanali osetljivi na nizak pH (ASIC) i dr. Poznato je da magnezijum i dizocilpin smanjuju neuropatski bol i povećavaju analgetički efekt opioda, lokalnih i opštih anestetika.

Cilj ispitivanja: Cilj ove teze bio je da ispita da li magnezijum-sulfat i dizocilpin imaju analgetički i antiedematozni efekt u somatskom i visceralnom inflamatornom modelu bola kod pacova i da li i i kakvu ulogu NO ima u mehanizmu njihovog dejstva.

Metode: Ispitivanja su sprovedena na mužjacima pacova Wistar soja. Kao model somatskog inflamatornog bola korišćena je karageninom izazvana hiperalgezija i edem šape pacova. Mehanička hiperalgezija merena je elektronskim von Fray analgeziometrom. Edem šape meren je pletizmometrom, aparatom koji meri volumen istisnute tečnosti nakon potapanja šape. Kao model visceralnog inflamatornog modela korišćen je test grčeva kod pacova. Uloga NO-a u mehanizmu antinociceptivnog i antiedematoznog dejstva magnezijum-sulfata/dizocilpina ispitana je korišćenjem inhibitora NO sintaze (NOS).

Rezultati: U somatskom inflamatornom modelu bola sistemski primenjen magnezijum-sulfat smanjuje hiperalgeziju i edem na dozno-nezavisan način. Efikasniji je u manjim (5 mg/kg, s.c.), nego u većim dozama (15 i 30 mg/kg, s.c.). Analgetički efekt nije

prisutan nakon lokalne periferne primene, za razliku od antiedematoznog efekta koji je prisutan nakon oba načina primene. Magnezijum-sulfat primenjen sistemski ima i preventivno (dat kao pretretman) i terapijsko (dat kao tretman) dejstvo na bol i otok koji nastaju usled inflamacije. Dizocilpin ispoljava dozno-zavisno antihiperlgezijsko dejstvo nakon sistemske i lokalne primene u modelu somatske inflamacije. Smanjuje i edem nakon sistemske, ali ne i nakon lokalne periferne primene. Rezultati dobijeni sa inhibitorima NOS ukazuju da magnezijum-sulfat i dizocilpin ostvaruju svoje efekte bar jednim delom posredstvom NO-a. U visceralnom inflamatornom bolu magnezijum-sulfat ima dozno-nezavisno, a dizocilpin dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo. U analgetičkom dejstvu magnezijum-sulfata i dizocilpina u visceralnom bolu ne učestvuje NO. S obzirom da su glibenklamid i metilensko plavo redukovali efekt dizocilpina u visceralnom bolu, zaključeno je da su u mehanizam dejstva uključeni ATP-senzitivni K⁺ kanali i cGMP. Supkutana injekcija magnezijum-sulfata u zdravo tkivo izaziva lokalnu i dozno-zavisnu mehaničku hiperlgezuju praćenu blagim eritemom, bez pojave edema. Primenom antagonista TRP kanala, dizocilpina, inhibitora NOS i metilenskog plavog pokazano je da pH neutralni izotonični rastvor magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi) izaziva bol aktivacijom TRPA1, TRPV1 i TRPV4 kanala, kao i aktivacijom NMDA receptora i povećanom sintezom NO-a i cGMP-a.

Zaključak: Magnezijum-sulfat i dizocilpin ispoljavaju analgetički i antiedematozni efekt u somatskom i visceralnom inflamatornom modelu bola. Efekti su lokalni i/ili sistemski. Modulacija sinteze NO-a utiče na njihov efekt u somatskom bolu i edemu, ali ne i u visceralnom bolu. Kao i NMDA antagonisti, magnezijum-sulfat može biti efikasan u terapiji inflamatornog bola i otoka. Ovo je prva studija koja je pokazala da lokalno primenjen izotonični rastvor magnezijum-sulfata u zdravom tkivu izaziva bol koji se ostvaruje aktivacijom TRP kanala, NMDA receptora i povećanom sintezom NO-a.

Ključne reči: magnezijum-sulfat, dizocilpin, NMDA antagonist, TRP kanali, inflamatorni bol, edem.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Farmakologija

Pharmacodynamic evaluation of magnesium sulfate and dizocilpine in models of somatic and visceral pain in rats

ABSTRACT

Introduction: Magnesium is a mineral who has many functions in the human body: he is cofactor for 300 enzymatic reaction, modulates ion channels, neurotransmission, *etc.* Magnesium is an endogenous voltage-dependent *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channel blocker. Dizocilpine (MK-801) is a noncompetitive NMDA receptor antagonist. Dizocilpine is commonly used as a neuropharmacological tool. The activation of NMDA receptor has a significant role in the development and maintenance of an inflammatory pain. Activation of these receptors may increase the synthesis of nitric oxide (NO). Also, transient receptor potential (TRP) channels and acid sensitive ion channels (ASIC) are important in pain. It is well known that magnesium and dizocilpine can reduce neuropathic pain and enhance analgesic effect of opioids or anesthetics.

Aim: The aim of this thesis was to examine whether magnesium sulfate and dizocilpine has analgesic and antiedematous effect in somatic and visceral inflammatory pain in rats and to explore the possible role of NO in the mechanisms of their actions.

Methods: Male Wistar rats were used. Carragennan-induced hyperalgesia and edema in rats was used as a model of somatic inflammatory pain. Hyperalgesia was examined by von Fray analgesiometric test. Antiedematous effect was examined by immersing paw in the plethysmometer. The acetic acid-induced writhing test in rats was used as a model of visceral pain. Mechanism of action was evaluated with inhibitors of NOS.

Results: In the somatic inflammatory model of pain systemically administered magnesium sulfate reduces hyperalgesia and edema in a dose-independent manner. It is more efficient in lower (5 mg/kg, sc), than in higher doses (15 and 30 mg/kg, sc). The analgesic effect is not present after local peripheral application, as opposed to antiedematous effect that is present after both routes of administration. Magnesium sulfate systematically applied has preventive (given as a pretreatment) and therapeutic (given as treatment) effect on pain and swelling in inflammation. Dizocilpine has dose-dependent antihyperalgesic effect after systemical and local peripheral application in the

model of somatic inflammation. Dizocilpine reduces edema after systemic, but not after local peripheral application. The results obtained with inhibitors of NOS indicate that magnesium sulfate and dizocilpine achieve their effects, at least in part, *via* NO. In the visceral inflammatory model of pain, magnesium sulfate has a dose-independent and dizocilpine dose-dependent antinociceptive effect. NO does not participate in the analgesic effects of magnesium sulfate and dizocilpine in visceral pain. Since glibenclamide and methylene blue reduced the effect of dizocilpine in visceral pain, it was concluded that ATP-sensitive K⁺ channels and cGMP are involved in the mechanism of action of dizocilpine. Subcutaneous injections of magnesium sulfate in healthy tissue causes local and dose-dependent mechanical hyperalgesia with mild erythema, without edema. By applying the antagonists of TRP channels, dizocilpine, inhibitors of NOS and the methylene blue it has been shown that a pH-neutral isotonic solution of magnesium sulphate (6.2 mg/paw) causes pain *via* activation TRPA1, TRPV1 and TRPV4 channels, as well as the activation of NMDA receptors, and increases the synthesis of NO and cGMP.

Conclusion: Magnesium sulfate and dizocilpine exert analgesic and antiedematous effect in the somatic and visceral inflammatory model of pain and edema. The effects are local and/or systemic. Modulation of the synthesis of NO affects their effect in somatic pain and edema, but not in visceral pain. Similar to NMDA receptor antagonist, magnesium sulfate may be effective in the therapy of inflammatory pain and swelling. This is the first study that shows that locally applied isotonic solution of magnesium sulfate in the healthy tissue causes pain, which is achieved by activation of TRP channels, NMDA receptors and increased synthesis of NO.

Keywords: magnesium sulfate, dizocilpine, NMDA antagonist, TRP channels, inflammatory pain, edema.

Scientific field: Medicine

Major in: Pharmacology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Definicija bola i terapijski pristup.....	1
1.2. Klasifikacija bola.....	1
1.3. Patofiziologija bola.....	3
1.4. Modulacija bola.....	4
1.5. NMDA receptori i njihova uloga u modulaciji bola.....	7
1.5.1. NMDA receptori.....	7
1.5.2. Uloga NMDA receptora u modulaciji bola.....	9
1.6. Azotni oksid i njegova uloga u modulaciji bola.....	11
1.6.1. Azotni oksid.....	11
1.6.2. Uloga NO-a u modulaciji bola.....	12
1.7. TRP i ASIC receptori i njihova uloga u modulaciji bola.....	13
1.7.1. TRP i ASIC receptori.....	13
1.7.2. Uloga TRP i ASIC receptora u modulaciji bola.....	15
1.8. Analgetici.....	18
1.9. NMDA antagonisti kao adjuvantni analgetici.....	21
1.9.1. Dizocilpin (MK-801).....	22
1.9.2. Magnezijum.....	22
1.9.2.1. Magnezijum kao analgetik.....	26
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	28
3. MATERIJAL I METODE.....	29
3.1. Eksperimentalne životinje.....	29
3.2. Supstance i njihova primena.....	29
3.3. Eksperimentalni dizajn.....	33
3.4. Metode.....	34
3.4.1. Modeli somatskog bola.....	34
3.4.1.1. Karageninom indukovana inflamatorna hiperalgezija i edem šape.....	34
3.4.1.2. Magnezijum-sulfatom indukovana hiperalgezija i edem šape.....	42
3.4.1.3. AITC-om/kapsaicinom indukovana mehanička hiperalgezija.....	45

3.4.1.4. AITC-om/kapsaicinom/sirćetnom kiselinom indukovano bolno ponašanje pacova.....	46
3.4.2. Model visceralnog bola.....	47
3.4.2.1. Test abdominalnih grčeva (<i>eng. „writhing test„</i>).....	47
3.4.3. Test za procenu motorne spretnosti pacova - Rotarod test.....	50
3.4.4. Statistička analiza.....	51
4. REZULTATI.....	52
4.1. Usporedni efekti magnezijum-sulfata i dizocilpina u modelu somatskog inflamatornog bola i otoka kod pacova.....	52
4.1.1. Karageninom indukovana hiperalgezija i edem šape pacova.....	52
4.1.2. Efekti magnezijum-sulfata na karageninom izazvan bol i otok nakon sistemske i lokalne primene kod pacova.....	52
4.1.3. Efekti dizocilpina na karageninom izazvan bol i otok nakon sistemske i lokalne primene kod pacova.....	59
4.2. Uloga NO-a u mehanizmu antihiperalgezijskog i antiedematoznog dejstva magnezijum-sulfata u modelu somatskog inflamatornog bola i otoka kod pacova.....	64
4.2.1. Dejstvo prekursora i inhibitora sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata.....	65
4.2.2. Dejstvo inhibitora neuralne sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata.....	66
4.2.3. Dejstvo inhibitora inducibilne sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata.....	67
4.2.4. Dejstvo prekursora i inhibitora sintaze NO-a na antiedematozni efekt magnezijum-sulfata.....	68
4.2.5. Dejstvo inhibitora neuralne sintaze NO-a na antiedematozni efekt magnezijum-sulfata.....	70
4.2.6. Dejstvo inhibitora inducibilne sintaze NO-a na antiedematozni efekt magnezijum-sulfata.....	71
4.3. Uloga NO-a u mehanizmu antihiperalgezijskog i antiedematoznog dejstva dizocilpina u modelu somatskog inflamatornog bola i otoka kod pacova.....	72
4.3.1. Dejstvo neselektivnog inhibitora sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt dizocilpina.....	73

4.3.2. Dejstvo inhibitora neuralne sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt dizocilpina.....	74
4.3.3. Dejstvo inhibitora inducibilne sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt dizocilpina.....	75
4.3.4. Dejstvo neselektivnog inhibitora sintaze NO-a na antiedematozni efekt dizocilpina.....	76
4.3.5. Dejstvo inhibitora neuralne sintaze NO-a na antiedematozni efekt dizocilpina.....	77
4.3.6. Dejstvo inhibitora inducibilne sintaze NO-a na antiedematozni efekt dizocilpina.....	78
4.4. Uperedni efekti magnezijum-sulfata i dizocilpina u modelu visceralnog inflamatornog bola kod pacova.....	79
4.4.1. Sirćetnom kiselinom indukovani abdominalni grčevi kod pacova.....	79
4.4.2. Antinociceptivni efekti magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva.....	79
4.5. Uloga NO signalizacije u mehanizmu antinociceptivnog dejstva magnezijum- sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva.....	81
4.5.1. Uloga inhibitora NOS u mehanizmu antinociceptivnog dejstva magnezijum- sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva.....	82
4.5.1.1. Dejstvo neselektivnog inhibitora NOS na antinociceptivni efekt magnezijum- sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva.....	82
4.5.1.2. Dejstvo inhibitora neuralne sintaze NO-a na antinociceptivni efekt magnezijum- sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva.....	83
4.5.1.3. Dejstvo inhibitora inducibilne sintaze NO-a na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva.....	85
4.5.2. Uloga NO/cGMP/K ⁺ ATP puta u mehanizmu antinociceptivnog dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva.....	86
4.5.2.1. Uticaj metilenskog plavog na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva.....	86
4.5.2.2. Uticaj glibenklamida na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva.....	88

4.6. Lokalna periferna hiperalgezija izazvana intraplantarnom injekcijom magnezijum-sulfata kod pacova.....	89
4.7. Mehanizam nastanka hiperalgezije posle intraplantarne injekcije izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata kod pacova.....	92
4.7.1. Uloga TRP receptora u nastanku pronociceptivnog efekta izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata.....	92
4.7.1.1. Uticaj inhibicije TRPA1 receptora na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziiju šape pacova.....	92
4.7.1.2. Uticaj inhibicije TRPV1 receptora na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziiju šape pacova.....	95
4.7.1.3. Uticaj inhibicije TRPV4 receptora na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziiju šape pacova.....	97
4.7.1.4. Uticaj inhibicije ASIC receptora na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziiju šape pacova.....	99
4.7.2. Uticaj pH rastvora magnezijum-sulfata na razvoj hiperalgezije šape pacova....	101
4.7.3. Uloga NMDA receptora na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziiju šape pacova.....	102
4.7.4. Uloga NO-a u magnezijum-sulfatom izazvanoj hiperalgeziji šape pacova.....	104
4.7.4.1. Uticaj neselektivne inhibicije NOS na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziiju šape pacova.....	104
4.7.4.2. Uticaj inhibicije neuralne forme NOS na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziiju šape pacova.....	105
4.7.4.3. Uticaj inhibicije inducibilne forme NOS na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziiju šape pacova.....	106
4.7.4.4. Uticaj inhibicije gvanilatne ciklaze na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziiju šape pacova.....	107
4.7.5. Inhibitorno dejstvo diklofenaka na hiperalgeziiju izazvanu izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata.....	109
4.7.5.1. Mehanizam inhibitornog dejstva diklofenaka na hiperalgeziiju izazvanu magnezijum-sulfatom.....	110
4.7.5.1.1. Dejstvo diklofenaka na somatski bol izazvan AITC-om.....	110
4.7.5.1.2. Dejstvo diklofenaka na somatski bol izazvan kapsaicinom.....	112

4.7.5.1.3. Dejstvo diklofenaka na somatski bol izazvan srččetnom kiselinom.....	114
4.8. Dejstvo magnezijum-sulfata i dizocilpina na motornu spretnost pacova.....	116
5. DISKUSIJA.....	117
6. ZAKLJUČCI.....	146
7. LITERATURA.....	148

1. UVOD

„Sedare dolorem – divinum opus est,,

(„Smiriti bol – božansko je delo,,)

Latinska izreka

1.1. Definicija bola i terapijski pristup

Bol se definiše kao neprijatan osećaj i emocionalno iskustvo izazvano stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (IASP – International Association for Study of Pain). Najčešći je simptom koji pacijenta dovodi do lekara. Bol se može otkloniti kauzalnom i simptomatskom terapijom. Kauzalna terapija otklanja uzrok bola i predstavlja osnovni cilj savremene terapije. Međutim, kod mnogih oboljenja praćenih jakim bolovima (karcinom, artritis) kauzalna terapija ili ne postoji ili ne daje zadovoljavajuće rezultate. Zato se u praksi najčešće sprovodi simptomatska terapija bola. Osnovni lekovi u simptomatskoj terapiji bola su tzv. standardni analgetici (opioidi i nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL)). Međutim, u terapiji hroničnih bolnih stanja standardni analgetici nekada pokazuju ograničenu efikasnost, a njihova hronična primena može biti praćena značajnim neželjenim efektima. Zato je aktuelni cilj savremene medicine razvoj adjuvantnih analgetika i/ili kombinovana primena analgetika, čime se povećava efikasnost i bezbednost lekova u terapiji bola.

1.2. Klasifikacija bola

Bol se može podeliti na više načina:

1. Prema mestu nastanka bolne draži: somatski, visceralni, projektovani i fantomski.
2. Prema vrsti bolne draži: mehanički, termički, hemijski.
3. Prema patofiziološkim mehanizmima: nociceptivni, inflamatorni i neuropatski.
4. Prema dužini trajanja: akutni, subakutni i hronični.
5. Prema jačini (intenzitetu): slab, umereno jak i jak bol.

Nociceptivni bol ima protektivnu ulogu jer upozorava organizam da na njega deluje štetna noksa. Kod akutne traume i u specifičnim situacijama, kao što su operacija ili druge bolne procedure koje nužno podrazumevaju štetne stimuluse, nociceptivni bol sa aspekta terapije nije klinički problem jer dobro reaguje na lokalne ili opšte anestetike ili opioide. Inflammatory bol je povezan sa oštećenjem tkiva, inflamacijom i infiltracijom tkiva imunim ćelijama. U ovom modelu bola različiti medijatori zapaljenja doprinose nastanku i razvoju bola. On može biti akutni i hronični. Neuropatski bol je oblik hroničnog bola, koji nastaje zbog lezije ili oboljenja somatosenzornog sistema (Jensen i sar., 2011). Akutni bol traje do 30 dana, subakutni od jednog do šest meseci, a hroničan bol duže od šest meseci (Thienhaus i Cole, 2002).

Da bi što bolje proučili mehanizme nastanka i održavanja bola, a sa time i razvili adekvatnu terapiju bola, kod životinja su standardizovani različiti eksperimentalni modeli bola:

- Nociceptivni - nastaje direktnom stimulacijom nociceptora (zagrevanjem ili mehaničkim pritiskom na šapu ili rep, električna stimulacija zubne pulpe, prva faza formalinskog testa).
- Inflammatory – nastaje usled senzitivizacije receptora na mehaničke ili hemijske stimuluse (ubrizgavanje proinflammatory supstanci u šapu, trbušnu duplju, koleno zglobov, visceralne organe...).
- Neuropatski bol – nastaje usled senzitivizacije receptora na mehaničke ili termičke stimuluse (ligatura nervusa ischiadicusa ili polineuropatija u sklopu šećerne bolesti).
- Visceralni bol – mehanička distenzija mokraćne bežike ili creva, ubrizgavanje hemijskih supstanci u unutrašnje organe.
- Postoperativni bol – incizija plantarne strane šape.

Za ispitivanje antinociceptivnog profila (efikasnost, jačina, mehanizam, mesto i dužina delovanja) NSAIL i drugih lekova u terapiji inflammatory bola najpogodniji je model

inflamatornog bola u kome se koristi mehanički stimulus. Nasuprot tome, za ispitivanje analgetičkog dejstva opioidnih analgetika pogodniji je model nociceptivnog bola sa termičkim stimulusom (npr. test povlačenja repa usled zagrevanja ili test vruće ploče).

1.3. Patofiziologija bola

Oštećenje tkiva uzrokuje doživljaj bola koji nastaje integracijom četiri fiziološka procesa: transdukcija, transmisija, percepcija i modulacija (Berry i sar., 2006).

Transdukcija je proces konverzije mehaničke, termičke ili hemijske energije bolne draži u električnu energiju receptora za bol. Dakle, to je proces u kome draž dovodi do generisanja akcionog potencijala u senzornom nervnom završetku. Nociceptori su receptori za bol. Oni nisu receptori u pravom smislu te reči već su razgranati slobodni nervni završetci primarnih senzornih aferentnih nervnih vlakana. Receptori za bol se nalaze na površini (koža, sluzokože) ili unutar (zglobovi, skeletni mišići...) tela. Na osnovu načina razdraživanja delimo ih na mehanoreceptore, termoreceptore i polimodalne receptore. Mehano- i termo-receptori se aktiviraju delovanjem mehaničke odnosno termičke draži. Polimodalne nociceptore aktiviraju tri vrste draži: mehaničke, termičke i hemijske. Nociceptori ne ispoljavaju spontanu aktivnost, ali za razliku od drugih receptora, podležu senzitivizaciji.

Transmisija bola je proces prenosa bolnih impulsa tj. generisanih akcionih potencijala iz nociceptora u kičmenu moždinu i mozak. Bolni signali se prenose primarnim senzornim aferentnim vlaknima, koja se dele na A δ (mijelinizovana) i C polimodalna nervna vlakna (nemijelinizovana) (Marchand, 2010). A δ prenose mehaničke stimulse i mehaničke, termičke i hemijske stimulse (polimodalna A δ vlakna). C vlaknima se prenose mehanički, termički i hemijski stimulusi. Tela primarnih senzornih neurona smeštena su u dorzalnim spinalnim ganglijama, a njihovi centralni terminali ulaze u zadnje rogove kičmene moždine gde ostvaruju veze sa sekundarnim senzornim neuronima. Dalje se impulsi sekundarnim senzornim neuronima prenose spinothalamičkim i spino-retikulothalamičkim putem do talamusa (lateralnih i medijalnih jedara) i srednjeg mozga (periaqueductalna siva masa i nucleus raphe magnus; strukture uključene u endogenu modulaciju bola), respektivno. U talamusu se informacije prenose sa sekundarnog na tercijarni neuron bolnog puta, onda se zatim talamičkim putevima

završavaju u primarnim i sekundarnim somatosenzornim poljima u kori velikog mozga i limbičkom sistemu (Marchand, 2010).

Percepcija bola je doživljaj bola. Strukture uključene u taj proces su somatosenzorna kora velikog mozga i limbički sistem. Bol se doživljava kao neprijatan osećaj u određenom delu tela. Uvek je praćen negativnim emocijama. Primarni i sekundarni somatosenzorni korteks su odgovorni za svesno doživljavanje i karakterizaciju bola u vidu njegove lokalizacije, inteziteta i dužina trajanja bola. Limbički sistem je uključen u emocionalno-afektivnoj komponenti doživljaja bola (Schaible, 2007; Marchand, 2010).

Modulacija bola je neuralna aktivnost koja kontroliše proces transmisije bolnih signala. Sa farmakološkog aspekta ona predstavlja važno ciljno mesto delovanja analgetika.

1.4. Modulacija bola

Modulacija bola se odvija se na svim nivoima nociceptivnog puta, od periferije preko spinalnog do supraspinalnog nivoa. Sprovode je endogene regulatorne supstance. Rezultat modulacije je facilitacija (pojačavanje) ili inhibicija bolnih impulsa (Shaible, 2007; Marchand, 2010).

Senzitizacija je svojstvo receptora da nakon ponavljane stimulacije stiču niži prag nadražaja. Manifestuje se pojačanim bolom.

- **Periferna senzitizacija** podrazumeva da *nociceptori* postaju osetljiviji tj. stiču niži prag nadražaja, povećavaju jačinu odgovora na dejstvo bolne draži povećanjem frekvence pražnjenja akcionog potencijala i ispoljavaju spontanu aktivnost. Manifestuje se kao primarna hiperalgezija i alodinija.
- **Centralna senzitizacija** je *hiperekscitabilnost neurona kičmene moždine*. Aktivacija *N*-metil-D-aspartat (NMDA) receptora u kičmenoj moždini ima glavnu ulogu u nastanku ovog procesa. Dodatni mehanizmi su smanjena centralna inhibicija bola, pojava spontane aktivnosti i proširenje receptivnog polja neurona zadnjih rogova kičmene moždine. Manifestuje se kao sekundarna hiperalgezija, alodinija, perzistentni i preneseni bol.

Hiperalgezija je povećan intezitet bola na draži koje su inače bolne. Ona može biti primarna i sekundarna.

- **Primarna** hiperalgezija je rezultat periferne senzitivizacije tj. senzitivizacije nociceptora i javlja se na mestu oštećenja.
- **Sekundarna** hiperalgezija je rezultat centralne senzitivizacije i javlja se u neoštećenoj regiji.

Alodinija je doživljaj bola pri dejstvu inače bezbolnih draži.

Perzistentni bol je produženo trajanje bola posle kratkotrajnog stimulusa.

Preneseni bol je proširenje bola u neoštećena tkiva.

Modulacija bola na **periferiji** je uglavnom facilitatorna. Iako mehanički i termički stimulusi aktivacijom nociceptora dovode do nastanka bola, najčešći stimulatori nociceptora su hemijski medijatori. Hemijski medijatori se oslobađaju iz tkiva nakon inflamacije, ishemije i povrede tkiva. Periferni modulatori bola su histamin, bradikinin, transmittori (serotonin, glutamat, acetilholin), prostaglandini, leukotrijeni, metaboliti i druge supstance oslobođene iz ćelija (mlečna kiselina, ATP, azotni oksid (NO), H^+ , K^+ joni), supstanca P, CGRP (peptid poreklom od gena za kalcitonin), kao i interleukini i interferoni (Carlton i sar., 1995; Marchand, 2010; Ossipov, 2012). Periferno oslobođeni medijatori dovode do razvoja neurogene inflamacije tj. do vazodilatacije, ekstrasvazacije plazme, privlačenja makrofaga i degranulacije mast ćelija (Shaible, 2007; Marchand, 2010). Oslobođeni medijatori na nociceptore deluju dvojako: direktno ih aktiviraju (histamin, serotonin, bradikinin, ATP, H^+ joni) ili povećavaju osetljivost nociceptora na druge medijatore (prostaglandini, citokini, TNF) (Millan, 2002). Na mestu oštećenja i u okolini oštećenja medijatori snižavaju prag osetljivosti nociceptora izazivajući perifernu senzitivizaciju i primarnu hiperalgeziyu. Tokom inflamacije na periferiji se dešava promena broja i/ili aktivnosti mnogih jonskih kanala: voltažno-zavisni Ca^{2+} (N tipa), voltažno-zavisni K^+ , TRPV1 (transient receptor potential cation channel vanilloid member 1 - kanali za prolazne receptorske potencijale, vanilloidni tip 1), kao i ASIC (acid-sensing ion channels)-kanali osetljivi na nizak pH. Na periferiji postoje i receptori, kao što su μ -opioidergički, α_2 -adrenergički, adenoziński A_1 , 5-HT_{1B/1D}, GABA_A, čija

aktivacija dovodi do inhibicije transdukcije i transmisije bola (Millan, 2002; Marchand, 2010).

Na nivou **kičmene moždine** odvija se najznačajniji modulatorni uticaj na transmisiju bolnih impulsa. Dorzalni rogovi kičmene moždine imaju lokalne interneurone koji mogu biti ekscitatorni i inhibitorni. Inhibitorni interneuroni su uglavnom GABA-ergički, glicinergički, opioidergički ili holinergički i oni sprečavaju nekontrolisano širenje ekscitacije (Millan, 1999; Shaible, 2007). Kičmena moždina je i mesto najkompleksnije modulacije jer predstavlja tzv. „kapiju bola„. Teorija „kapije bola„ znači da se na nivou dorzalnih rogova kičmene moždine susreću facilitirajući ushodni (ascendentni) uticaji sa periferije i uglavnom inhibitorni nishodni (descendentni) putevi viših nervnih centara. Descendentni inhibitorni putevi oslobađaju serotonin, dopamin, noradrenalin. Konačan uticaj (facilitacija ili inhibicija transmisije bolnih signala) zavisi od toga koja će komponenta preovladati (Millan, 2002; Marchand, 2010).

Da je kičmena moždina centar modulacije bola govori i postojanje fizioloških spinalnih nociceptivnih refleksa (refleks fleksije i ukršteni refleks ekstenzora). Oni predstavljaju jedan od prvih mehanizama odbrane od bola kojim se organizam štiti pre nego što centralni nervni sistem prepozna problem na svesnom nivou. Refles fleksije se prvi javlja, odmah po stimulaciji nociceptora. On omogućava fleksiju kojom se deo/strana tela na kojoj su aktivirani nociceptori uklanja od bolnog stimulusa. Ukršteni refleks ekstenzora se javlja nešto posle refleksa fleksije, a u toku njega ekstenzija ekstremiteta suprotne strane tela omogućava da se celo telo sklanja od bolnog stimulusa („odskok„) (Dale Purves i sar., 2001).

Na **supraspinalnom** nivou modulacija bola može biti inhibitorna („kapija bola„) ili ekscitatorna. Inhibitoran uticaj u sinapsama se ostvaruje putem serotonina, enkefalina i noradrenalina (Shaible, 2007; Ossipov, 2012). Ekscitatornom modulacijom descendentni putevi na svojim završecima u zadnjim rogovima kičmene moždine oslobađaju glutamat, NO, ali i noradrenalin, serotonin, dopamin. Uticaj noradrenalina, serotonina i dopamina na modulaciju bola može biti i ekscitatoran i inhibitoran, to zavisi od toga na koji podtip odgovarajućeg receptora će neurotransmiter delovati (Millan, 1999).

1.5. NMDA receptori i njihova uloga u modulaciji bola

1.5.1. NMDA receptori

Glutaminska kiselina (glutamat) je glavni ekscitatorni neurotransmiter u CNS-u. Glutamat i aspartat aktiviraju dve vrste glutamatnih receptora: jonotropne i metabotropne.

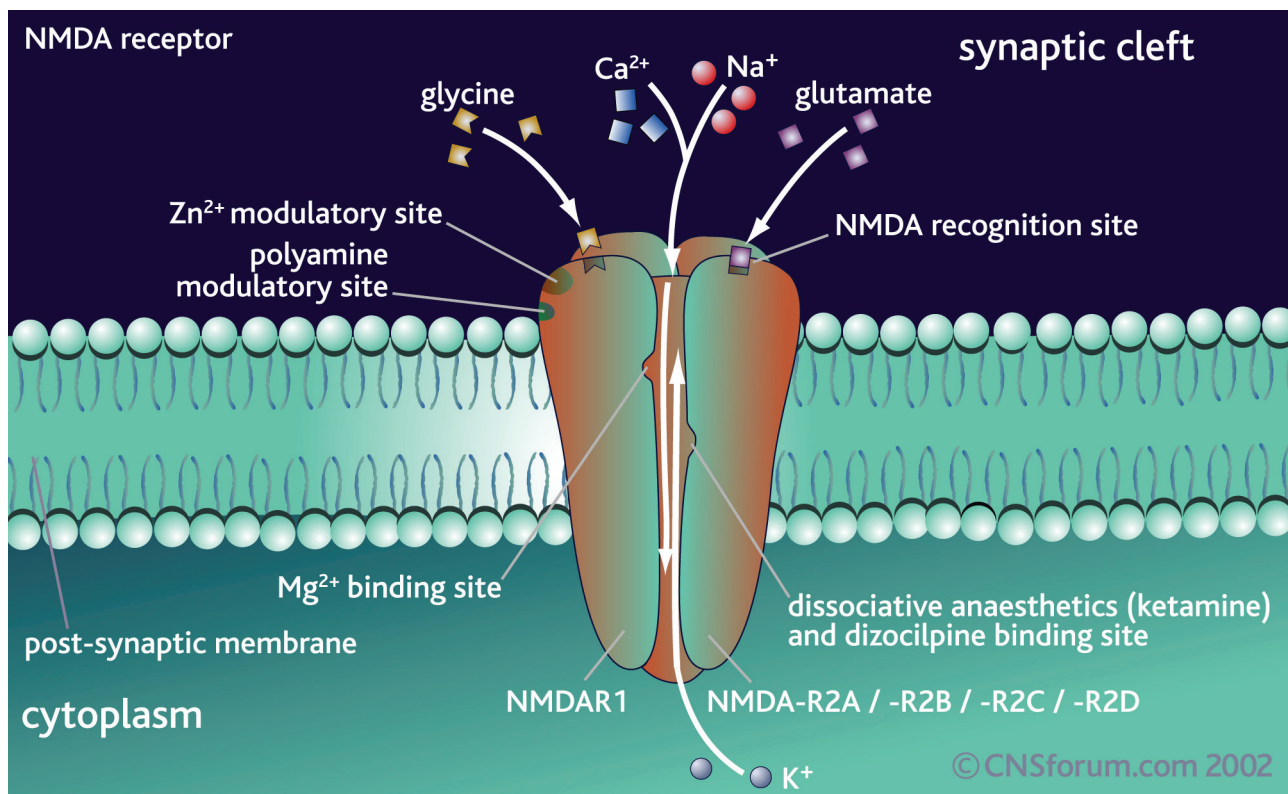
Jonotropni glutamatni receptori su ligand-zavisni jonski kanali. Prema specifičnom vezivanju liganda farmakološki su podeljeni na NMDA (vezuje *N*-metil-D-aspartat), kainatne (KAI, vezuje kainatnu kiselinu) i AMPA (vezuje alfa-amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazola) receptore. Oni pripadaju voltažno-zavisnim i voltažno-nezavisnim receptorima. Nakon aktivacije omogućavaju protok jona kalcijuma, natrijuma i kalijuma.

Kainatni i AMPA receptori čine grupu ne-NMDA receptora. To su voltažno-nezavisni receptori propustljivi prvenstveno za jone natrijuma i odgovorni su za nastanak brze depolarizacije postsinaptičke membrane (Traynelis i sar., 2010).

NMDA receptor je receptorsko-kanalski kompleks. NMDA receptor grade četiri subjedinice. Obavezno su prisutne dve GluN1 subjedinice u kombinaciji sa dve GluN2 i/ili GluN3 subjedinice. Na NMDA receptoru se nalaze četiri domena na/u kojima se nalaze vezna mesta za supstance koje regulišu aktivnost NMDA receptora, to su ekstracelularni amino-terminalni domen (ATD), koji je povezan sa ekstracelularnim ligand-vezujućim domenom (LBD), koji se spaja sa transmembranskim domenom (MD) formirajući jonski kanal. MD se nastavlja na intracelularni karboksi-terminalni domen (CTD) (Traynelis i sar., 2010). U stanju mirovanja joni magnezijuma se nalaze u jonskom kanalu i vrše fiziološku blokadu NMDA receptora. U prostim moždanim sinapsama NMDA receptori obično koegzistuju ili sa AMPA ili sa kainatnim receptorima. Da bi došlo do aktivacije NMDA receptora neophodno je da se prvo aktiviraju AMPA/KA receptori. Glutamat se prvo vezuje za AMPA/KA receptore što dovodi do influksa jona natrijuma i nastanka depolarizacije postsinaptičke membrane. Tako nastala depolarizacija dovodi do istiskivanja jona magnezijuma iz kanala NMDA receptora (Daw i sar., 1993) tj. odstranjivanja fiziološke blokade, posle čega sledi influks jona kalcijuma kada se glutamat veže za NMDA receptor. Ovako nastala depolarizacija i aktivacija NMDA receptora dovode do nastanka spororastućih,

dugotrajnih jonskih struja koje se primarno ostvaruju influksom jona kalcijuma (Michaelis, 1998). (Slika 1).

Na gore pomenutim domenima se nalaze vezna mesta koja regulišu aktivnost NMDA receptora (slika 1). Glutamat ili NMDA se vezuju za GluN2 subjedinicu i učestvuju u aktivaciji receptora na gore pomenuti način. Glicin ili D-serin se vezuju za GluN1 subjedinicu. Glicin se ponaša kao koagonist, dovodeći do povećavanja frekvencije otvaranja kanala. Zato bi lekovi koji blokiraju ovo mesto (nekompetitivni antagonisti NMDA receptora–kinurenska kiselina) mogli da smanje efekte NMDA agonista. U samom kanalu NMDA receptorskog kompleksa postoji tzv. fenciklidinsko mesto za koje se različitim afinitetom vezuju jedinjenja koja čine grupu nekompetitivnih antagonista NMDA receptora. U njih spadaju fenciklidin (PCP), dizocilpin (MK-801), ketamin i drugi. Fenciklidin i dizocilpin imaju visoki afinitet za ovo vezno mesto, a memantin i deksstrometorfan nizak (Wei i Petrovaara, 1999). Vezno mesto za magnezijum nalazi se iznad fenciklidinskog mesta. Za modulatorno mesto NMDA receptora vezuju se glicin, joni cinka i poliamini (Scatton, 1993). Vezno mesto za jone cinka se nalazi pored mesta vezivanja glicina. Cink je nekompetitivni voltažno-nezavisni blokator NMDA receptora. Međutim, cink može potencirati ili aktivirati NMDA receptore zavisno od neuralne aktivnosti (Horning i Trombley, 2001). Poliaminsko vezno mesto se nalazi pored mesta vezivanja cinka. Poliamini kao što su spermin i spermidin mogu biti parcijalni agonisti, antagonisti ili inverzni agonisti (Williams i sar., 1991). Na NMDA receptoru se nalazi i redoks modulatorno mesto (Scatton, 1993) koje je izgrađeno od sulfhidrilnih grupa. Oksidacijom ovih grupa stvaraju se disulfidne veze i smanjuje se aktivnost NMDA receptora. NO olakšava stvaranje disulfidnih veza.



Slika 1. Struktura NMDA receptora. Vezna mesta i način aktivacije. U stanju mirovanja jonski kanal NMDA receptora blokira magnezijum. Usled depolarizacije ćelijske membrane zbog aktivacije AMPA i kainatnih receptora dolazi do istiskivanja magnezijuma i ulaska jona natrijuma i kalcijuma u ćeliju. *Preuzeto sa www.cnsforum.com*

1.5.2. Uloga NMDA receptora u modulaciji bola

Stimulacija NMDA i ne-NMDA receptora je bitna u nastanku i održavanju bola. NMDA receptori se nalaze u ganglionima zadnjih korenova kičmene moždine i u pojedinim delovima mozga, pre- i postsinaptički. Sa periferije bolni signali se prenose C i A nervnim vlaknima u kičmenu moždinu gde dovode do oslobađanja glutamata i pojave bola. Međutim, NMDA i ne-NMDA receptori se nalaze i na perifernim nervnim završecima i imaju ulogu u patogenezi bola (Carlton i sar., 1995; Jackson i sar., 1995; Lawand i sar., 2000).

Uloga NMDA receptora u akutnom nociceptivnom bolu bez prisutva inflamacije i neuropatije je mala. Pokazano je da ketamin primenjen sam ne dovodi do promene

reakcionog vremena u testu vruće ploče (*eng.* Hot plate test) (Getova i Doncheva, 2011). Aktivacija NMDA receptora u indukciji i održavanju procesa senzitivizacije koji se dešava tokom inflamatornog bola je od velikog značaja (Ren i sar., 1992a; Lawand i sar., 2000; Petrenko i sar., 2003; Du i sar., 2003). Nakon inflamacije i oštećenja nerva dolazi do perzistentnog bolnog stanja, zbog čega nastaju promene u modulatornim mehanizmima bola. Promene u modulaciji bola vode razvoju neuroplastičnosti bolnog puta. Ovaj fenomen može biti prolazan, ali ako bol dugo traje ili kratko traje ali je jakog inteziteta onda je osnov nastanka hroničnog bola. Ključnu ulogu u procesu neuroplastičnosti bolnog puta imaju NMDA receptori. Najpre ponavljana stimulacija C-vlakana pospešuje transmisiju bolnog signala kroz zadnje rogove kičmene moždine (tzv. „wind-up,, fenomen) mehanizmima koji uključuju produženo oslobađanje glutamata i posledičnu aktivaciju NMDA receptora. Dalje se povećava osetljivost nociceptora i snižava prag okidanja neurona kičmene moždine što dovodi do razvoja hiperalgezije i alodinije (Marchand, 2010; Ossipov, 2012).

U skladu sa prethodno navedenim su rezultati brojnih eksperimenata sa modelima somatskog i visceralnog bola. Pokazano je da agonisti NMDA, AMPA i kainatnih receptora aplikovani pod kožu, izazivaju alodiniju i mehaničku hiperalgeziju, a da primena antagonista ovih receptora (dizocilpina i CNQX) smanjuje bol (Zhou i sar, 1996). Dalje, Berrino i sar. (2003) su pokazali da prethodno davanje dizocilpina, ketamina, memantina ili deksrometorfana smanjuje bol izazvan intraplantarnom primenom formalina. Prema antinociceptivnoj aktivnosti NMDA antagonisti su imali sledeći redosled potentnosti: dizocilpin > memantin > ketamin > deksrometorfan. Ketamin se pokazao efikasnim u smanjenju bola u testu abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kisleinom (Jahangiri i sar., 2013). Willert i sar. (2004) su pokazali da i kod ljudi ketamin smanjuje viceranu bol u ezofagusu izazvan kisleinom.

Pored gore navedenog direktnog uticaja, NMDA i ne-NMDA receptora mogu imati i indirektan uticaj u patogenezi bola. On se ostvaruje preko prostaglandina, NO-a. O povezanosti NMDA receptora i prostaglandina govori hiperalgezija koja se razvija stimulacijom intratekalnih NMDA i AMPA receptora ili primenom prostaglandina, a koja se suzbija prethodnom primenom indometacina ili selektivnog inhibitora ciklooksigenaze 2 (COX-2) (Yamamoto i Sakashita, 1998). Interakcija između prostaglandina i glutamata ogleda se, s jedne strane u povećanom oslobađanju glutamata

nakon hiperalgezije izazvane intratekalnom primenom prostaglandina E₁ (Takano i sar., 1999), a sa druge strane u povećanom oslobađanju prostaglandina E₂ nakon aktivacije NMDA i ne-NMDA receptora u kičmenoj moždini (Yaksh i sar., 1999). Pokazano je da se centralni analgetički efekt ketorolaka ostvaruje preko NMDA receptora, s obzirom da u kičmenoj moždini smanjuje ekscitaciju NMDA receptora izazvanu *N*-metil-D-aspartatom (Sotgiu i sar., 1998). Nakon aktivacije NMDA receptora dolazi do influksa jona kalcijuma, koji se intracelularno vezuje za kalmodulin. Kompleks kalcijum-kalmodulin aktivira azot oksid sintazu (NOS) koja iz L-arginina stvara citrulin uz oslobađanje NO-a. Ovako stvoreni NO učestvuje u nastanku bola (Shibuta i sar., 1996), a to potvrđuju i eksperimenti u kojima antagonisti NOS ostvaruju analgetički efekt (Haley, 1998).

1.6. Azotni oksid i njegova uloga u modulaciji bola

1.6.1. Azotni oksid

Azotni oksid (NO) je nestabilan slobodni radikal koji ima kratko biološko poluvreme. Biosinteza NO-a vrši se iz molekula kiseonika i aminokiseline L-arginin, a reakciju katalizuje enzim NO sintaza (NOS). Enzim se javlja u tri izooblika: neuralni (nNOS), endotelni (eNOS) i inducibilni (iNOS) oblik NOS. Neuralna i endotelna forma NOS predstavljaju konstitutivne oblike NOS. Neuralna NOS se nalazi u primarnim aferentnim neuronima, dorzalnim rogovima kičmene moždine i u CNS-u, ali i u skeletnim mišićima, bubregu (*macula densa*). Endotelna NOS se nalazi u endotelu krvnih sudova, miocitima, osteoblastima, osteoklastima i trombocitima. Inducibilna NOS se sintetiše u makrofagima, neutrofilima, fibroblastima, vaskularnoj glatkoj muskulaturi, miocitima, endotelu, astrocitima i glija ćelijama, kao odgovor na inflamatorne promene. Konstitutivni oblici NOS su Ca²⁺-zavisni, dok je inducibilan oblik NOS Ca²⁺-nezavisan. To znači da za svoju aktivnost konstitutivni oblici NOS zahtevaju intracelularni porast koncentracije jona Ca²⁺, dok je inducibilni oblik NOS aktivan i kada je intracelularna koncentracija jona Ca²⁺ niska. Pod bazalnim uslovima, aktivirani konstitutivni oblici NOS stvaraju malu količinu NO-a koja ima fiziološki značaj (Moncada i sar., 1991). NO je signalni molekul koji doprinosi mnogim fiziološkim procesima kao što su vazodilatacija, neurotransmisija, stimulacija aktivnosti

makrofaga, inhibicija agregacije trombocita. Međutim, u uslovima stimulisane sinteze NO-a pod dejstvom iNOS dolazi do prevelikog stvaranja NO-a (oko 1000 puta veća proizvodnja u odnosu na bazalnu), koji tada ima patofiziološki značaj. Pod takvim uslovima NO dovodi do nastanka hiperalgezije, izražene hipotenzije. NO je signalni molekul ne-adrenergičkih ne-holinergičkih nerava. NO reguliše funkciju respiratornog, gastrointestinalnog trakta, renalnu perfuziju i kontroliše erekciju penisa. nNOS je eksprimirana u neuronima perifernog i centralnog nervnog sistema i odgovorna je za sintezu NO-a u fiziološkim uslovima, gde učestvuje u kontroli spavanja, učenja, apetita, telesne temperature i neurosekrecije. Kada se NO proizvodi u velikim količinama, kao rezultat aktivnosti iNOS, onda učestvuje u degeneraciji neurona nakon traumatskog oštećenja mozga (Freire, 2012), u razvoj neurodegenerativnih bolesti kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest (Calabrese i sar., 2007). Dakle, NO učestvuje u mnogim procesima u centralnom i perifernom nervnom sistemu kao neuromodulator, neuroprotektor ili neurotoksičan molekul (Calabrese i sar., 2007).

1.6.2. Uloga NO-a u modulaciji bola

NO je molekul koji ima dvojako dejstvo na nocicepciju, antinociceptivno i pronociceptivno. Ovo dualno dejstvo NO-a zavisi prvenstveno od količine stvorenog NO-a (Kawabata i sar., 1994; Dolan i sar., 2000; Prado i sar., 2002). Takođe, dvostruko dejstvo NO zavisi i od načina izazivanja bola. Pokazano je da se inhibicijom produkcije NO-a postiže antinociceptivni efekat u modelu visceralnog bola (test grčeva) i kod bola koji nastaje stimulacijom perifernih nerava hemijskim agensima (formalin, karagenin) (Abacioglu i sar., 2000; Esplugues, 2002). Suprotno ovome, inhibicija NOS u modelu mehaničke hiperalgezije (test pritiska na rep pacova) pojačava bolno stanje (Zhuo i sar., 1993).

U inflamatornom bolu proinflamatorna supstanca (karagenin, formalin, sirćetna kiselina...) povećava prisustvo neutrofila, mast ćelija i makrofaga na mestu inflamacije i u kičmenoj moždini. Pomenute imunske ćelije oslobađaju bradikinin, serotonin, prostaglandine, supstancu P, i druge proinflamatorne supstance koje u kičmenoj moždini podstiču oslobađanje glutamata. Glutamat, ekscitatorna aminokiselina, aktivira NMDA receptore dorzalnih rogova kičmene moždine što rezultuje porastom

intracelularne koncentracije kalcijuma koja onda dovodi do aktivacije Ca^{2+} -zavisne nNOS i posledične sinteze NO-a (Freire i sar., 2009). Istovremeno se povećava i sinteza Ca^{2+} -nezavisne iNOS. Dakle, u kičmenoj moždini aktivirane nNOS i iNOS dovode do velikog porasta NO. NO onda deluje kao retrogradni transmitter koji ponovo preko NMDA receptora u kičmenoj moždini aktivira nNOS (Xu i sar., 2007). Pored ovoga, NO u ostalim neuronima u kičmenoj moždini povećava aktivnost solubilne gvanilatne ciklaze, što dovodi do stvaranja cikličnog gvanozin monofosfata (cGMP). cGMP je uključen u intracelularne procese, aktivira fosfodiesteraze, protein kinaze, aktivira jonske kanale, što za posledicu ima oslobađanje drugih ekscitatornih neurotransmitera, koji prenose bolni signal do talamusa (Tao i sar., 2004; Tuncitan i sar., 2006).

Brojne studije sugerišu da upravo gore pomenuta kaskada događaja ima važnu ulogu u modulaciji bola na centralnom i perifernom nivou (Kawamata i Omote 1999; Tanabe i sar., 2009; Andreassen i sar., 2013).

Kao rezultat aktivacije L-arginin-NO-cGMP puta dolazi do otvaranja kalijumskih kanala (Ortiz i sar., 2003). Široka distribucija adenozin trifosfat (ATP)-zavisnih kalijumskih kanala (K^+ ATP) u perifernom i centralnom nervnom sistemu (Sarantopoulos i sar., 2003; Yamada i Inagaki, 2005; Chi i sar., 2007) reguliše ekscitabilnost neurona, oslobađanje neurotransmitera (Yamada i Inagaki, 2005). K^+ ATP kanali imaju važnu ulogu u modulaciji bola; otvaranje kanala dovodi do hiperpolarizacije ćelijske membrane što rezultuje smanjenom ćelijskom ekscitabilnošću (Lazaro-Ibanez i sar., 2001; Ortiz i sar., 2006).

1.7. TRP i ASIC receptori i njihova uloga u modulaciji bola

1.7.1. TRP i ASIC receptori

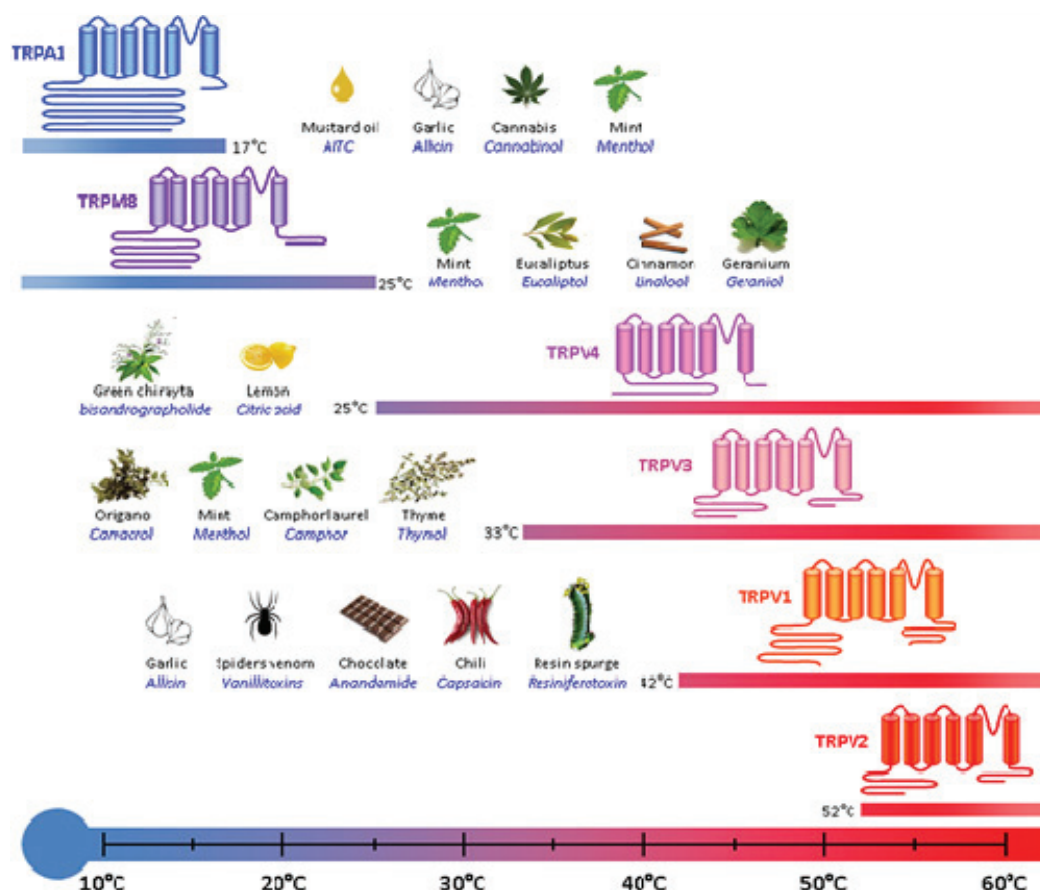
Prolazni receptorski potencijali (*eng.* transient receptor potential - TRP) su jonski kanali propustljivi za monovalentne i divalentne katjone. TRP kanali su tetramerske strukture i velika familija transmembranskih jonskih kanala koja je podeljena na šest podfamilija (Nilius i Owsianik, 2011). Osnovna podela ovih kanala je na vaniloidne (TRPV), ankirinske (TRPA), melastatinske (TRPM), kanonske (TRPC), mukolipinske (TRPML) i policistične (TRPP) (tabela 1.). Za razliku od voltažno-zavisnih kanala, TRP kanali

nisu tipični voltažni senzori. Mnoge prirodne supstance su njihovi aktivatori, npr. beli luk, ren, kapsaicin iz ljute paprike, origano, kanabis (tetrahidrokanabinol) (slika 2.). Aktivira ih i pritisak i sile istezanja (TRPV4), oksidativni stres, produkti zapaljenja. Skoro svi TRP kanali su termosenzori, aktiviraju se pod dejstvom niske (TRPA1, TRPM8) i visoke temperature (TRPV) (Nilius i Owsianik, 2011) (slika 2). TRP kanali učestvuju u brojnim fiziološkim i patofiziološkim procesima u organizmu. Lokalizovani su neuralno i ekstraneuralno (epitel, osteoblasti, fibroblasti...). Kako su najčešće propusni za jone kalcijuma oni povećavaju intracelularnu signalizaciju i zato imaju bitnu ulogu u regulisanju osnovnih ćelijskih funkcija, kao što su kontrakcija, relaksacija, proliferacija i ćelijska smrt. Regulišu homeostazu kalcijuma u organizmu; vrše apsorpciju jona kalcijuma u crevima (TRPV6), bubrezima (TRPV5), osteoblastima (TRPV1) (Lieben i Carmeliet, 2012). TRP kanali tipa melastatin 6 i 7 su karakteristično permeabilni za jone magnezijuma (Schlingmann i sar., 2002; Monteilh-Zoller i sar., 2003) zbog čega učestvuju u reapsorpciji magnezijuma u bubrezima i crevima. TRP kanali imaju značajnu ulogu i u kardiovaskularnom i respiratornom sistemu. U patogenezi astme i hronične obstruktivne bolesti pluća aktivacija TRPA1, TRPV1, TRPV4 i TRPM8 doprinosi nastanku inflamacije i bronhokonstrikcije. TRPA1 agonisti izazivaju astmi slične simptome, kašalj, vizing, dispneju i naknadnu osetljivost na hemijske i fizičke stimuluse (Grace i sar., 2014).

Tabela 1. Familija TRP kanala kod ljudi.

Podfamilija TRP kanala	Kanonski tip-TRPC	Melastatinski tip-TRPM	Vaniloidni tip-TRPV	Ankirinski tip-TRPA	Mukolipinski tip-TRPML	Policistični tip-TRPP
Broj podfamilija	TRPC 1-7	TRPM 1-8	TRPV 1-6	TRPA1	TRPML 1-3	TRPP 2,3,5
TRP kanali koji učestvuju u nocicepciji	TRPC1 TRPC6	TRPM2 TRPM3 TRPM8	TRPV1 TRPV2 TRPV3 TRPV4	TRPA1	/	/

Kanali osjetljivi na nizak pH (acid-sensing ion channels - ASICs) su voltažno-nezavisni katjonski kanali koje aktivira ekstracelularna promena pH tj. joni vodonika. ASIC su propustljivi i za druge jone, kao što su joni natrijuma, kalcijuma i kalijuma. Do sada je klonirano šest različitih izoformi ASIC, ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 i ASIC4.

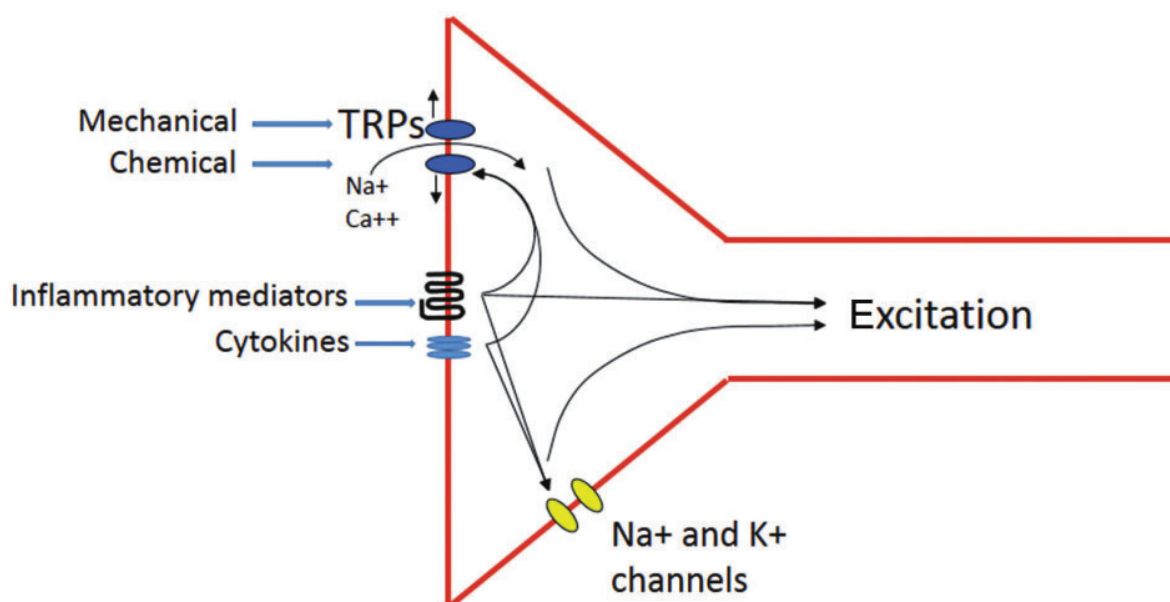


Slika 2. Prirodni aktivatori TRP kanala i termosenzitivni TRP kanali. Preuzeto sa journal.publications.chestnet.org.

1.7.2. Uloga TRP i ASIC receptora u modulaciji bola

Do sada je opisano deset članova iz četiri podgrupe TRP kanala koji učestvuju u nociceptivnom procesu (tabela 1). Svi oni su ligand-zavisni jonski kanali (Nilius i Owsianik, 2011). Tokom periferne inflamacije proizvode se različiti medijatori, bradikinin, prostaglandin E₂, supstanca P koji preko svojih receptora na nociceptorima

vrše senzitivizaciju perifernog nerva (tj. snižavaju prag bola na mestu inflamacije) i aktiviraju intracelularne mehanizme odgovorne za prenos bolnog signala. Pomenuti medijatori preko svoje signalne kaskade mogu da vrše fosforilaciju TRP kanala i time menjaju broj i/ili aktivnost TRP kanala na membrani perifernog nerva (Patapoutian i sar., 2009). NO kroz nitrozilaciju aktivira TRP kanale, TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPC (Yoshida i sar., 2006). U perifernom nervnom sistemu, nakon aktivacije TRP kanali propuštaju jone natrijuma, kalijuma i kalcijuma što dovodi do depolarizacije membrane i povećane verovatnoće stvaranja akcionog potencijala. Pored toga, priliv jona kalcijuma povećava oslobađanje različitih medijatora (Parnas i Parnas, 2010) koji onda izazivaju ekscitaciju postsinaptičkog neurona. U dorzalnim rogovima kičmene moždine dolazi do oslobađanja glutamata, supstance P, CGRP i nastanka centralne senzitivizacije (Patapoutian i sar., 2009). Dakle, TRPA1, TRPV1 i TRPV4 kanali se nalaze uglavnom u perifernom, ali takođe i u centralnom nervnom sistemu i bitni su za transdukciju i transmisiju bola (Eid i sar., 2008; Denadai-Souza i sar., 2012; Uchytlova i sar., 2014; Sousa-Valente i sar., 2014) (slika 3). TRPV4 kanali se specifično aktiviraju na mehaničke draži, ali ne utiču na promenu bazalnog nociceptivnog praga na mehanički stimulus.



Slika 3. Način aktivacije TRP receptora u perifernim nervima. Mehanički i hemijski stimulusi mogu direktno da aktiviraju TRP kanale povećavajući njihovo otvaranje i influks katjona. Dodatno, ekstracelularni medijatori kao što su inflamatorni medijatori i

citokini preko svojih receptora i intracelularne signalizacije mogu aktivirati TRP kanale. Neki medijatori mogu delovati preko TRP kanala, a neki prvenstveno otvaraju natrijumske kanale ili zatvaraju kalijumske kanale u perifernom nervu u cilju povećavanja ekscitabilnosti. Preuzeto iz reference Blackshaw, 2014.

Pokazano je da su u somatskom bolu, TRPA1, TRPV1 i TRPV4 kanali odgovorni tokom inflamacije za nastanak mehaničke i toplotne hiperalgezije, kao i za hiperalgeziu na hladno (Davis i sar., 2000; Karashima i sar., 2009; da Costa i sar., 2010). TRPA1, TRPV1, TRPV4 kanali učestvuju i u nastanku visceralnog inflamatornog bola tokom eksperimentalnog cistitisa i kolitisa (Charrua i sar., 2007; Engel i sar., 2011; Fichna i sar., 2012). Tokom inflamacije i oštećenja perifernog nerva nastanku hiperalgezije na različite stimuluse doprinose uglavnom slični tipovi i podfamilije TRP kanala (tabela 2).

Tabela 2. Učešće TRP kanala u različitim modalitetima bola tokom inflamacije i oštećenja perifernog nerva (Preuzeto i prilagođeno prema referenci Sousa-Valente i sar., 2014).

INFLAMACIJA			OŠTEĆENJE NERVA		
Termička hiperalgezija	Hiperalgezija na hladno	Mehanička hiperalgezija	Termička hiperalgezija	Hiperalgezija na hladno	Mehanička hiperalgezija
TRPV1		TRPV1	TRPV1		TRPV1
TRPM2		TRPM2	TRPM2		TRPM2
TRPM3					
	TRPA1	TRPA1		TRPA1	TRPA1
	TRPM8			TRPM8	
		TRPV4			TRPV4
		TRPC1			
		TRPC6			

ASIC3 imaju važnu ulogu u procesu detekcije inflamacije u perifernom nervnom tkivu (Deval i sar., 2008). Oštećenje tkiva i inflamacija izazivaju acidozu koja je dovoljna da aktivira ASIC3 kanale i dovede do nastanka bola. ASIC učestvuju u detekciji i transmisiji bola na mehanički stimulus koji nastaje tokom neuropatije ili inflamacije (Ugawa i sar., 2002; Jeong i sar., 2013). Tokom zapaljenja prisutna je acidoza, ali se i oslobađaju i medijatori zapaljenja. Između inflamatornih medijatora i protona postoji sinergistička reakcija. Pokazano je da bradikinin i serotonin povećavaju ekspresiju i aktivnost ASIC3 kanala (Mamet i sar., 2002). Studije na *knock-out* miševima su pokazale da upravo serotonin, klasični inflamatorni medijator, doprinosi inflamatornom bolu aktivirajući neprotonski tj. ligand zavisni domen ASIC3 kanala (Wang i sar., 2013). Pored ASIC kanala i TRPV1 i TRPV4 kanali se takođe aktiviraju protonima, razlika postoji u stepenu acidoze pri kojoj dolazi do aktivacije pomenutih kanala.

1.8. Analgetici

Analgetici su lekovi kojima se otklanjaju bolovi. Osnovna podela analgetika je na analgoantipiretike („neopiodne,“) i opioidne.

U **analgoantipiretike** ubrajaju se paracetamol i NSAIL. Osnovni mehanizam njihovog dejstva je inhibicija enzima ciklooksigenaze tj. sinteze prostaglandina. Oni smanjuju bol slabog do umerenog inteziteta (analgetičko dejstvo), suzbijaju upalu mekih tkiva i kostiju (antiinflamatorno dejstvo) i snižavaju povišenu telesnu temperaturu (antipiretičko dejstvo). Neželjena dejstva ostvaruju u gastrointestinalnom, kardiovaskularnom sistemu, bubrezima i trombocitima. Inhibišući sintezu tromboksana NSAIL smanjuju agregaciju trombocita i tako utiču na koagulaciju krvi. Sprečavanjem sinteze prostaglandina, izostaje njihovo protektivno dejstvo na mukozu želuca zbog čega NSAIL mogu dovesti do ulkusa želuca ili njegove perforacije. Prostaglandini regulišu i protok krvi kroz bubrege, regulišu hidroelektolitnu ravnotežu, izlučivanje kalijuma, lučenje renina, održavanje krvnog pritiska zbog čega NSAIL izazivaju retenciju vode i natrijuma i pojavu edema, hiperkalijemiju, akutnu bubrežnu insuficijenciju. Neželjena dejstva NSAIL na kardiovaskularni sistem su hipertenzija, zastoja srčana insuficijencija i protrombotični događaji. Paracetamol je manje efikasan u odnosu na NSAIL. Između pojedinih NSAIL nema značajnih razlika u efikasnosti.

Glavne razlike između neopioidnih analgetika su u bezbednosti primene. U terapijskim dozama paracetamol ne izaziva ozbiljna neželjena dejstva, dok NSAIL mogu da izazovu brojna neželjena dejstva, ali i ozbiljna neželjena dejstva (Vučković, 2012).

Opioidni analgetici su lekovi koji se koriste u terapiji umerenih do jakih bolova različitog porekla. Koriste se u terapiji jakih akutnih bolova (npr. opekotine, trauma, infarkt miokarda, pre i posle hirurške intervencije i druge bolne procedure), umerenih do jakih bolova malignog porekla, umerenih do jakih hroničnih nemalignih bolova organskog porekla i jakih neuropatskih bolova. Opioidni analgetici su agonisti mi opioidnih receptora u centralnom i perifernom nervnom sistemu. U zadnjim rogovima kičmene moždine ovi receptori se nalaze presinaptički i postsinaptički. Presinaptički u centralnim nastavcima primarnih aferentnih neurona preko ovih receptora se smanjuje oslobađanje neurotransmitera u sinapsama, a postsinaptički se inhibiše supraspinalni prenos bolnog nadražaja. Supraspinalna aktivacija ovih receptora pojačava aktivnost u descedentnim inhibitornim putevima mozga. Periferni opioidni receptori se pojačano ekspimiraju kada postoji inflamacija i posredstvom njih se inhibira proces transdukcije bolnog nadražaja. Opioidni analgetici se dele na slabe, u koje spadaju tramadol, kodein i dekstropoksifen i jake analgetike, u koje spadaju morfin, fentanil, i dr. Za razliku od neopioidnih analgetika, kao i slabih opioidnih analgetika, jaki opioidni analgetici nemaju gornju granicu efikasnosti tj. mogu da otklone i najjače bolove. Opioidni analgetici ispoljavaju veliki broj neželjenih efekata. Najčešće neželjena dejstva su mučnina i povraćanje, opstipacija, suvoća usta, spazam žučnih puteva; veće doze mogu da izazovu rigiditet mišića, hipotenziju, kao i depresiju disanja. Ostala, česta neželjena dejstva su bradikardija, tahikardija, palpitacije, edemi, posturalna hipotenzija, halucinacije, euforija, disforija, zavisnost, vrtoglavica, konfuzija, pospanost, poremećaj spavanja, glavobolja, seksualna disfunkcija, otežano mokrenje, retencija urina, spazam uretera, mioza, znojenje, crvenilo kože, ospa, urtikarija i svrab. (Vučković, 2012).

Upravo zbog velikog broja neželjenih dejstava, sve je češća kombinacija standardnih analgetika međusobno, gde kombinujemo manje doze svakog od pojedinačno uzetog leka i time povećavamo efikasnost i bezbednost primene tj. smanjujemo neželjena dejstva. Razvoj adjuvantnih analgetika je od značaja za povećanje efikasnosti i bezbednosti primene analgetika.

Adjuvantni analgetici sa razlogom mogu da se svrstaju u treću grupu analgetika. Adjuvantni analgetici su raznorodna grupa lekova kojima primarna indikacija nije terapija bola, ali koji mogu da otklone bol u specifičnim bolnim stanjima. Dokazano je da oni primenjeni samostalno kao monoterapija ili u kombinaciji sa standardnim analgeticima imaju veću efikasnost i manje neželjenih dejstva. Pošto se često koriste u kombinaciji sa standardnim analgeticima nazivaju se i ko-analgeticima. Njihova efikasnost je pokazana kada postoji hroničan bol, glavobolja, muskuloskeletni, kancerski i neuropatski bol. Kako je za hroničan i neuropatski bol karakteristična senzitivizacija onda bi adjuvantni analgetici mogli biti efikasni i u lečenju inflamatornog bola. U ovu grupu lekova spadaju antidepresivi (triciklični antidepresivi-amitriptilin, selektivni inhibitori preuzimanja serotonina i/ili noradrenalina-fluoksetin, paroksetin, venlafaksin), antikonvulzivi (gabapentin, pregabalin, karbamazepin), miorelaksansi, kortikosteroidi (deksametazon, prednizon), antagonisti NMDA receptora (Vučković, 2012). Za razliku od opioidnih analgetika, adjuvantni analgetici imaju svoju maksimalnu efikasnost, a mogu i da izazovu i neželjena dejstva.

Za primenu analgetika u terapiji kancerskog bola preporučuje se princip „stepenica“, koji je promovisala Svetska zdravstvena organizacija. „**Princip stepenica**“, preporučuje tri stepenice u primeni analgetika:

- **Prva stepenica** se odnosi na lečenje blagog bola i tada se preporučuje primena neopioidnih analgetika, tj. paracetamola i NSAID-ova, sa i ili bez adjuvantnih analgetika.
- **Druga stepenica** je predviđena za lečenje blagog do umereno jakog bola. Koriste se neopioidi prve stepenice kojima se dodaju slabi opioidi (tramadol, kodein), sa ili bez adjuvantnih analgetika.
- **Treća stepenica** je lečenje umereno jakog i jakog bola gde se primenjuju jaki opioidi (morfin). Oni se mogu kombinovati sa neopioidnim ili adjuvantnim analgeticima. Blagi opioidi se ne koriste na ovoj stepenici.

1.9. NMDA antagonisti kao adjuvantni analgetici

Preklinička istraživanja su utvrdila da jonotropni glutamatni receptori imaju veliki značaj u patogenezi bola. Na osnovu ovih istraživanja, rađena su klinička ispitivanja analgetičkih efekata pojedinih antagonista NMDA receptorskog kompleksa, uglavnom u terapiji neuropatskog bola. Rezultati nisu usaglašeni, pa su i dalje u toku istraživanja velikog broja jedinjenja koja preko NMDA receptora deluju na neuropatski bol. Takođe, NMDA antagonisti smanjuju toleranciju na opioide i mogu povećati analgetički efekat opioida. Njihova efikasnost je limitirana pojavom značajnih dozno-zavisnih neželjenih efekata, kao što su nesvestica, vrtoglavica, umor, košmarni snovi i senzorne promene. Komercijano dostupni NMDA antagonisti koji se koriste kao adjuvantni analgetici u terapiji neuropatskog bola su ketamin, dekstrometorfan, memantin i amantadin. Dekstrometorfan je antitusik sa svojstvima blokade NMDA receptora, memantin se koristi u terapiji Alchajmerove bolesti, a amantadin kao lek protiv gripa. Među pobrojanim lekovima najbolje proučeni kao adjuvantni analgetici su ketamin i dekstrometorfan (Zhou i sar., 2011).

Ketamin je snažan antagonist NMDA receptora koji se primenjuje oralno, supkutano i intravenski u lečenju hroničnog regionalnog bolnog sindroma i drugih neuropatskih bolova. Neželjeni efekti su psihomimetički, nauzeja, povišen krvni pritisak, glavobolja i porast enzima jetre (Azari i sar., 2012). Ketamin je indikovao i u lečenju refraktarnog kancerskog bola (Bredlau i sar., 2013). Ketamin je kao adjuvantni analgetik efikasan u subanestetičkim dozama (Fitzgibbon i sar., 2002). Ketamin se primenjuje kako preoperativno, tako i postoperativno u cilju smanjenja bola. U postoperativnom lečenju bola on je efikasan kada se razvije tolerancija na opioide (Bell i sar., 2015). U hroničnom bolu koji se razvija posle povrede kičmene moždine ketamin dat u intravenskoj infuziji u niskim i ponovljenim dnevnim dozama u kombinaciji sa gabapentinom pokazao se efikasnim i bezbednim (Amr, 2010). Pokazano je i da intranazalno primenjen ketamin u obliku spreja smanjuje bol kod različitih neuropatskih stanja (Huge i sar., 2010).

Dekstrometorfan, amantadin i memantin su slabi NMDA antagonisti i zato izazivaju manje neželjenih efekata od strane CNS-a. Dekstrometorfan je efikasan u terapiji neuropatskog bola koji je izazvan dijabetesnom polineuropatijom, a nije efikasan kod

postherpetične neuralgije (Sang i sar., 2002; Thisted i sar., 2006). U nešto većoj dozi dekstrometorfan je efikasan u otklanjanju neuropatskog bola posle traumatskog oštećenja (Carlsson i sar., 2004). Iako se **memantin** koristi u terapiji demencije, predložen je za terapiju neuropatskog bola zbog mehanizma dejstva, sigurnosti, relativno brzog dejstva, malo ozbiljnih neželjenih dejstva (Rogers i sar., 2009).

1.9.1. Dizocilpin (MK-801)

Dizocilpin je nekompetitivni antagonist NMDA receptora. Vezuje se za fenciklidinsko mesto na receptoru. U odnosu na ostale NMDA antagoniste, on ima najveći afinitet za NMDA receptore (Davies i sar., 1988; Dravid i sar., 2007). Dizocilpin nema kliničku primenu jer je pokazano da oštećuje mozak pacova (Olney i sar., 1989). I pored toga koristi se u pretkliničkim istraživanjima za ispitivanje funkcije NMDA receptora u raznim stanjima i bolestima, kao što su psihijatrijske i neurodegenerativne bolesti i zbog toga ima veliki značaj u potrazi za novim terapijskim pristupima (Decollogne i sar., 1997; Boyce i sar., 1999; Suetake-Koga i sar., 2006). Pretklinički rezultati ukazuju da dizocilpin ima analgetsko, antioksidantno i neuroprotektivno dejstvo, a deluje i na procese učenja i pamćenja. Neuroprotektivno dejstvo je pokazao na modelima šloga, traume, Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (Jeong i sar., 2010; Im i sar., 2012; Wang i sar., 2014). Dizocilpin izaziva ataksiju i hiperlokomociju kod pacova (Suetake-Koga i sar., 2006). Dizocilpin je pokazao analgetički efekt u modelima neuropatskog (Begon i sar., 2000) i inflamatornog bola (Hama i sar., 2003; Andreassen i sar., 2013). Međutim, mehanizam dejstva u inflamatornom modelu nije u potpunosti razjašnjen.

1.9.2. Magnezijum

Magnezijum je fiziološki nekompetitivni NMDA antagonist koji blokira jonski kanal u receptoru na dozno-zavisan način (Fawcett i sar., 1999; Na i sar., 2011; Herroeder i sar., 2011). NMDA receptori su ligand-zavisni jonski kanali koji regulišu fiziološke procese kao što su učenje i memorija, transmisija bola, ali imaju ulogu i u nastanku hroničnog bola, šizofrenije i neurodegenerativnih bolesti kao što su moždani udar i depresija (Ogden i Traynelis, 2011). Međutim, magnezijum ima i druge funkcije u organizmu. On

je drugi glavni intracelularni katjon (posle kalijuma) i četvrti najzastupljeniji jon u organizmu (pored natrijuma, kalijuma i kalcijuma).

Magnezijum je mineral koji se nalazi u orašastim plodovima (orasi, lešnici, bademi), leguminozama (pasulj, soja) i u zelenom povrću (posebno u spanaću) gde ga ima više nego u voću (osim u bananama). Mleko i crveno meso imaju manju količinu magnezijuma. U vodi za piće se nalazi 10-120 mg/l magnezijuma. Voda za piće obezbeđuje oko 10% dnevnog unosa magnezijuma. Eksperimenti na pacovima su pokazali da voda koja sadrži kalcijum i magnezijum (tvrda voda) sprečava razvoj hipertenzije u odnosu na meku vodu koja dovodi do nastanka hipertenzije (Nedeljković i sar., 1994).

Dnevne potrebe za magnezijumom se razlikuju u odnosu na uzrast, pol, fiziološko stanje, psihički i fizički napor (National Institute of Health, Office of Dietary Supplements). Veće potrebe su prisutne u drugoj polovini trudnoće, pri umnom i fizičkom radu. Aktuelni optimalni dnevni unos magnezijuma iznosi 300-400 mg, tj. prosečne dnevne potrebe za magnezijumom iznose 4-6 miligrama po kilogramu telesne težine. Od toga 30-40% se resorbuje u ileumu. Pri povećanom dnevnom unosu (800 mg/dan) smanjuje se njegova resorpcija. Posle oralne primene soli magnezijuma apsorbuje se oko 1/3 unete doze. Na tržištu postoje preparati sa različitim solima/helatima magnezijuma: magnezijum-sulfat, magnezijum oksid, magnezijum hlorid, magnezijum citrat, magnezijum glukonat, magnezijum laktat, magnezijum aspartat. Magnezijum u obliku hlorida, aspartata i laktata se nakon oralne primene skoro kompletno resorbuje i ima mnogo veću bioraspoloživost, nego u obliku sulfata i oksida (Ranade i Somberg, 2001; Walker i sar., 2003; Kisters, 2013). Magnezijum u obliku sulfata se nakon *per os* primene resorbuje slabo, oko 4%. Kisela sredina, kao i vitamin D, povećava resorpciju magnezijuma. Jedino se magnezijum-sulfat može primeniti parenteralno, intravenski i intramuskularno, a moguće je i supkutano (Martínez-Riquelme i sar., 2005; Alfaro Martinez i sar., 2009). Bubrež je glavni organ preko koga se vrši izlučivanje magnezijuma. Oko 33% magnezijuma u plazmi podleže glomerularnoj filtraciji, a oko 67% ne podleže jer je vezan za proteine plazme, uglavnom albumine (Boron i sar., 2009). Svega 3-5% magnezijuma se izluči putem urina, a ostalo se reapsorbuje najvećim delom u Henleovoj petlji. Hipomagnezijemija je često povezana sa hipokalijemijom kada je poremećeno izlučivanje kalijuma preko

bubrega. U manjoj meri magnezijum se izlučuje i preko znoja i intestinalnih sekreta. Magnezijum se u velikim koncentracijama izlučuje u majčino mleko. Pokazano je da su novorođenčad majki koje su u terapiji eklampsije primale 4 g magnezijum-sulfata intravenski dobijala oko 1,5 mg više magnezijuma od novorođenčadi čije majke neposredno pred porođaj nisu primale magnezijum-sulfat (Cruikshank i sar., 1982). Kako je resorpcija magnezijuma u gastrointestinalnom traktu zavisna od unosa onda bubreg ima glavnu ulogu u regulisanju magnezijuma u organizmu. Na homeostazu magnezijuma u organizmu utiču i mnogi hormoni: paratireoidni, tireoidni, insulin, estrogeni, kortikosteroidi (Boron i sar., 2009). Paratireidni hormon povećava resorpciju u crevima, smanjuje izlučivanje putem bubrega, povećava koncentraciju ekstracelularnog magnezijuma. U prilog ovome govore rezultati da umerena hipomagnezijemija izaziva povećano lučenje parathormona. Tireoidni hormon povećava izlučivanje magnezijuma. Stoga su u hipertireoidizmu zbog povećanog metabolizma povećane i potrebe za magnezijumom. Insulin sa glukozom povećava ulazak magnezijuma u ćeliju. Suplementacija magnezijumom pokazala se efikasna kod pacijenata sa dijabetesnom polineuropatijom i niskom intracelularnom koncentracijom magnezijuma (Dasgupta i sar., 2012). Estrogeni povećavaju ulazak magnezijuma u ćeliju i normalizuju hipermagneziuriju preko TRPM6 kanala u bubrežnim tubulima (de Baaij i sar., 2012). Kortikosteroidi premeštaju magnezijum iz intracelularnog u ekstracelularni prostor.

U telu čoveka prosečne mase od 70 kg ima oko 25 g (od 20 do 28 g) magnezijuma, odnosno 822-1120 mmol, tj. približno 12,4 mmol (0,3 g)/kg TM. U intracelularnom prostoru se nalazi oko 99% magnezijuma, a u ekstracelularnom prostoru, primarno u serumu i eritrocitima, oko 1% (Jahnen-Dechent i Ketteler, 2012). Od ukupne količine magnezijuma u organizmu oko 50-60% se nalazi u kostima, a svega 0,3% u serumu (Volpe, 2012; Jahnen-Dechent i Ketteler, 2012). Magnezijum se u serumu nalazi u tri oblika: jonizovanom (slobodan, farmakološki aktivan; 50-70%), vezan za proteine (20-30%) ili u kompleksu sa anjonima (fosfatima, bikarbonatima, sulfatima; 5-15%). Količina intracelularnog magnezijuma nije u korelaciji sa ekstracelularnom, pa se ukupni magnezijum u organizmu, pored plazme, određuje i u tkivima dobijenim biopsijom (mišići, kosti). Prava koncentracija intracelularnog magnezijuma u organizmu određuje se njegovim odnosom prema azotu. Normalna koncentracija magnezijuma u

serumu/plazmi ne isključuje deficit magnezijuma u organizmu, jer hormoni i drugi faktori mogu povećati njegovu mobilizaciju iz ćelije. Preciznije je određivati količinu magnezijuma u eritrocitima, jer im je magnezijum, zajedno sa ATP-om neophodan za energiju (Witkowski i sar., 2011).

Magnezijum ima brojne fiziološke uloge u organizmu, one se grubo mogu podeliti na intracelularne i ekstracelularne (Roach i Benson, 2003; Long i Romani, 2014; Romani, 2014; Gröber i sar., 2015). Intracelularni magnezijum je kofaktor u više od 300 enzimskih reakcija u kojima učestvuje u aktivaciji enzima (kreatin kinaze, adenilatne ciklaze, tirozin kinaze, Na^+/K^+ -ATP-aze, i dr.), prometu energije u organizmu (jon magnezijuma se vezuje za ATP), održavanju membranskog potencijala u nervnim i mišićnim ćelijama (magnezijum je sastavni deo Na^+/K^+ -ATP-azne pumpe, jer se ATP nalazi u kompleksu sa magnezijumom; ovim mehanizmom magnezijum povećava potencijal mirovanja (utiče na razdražljivost ćelije) i skraćuje trajanje akcionog potencijala), reguliše nivo jona kalcijuma u citoplazmi glatkog, srčanog i skeletnog mišića (preko kalcijum i magnezijum zavisne ATP-azne pumpe), reguliše kontrakciju glatkog i poprečno-prugastog mišića, pomaže apsorpciju kalcijuma u GIT-u, kalijuma u bubregu, održava građu i funkciju DNK i RNK, reguliše metabolizam glukoze, masti (oksidacija masnih kiselina), proteina (i katabolizam i anabolizam), učestvuje i u aerobnoj i anaerobnoj proizvodnji energije, sprečava stvaranje kristala u urinu i ispoljava antiagregaciono dejstvo (magnezijum održava ATP, što otežava nastanak ADP i oslobađanje serotonin). Ekstracelularni magnezijum ima ulogu u održavanju električnog potencijala membrane nerava i mišića i reguliše nervno-mišićnu spojinu. Magnezijum reguliše rad jonskih kanala na membrani ćelije. On je antagonist kalcijuma. Magnezijum ima slične efekte kao blokatori kalcijumskog kanala.

Zbog svega gore navedenog magnezijum ispoljava sledeća dejstva: analgezija, mišićna relaksacija, vazodilatacija, antianginozno dejstvo, antihipertenzivno dejstvo, antikonvulzivno (sprečavanje eklampsije u trudnoći), antiaritmijsko dejstvo (lečenje aritmija izazvanih digitalisom), pospešuje dilataciju koronarnih i perifernih krvnih sudova, antimigrenozno dejstvo, neuroprotektivno dejstvo i dr. (Gröber i sar., 2015). Sa tim u vezi, hipomagnezijemija je povezana sa brojnim hroničnim i inflamatornim bolestima, kao što su: Alchajmerova bolest, astma, insulinska rezistencija, kardiovaskularne bolesti (hipertenzija, ateroskleroza), migrenska glavobolja,

osteoporoza, povećanom ekscitabilnošću nervnog i mišićnog tkiva zbog nedovoljnog unos K^+ u ćeliju. Kontraindikacije za primenu magnezijuma su AV blok, bubrežna insuficijencija i mijastenija gravis.

1.9.2.1. Magnezijum kao analgetik

Postoji malo podataka o analgetičkom dejstvu magnezijuma kada se sam primenjuje i oni se odnose na neuropatski (Vormann i sar., 2001; Begon i sar., 2000; Rondón i sar., 2010; Yousef i Al-Deeb, 2013) i postoperativni bol (Koltka i sar., 2011; Borazan i sar., 2012). Pokazano je da magnezijum može da poveća analgeziju izazvanu opioidima, opštim i lokalnim anestheticima u različitim modelima bola (Begon i sar., 2002b; Nechifor i sar., 2011). Magnezijum se kao analgetik ipak koristi u terapiji postoperativnog bola, iako su rezultati velikog broja kliničkih studija pokazali neusaglašene rezultate. Moguća neželjena dejstva su hipotenzija i u velikim dozama poremećaj srčanog ritma. Na osnovu rezultata 14 studija (ukupno 778 ljudi), zaključeno je da nema ubedljivih dokaza da magnezijum može biti adjuvantni analgetik u postoperativnom bolu (Lysakowski i sar., 2007). Međutim, rezultati jedne meta analize koja je obuhvatila 27 randomiziranih kontrolisanih kliničkih studija (1504 pacijenata) pokazali su da magnezijum ipak smanjuje postoperativni bol tokom ortopedskih, urogenitalnih, gastrointestinalnih i kardiovaskularnih operacija, kao i potrebu za analgeticima nakon operacije (Guo i sar., 2015). Brojna klinička ispitivanja su pokazala da magnezijum primenjen akutno ili hronično, *per os* ili intravenski, efikasno smanjuje glavobolju tokom migrene sa ili bez aure, skraćuje vreme trajanja migrene i smanjuje potrošnju drugih lekova (Bigal i sar., 2002; Shahrami i sar., 2015; Gaul i sar., 2015). Rezultati o analgetskom dejstvu magnezijuma u inflamatornom bolu su oskudni i kontroverzni (Takano i sar., 2000; Begon i sar., 2002b).

Analgetički efekt magnezijuma ne može se objasniti samo jednim mehanizmom dejstva. On ima različita dejstva u perifernim tkivima i CNS-u. Svoje efekte u CNS-u magnezijum ostvaruje posredstvom glutamatergičkog neurotransmiterskog sistema (blokiranjem NMDA receptora) i potenciranjem GABA-ergičke transmisije. Ključni mehanizam preko koga magnezijum ispoljava centralne efekte je blokada kalcijumovog kanala vezanog za NMDA receptore (Decollogne i sar., 1997). Pokazano je i da

magnezijum redukuje aktivnost presinaptičkih i postsinaptičkih kalcijumskih kanala, modulira oslobađanje neurotransmitera. Magnezijum ima modulatorno dejstvo na natrijumske i kalijumske kanale, i tako može da utiče na membranski potencijal (Herroeder i sar., 2011). Magnezijum smanjuje intenzitet i trajanje migrene delujući na receptore za serotonin, sintezu i oslobađanje NO-a i NMDA receptore u mozgu. Serotonin je ključan za proces nastanka migrene. Kod skoro 50% osoba koje pate od migrene, primećena je niska koncentracija magnezijuma u krvi (Mauskop i Altura, 1998). Magnezijum smanjuje i stvaranje supstance P, zahvaljujući čemu može smanjiti bol u leđima, grčeve u mišićima i slabost u mišićima kod fibromialgije (Tong i sar., 2008). U perifernim strukturama magnezijum utiče na $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -azu i na funkciju kalcijum zavisne protein kinaze C (Murck, 2002). Magnezijum inhibira oslobađanje acetilholina (Ishizaki i sar., 1999), a ima modulatorno dejstvo na kateholamine u centralnom i perifernom nervnom sistemu.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati antinociceptivni i antiedematozni efekt različitih doza magnezijum-sulfata/dizocilpina na modelu somatskog inflamatornog bola, izazvanog mehaničkim pritiskom nakon intraplantarne aplikacije proinflamatornog agensa, karagenina u šapu pacova i utvrditi odnos između doze i efekta.
2. Ispitati antinociceptivne efekte različitih doza magnezijum-sulfata/dizocilpina na modelu visceralnog inflamatornog bola, izazvanog intraperitonealnom aplikacijom sirćetne kiseline u trbušnu duplju pacova i utvrditi odnos između doze i efekta.
3. Ispitati prisustvo mehaničke hiperalgezije nakon lokalne intraplantarne injekcije različitih koncentracija magnezijum-sulfata/dizocilpina u intaktnu šapu pacova i utvrditi odnos između koncentracije i efekta.
4. Ispitati učešće azotnog oksida ili TRP receptora u mehanizmima dejstva magnezijum-sulfata/dizocilpina.
5. Ispitati efekte magnezijum-sulfata/dizocilpina na motornu koordinaciju pacova koristeći rotarod test.

3. MATERIJAL I METODE

Doktorska disertacija je urađena u Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

3.1. Eksperimentalne životinje

Pre početka eksperimenata, dobijena je dozvola za rad sa životinjama. Eksperimenti su odobreni od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, i u skladu su sa Zakonom o dobrobiti životinja u Republici Srbiji (dozvola broj 4946/2-2012 i 5362/2-2014) i vodičem Internacionalnog udruženja za proučavanje bola (IASP).

Eksperimenti su izvedeni na mužjacima pacova soja Wistar albino, telesne mase 220-290 grama (Vivarijum Vojnomedicinske akademije u Beogradu). Pacovi su bili smešteni u transparentnim kavezima od pleksiglasa (42,5 x 27 x 19 cm) obloženim šuškom, sa žičanom rešetkom postavljenom odozgo. Hrana (specijalni briketi za ishranu eksperimentalnih životinja) i voda bili su dostupni 24 h, bez ograničenja osim tokom trajanja eksperimenta. Nakon eksperimenta, životinje su žrtvovane akutnom intraperitonealnom primenom velike doze anestetika (tiopenton-natrijum).

3.2. Supstance i njihova primena

U eksperimentima su korišćene sledeće supstance:

- magnezijum-sulfat (Magnesio Solfato; S.A.L.F. Spa-Cenate Sotto-Bergamo, Italija)
- dizocilpin (dizocilpine maleate; (+)-dizocilpine hydrogen maleate; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

- L-arginin (L-arginine hydrochloride; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD),
- L-NPA (N-ω-Propyl-L-arginine hydrochloride; Tocris Bioscience, Bristol, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- ARL-174777 (ARL dihydrochloride N-[4-[2-[[[(3-Chlorophenyl) methyl]amino] ethyl]phenyl]-2- thiophenecarboxamide dihydrochloride; Tocris Bioscience, Bristol, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- SMT (S-methylisothiurea; Tocris Bioscience, Bristol, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- metilensko plavo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- glibenklamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- kamfor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- HC-030031 (2-(1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4 isopropylphenyl) acetamide; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- kapsazepin ((N-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-2H-2-benzazepine-2-carbothioamide; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- RN-1734 (2,4-Dichloro-N-isopropyl-N-(2-isopropylaminoethyl) benzene-sulfonamide; Tocris Bioscience, Bristol, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- amilorid (Amiloride hydrochloride hydrate; N-Amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazinecarboxamide hydrochloride hydrate; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- diklofenak (Diklofenak u obliku natrijumove soli, Galenika, Beograd, Srbija)
- sirćetna kiselina (MSK, Kikinda, Srbija)
- karagenin (λ-carrageenan; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- AITC (Alil izotiocijanat (ulje senfa), Allyl isothiocyanate Pestanal, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Kapsaicin (Capsaicine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

Sistemska primena supstanci

Magnezijum-sulfat, dizocilpin, L-NAME, L-arginin, L-NPA, SMT, metilensko plavo i sirćetna kiselina su rastvarani u fiziološkom rastvoru (0,9% m/V rastvor natrijum hlorida u redestilovanoj sterilisanoj vodi). Glibenklamid je rastvaran u alkoholu (97% m/v).

Supstance su ubrizgavane supkutano (s.c.) u leđa (magnezijum, dizocilpin, L-arginin) ili intraperitonealno (i.p.) (L-NAME, L-NPA, SMT, metilensko plavo, sirćetna kiselina) u konačnoj zapremini od 2 ml/kg telesne mase, osim sirćetne kiseline koja je injektovana u zapremini od 10 ml/kg telesne mase pacova.

Magnezijum-sulfat ili dizocilpin je ubrizgan 5 min pre (pretretman) ili 2 h posle (tretman) karagenina, a 15 min pre sirćetne kiseline. U pretretmanu se ispituju supstance daju pre, a u tretmanu posle izazivanja inflamacije šape karageninom. Svi antagonisti (L-NAME, L-NPA, SMT, metilensko plavo, glibenklamid) su injektovani 10 min pre magnezijum-sulfata ili dizocilpina, dok je L-arginin ubrizgan istovremeno sa magnezijum-sulfatom, ali na drugoj strani leđa. Karagenin (0,5%) je ubrizgan intraplantarano (i.pl.) u zadnju desnu šapu u količini od 0,1 ml.

U kontrolnoj grupi pacova fiziološki rastvor (0,9% NaCl), ili alkohol (97% m/v) kod glibenklamida, je primenjen supkutano ili intraperitonealno u ukupnoj zapremini od 2 ml/kg, kako bi se ispitalo da li fiziološki rastvor (ili alkohol) ima bilo kakav uticaj na prag bola ili bolno ponašanje ili na volumen šape pacova. U eksperimentima sa antagonistima, u kontrolnoj grupi ubrizgavane su najveće doze antagonista, izostavljajući primenu magnezijum-sulfata i dizocilpina, kako bi ispitali da li oni *per se* imaju analgetički ili antiedematozni efekt.

Lokalna periferna primena supstanci

Sve supstance (magnezijum-sulfat, dizocilpin, L-NAME, ARL-174777, SMT, metilensko plavo, kamfor, HC-03031, kapsazepin, RN-1734, amilorid, diklofenak, karagenin, sirćetna kiselina, AITC, kapsaicin) su date potkožno, intraplantarano (i.pl.) u zadnju šapu pacova, u konačnoj zapremini od 0,1 ml po šapi pacova.

Magnezijum-sulfat i dizocilpin su rastvarani u 0,9% NaCl ili destilovanoj vodi. L-NAME, ARL-174777, SMT, metilensko plavo, diklofenak i kamfor rastvarani su u destilovanoj vodi. Karagenin (0,5% m/v) je dispergovan u fiziološkom rastvoru 24 h pre izvođenja eksperimenta. Rastvor sirćetne kiseline (0,6% m/v) napravljen je u fiziološkom rastvoru na dan eksperimenta. Štok rastvor AITC-a napravljen je u propilen glikolu, a kapsaicina, kapsazepina, RN-1734, HC-030031 ili amilorida u DMSO, dok su finalna eksperimentalna razblaženja napravljena u destilovanoj vodi na dan eksperimenta (konačne koncentracije DMSO je <1 %).

Nakon bazalnih merenja, da bi ispitali lokalno periferno analgetičko i antiedematozno dejstvo, magnezijum-sulfat ili dizocilpin su injektovani sa karageninom u sklopu iste injekcije (ipsilateralno) i.pl. u zadnju desnu šapu pacova. Kontrolnoj grupi pacova i.pl. je ubrizgan karagenin u istoj zapremini i rastvaraču (0,9% NaCl).

U sastavu jedne i.pl. injekcije (ipsilateralno) ubrizgavan je magnezijum-sulfat sa antagonistima sa ciljem da se ispita inhibitorno dejstvo lokalno periferno primenjenih antagonista na lokalno periferno hiperalgezijsko dejstvo magnezijum-sulfata. Kontrolnoj grupi pacova i.pl. je ubrizgan magnezijum-sulfat u istoj zapremini i rastvaraču (destilovana voda ili DMSO).

Jednom i.pl. injekcijom ubrizgani su AITC ili sirćetna kiselina ili kapsaicin sa ispitivanim supstancama kako bi testirali antinociceptivno dejstvo supstanci. Kontrolnoj grupi pacova i.pl. je ubrizgana neka od pronociceptivnih supstanci u istoj zapremini i rastvaraču (destilovana voda ili DMSO).

Da bi se isključilo moguće sistemsko dejstvo ispitivanih supstanci zbog resorpcije sa mesta primene, najveća doza svake ispitivane supstance je rastvorena u 0,9% NaCl ili destilovanoj vodi i ubrizgana i.pl. kontralateralno (tj. u levu zadnju šapu), neposredno pre injekcije u desnu šapu.

Da bi ispitali da li supstance imaju neki uticaj na ispitivane parametre na intaktnoj (zdravoj) šapi pacova, najviše ispitivane doze su rastvorene u 0,9% NaCl ili destilovanoj vodi i ubrizgane su i.pl. u posebnoj grupi pacova.

3.3. Eksperimentalni dizajn (1-6)

Prvi deo istraživanja se odnosi na farmakodinamska ispitivanja magnezijum-sulfata na modelu somatskog i visceralnog bola. Ispitana je jačina, trajanje i mehanizam analgetičkog i antiinflamatornog dejstva magnezijum-sulfata nakon sistemske i lokalne primene. Pod istim eksperimentalnim uslovima ispitana su i farmakodinamska dejstva dizocilpina, u okviru kojih je ispitana jačina, trajanje i mehanizam analgetičkog i antiinflamatornog dejstva nakon njegove sistemske ili lokalne primene. Na kraju, ispitivanjem motorne kordinacije ispitana su neka od mogućih neželjenih dejstva magnezijum-sulfata ili dizocilpina nakon sistemske primene. Drugi deo istraživanja odnosi se na ispitivanje lokalnog pronociceptivnog dejstva i mehanizma tog dejstva magnezijum-sulfata u intaktnoj šapi pacova.

1. *Adaptacija životinja na eksperimentalnu proceduru*

Kako bi se smanjile varijacije spoljne sredine u bihevioralnim testovima, svi eksperimenti su izvođeni od strane istog eksperimentatora, pri konstantnim uslovima spoljne sredine (temperatura 21 ± 1 °C; vlažnost 55 ± 5 %; ciklus svetlo-tama na 12 h). Eksperimenti su izvođeni uvek u isto vreme (od 8-16 h), kako bi se izbegle cirkadijalne varijacije u bihevioralnim testovima.

Dva uzastopna dana pre samog eksperimenta, životinje su se navikavale na eksperimentalnu proceduru tj. na boravak u laboratoriji i u komorama od pleksiglasa, rukovanje. Životinje su se na dan eksperimenta unosile u laboratoriju jedan sat pre eksperimenta da bi se adaptirale na uslove okoline. Pri ispitivanju bola pacovi su bili nesputani, postavljeni u pojedinačne kaveze/komore od pleksiglasa. Eksperimentalne grupe su imale 6-8 životinja koje su se koristile samo jednom.

2. *Eksperimentalna procedura*

Nakon navikavanja na laboratorijske uslove, kod određenih eksperimenata sprovedena su kontrolna merenja praga bola na mehanički stimulus i volumena šape. Merenja su se na svakom pacovu sprovodila nekoliko puta, na osnovu čega je izračunata prosečna vrednost tri bliske vrednosti. Nakon toga životinje su dobijale lek i/ili rastvarač intraperitonealno ili supkutano ili intraplantarno i pristupalo se merenju dejstva leka, sa i bez antagoniste, na prag bola ili na karakteristično bolno ponašanje ili edem šape u

određenim vremenskim tačkama ili intervalima. Za svaku vrstu eksperimenta postojala je kontrolna grupa koja je u isto vreme, na isti način i u istoj zapremini dobijala rastvarač tj. fiziološki rastvor (0,9% NaCl) ili alkohol (kada je primenjivan glibenklamid) ili DMSO (kada su primenjivani antagonisti TRP kanala) i bila je izložena istoj eksperimentalnoj proceduri.

3. *Antihiperalgezija* je ispitivana pomoću mehaničkog stimulusa metodom pritiska na šapu pacova.
4. *Antinocicepcija* je ispitivana metodom brojanja karakterističnog bolnog ponašanja ili merenja vremena provedenog u istom.
5. *Promene u volumenu šape* pacova merene su pletizmometrom.
6. *Dejstvo na motornu kordinaciju* pacova registrovano je rotarod testom.

3.4. Metode

3.4.1. Modeli somatskog bola

3.4.1.1. Karageninom indukovana inflamatorna hiperalgezija i edem šape

Indukcija inflamacije

Inflamacija je izazvana i.pl. injekcijom karagenina (0,5%) u zadnju desnu šapu, što je praćeno razvojem hiperalgezije i edema šape (slika 4). Karageninska inflamacija je akutna, neimunska i visoko reproducibilna. Posredovana je oslobađanjem medijatora zapaljenja: najpre histamnina i serotoninina, a zatim bradikinina i prostaglandina (PGE₂), koji aktiviraju nociceptore i/ili povećavaju njihovu osetljivost u tkivu šape koje je inflamirano. Za karageninsku inflamaciju karakteristična je hiperprodukcija NO-a (Omote i sar., 2001).



Slika 4. Karageninom-izazvana inflamacija u šapi pacova.

Testiranje hiperalgezije

Za određivanje hiperalgezije korišćen je modifikovan test pritiska na šapu pacova (*eng.* „paw pressure test,,). Test predstavlja modifikaciju Randall i Sellito metode. Mehanički bolni stimulus primenjen je pomoću elektronskog von-Frey aparata (electronic von Frey Anesthesiometer, Model Almemo 2390-5, IITC Life Science, Woodland Hills, USA) (slika 5). Aparat precizno meri (u gramima) intezitet pritiska polietilenskog filameta na plantarnu površinu šape sve dok se ne pojavi bol koja se manifestuje podizanjem šape. Izmerena vrednost (težina u gramima) se prikazuje na displeju uređaja. Dakle, merni parametar je prag bola (težina u gramima), tj. intezitet pritiska na šapu koji pacov može da izdrži dok ne oseti bol (prag povlačenja šape ili *eng.* „paw withdrawal threshold,, - PWT). Nakon kontrolnog merenja ubrizgava se karagenin sa ili bez leka i/ili rastvarača i nastavljaju se merenje hiperalgezije posle 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 i 6 sati od davanja karagenina sa ili bez leka/rastvarača. Takođe, za eksperimente u tretmanu hiperalgezija je praćena 6 sati od injekcije karagenina, ali se registrovala od trećeg sata na svakih sat vremena. Na svakom pacovu merenja su se vršila nekoliko puta u svakoj vremenskoj tački. Na osnovu tri bliske vrednosti za svakog pacova je izračunata prosečna vrednost pritiska, koja se koristila u daljim izračunavanjima (Asghar i sar., 2000; Srebro i sar., 2014a; Srebro i sar., 2014b).



Slika 5. Kutija od pleksiglasa na čeličnom stalku (gore). Sonda sa filamentom i aparat-elektronski von Fray analgeziometar.

Testiranje edema šape

Promena u volumenu šape (izražena u mililitrima, ml) kao posledica izazivanja inflamacije je merena pomoću pletizmometra (Plethysmometer (Paw Volume) Meter, Model Almemo 2390-5, IITC Life Science, Woodland Hills, USA) (slika 6). Šapa (do visine tarzalnog zgloba) se potapa u cilindar aparata koji je napunjen vodom. Aparat meri volumen istisnute tečnosti usled potapanja šape, po principu *Arhimed*-ovog zakona. Izmerena vrednost (u ml) se prikazuje na displeju uređaja. Nakon kontrolnog merenja volumena šape ubrizgava se karagenin sa ili bez leka i/ili rastvarača i nastavlja se merenje volumena šape od 1,5 do 6,5 sati, na svakih sat vremena, od davanja karagenina. Za eksperimente u tretmanu volumen šape se meri od 3,5 do 6,5 sati, od injekcije karagenina. Na svakom pacovu merenja su se vršila nekoliko puta u svakoj vremenskoj tački. Na osnovu tri bliske vrednosti za svakog pacova je izračunata

prosečna vrednost volumena šape, koja se koristila u daljim izračunavanjima (Chattopadhyay i sar., 2010).



Slika 6. Pletizmometar – aparat za merenje volumena (edema) šape.

Analiza rezultata

U eksperimentalnom modelu karageninom-indukovane hiperalgezije i edema šape ispitivali smo:

- efekte rastućih doza sistemski i lokalno primenjenog magnezijum-sulfata i dizocilpina na pojavu bola i otoka šape pacova
- uticaj različitih antagonista na sistemski efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina na bol i edem šape

Analiza efekta i dužine trajanja dejstva lekova na bol

Na modelu mehaničkog inflamatornog bola određivana je inhibicija karageninske hiperalgezije tj. jačina i trajanje analgetičkog efekta magnezijum-sulfata i dizocilpina. U pretretmanu se ispitivane supstance date pre, a u tretmanu posle izazivanja inflamacije šape karageninom. Magnezijum-sulfat ili dizocilpin je ubrizgan 5 min pre (pretretman) ili 2 h posle (tretman) karagenina. Karagenin (0,5%) je ubrizgan intraplantarno (i.pl.) u zadnju desnu šapu u količini od 0,1 ml. U kontrolnoj grupi pacova fiziološki rastvor (0,9% NaCl) primenjen na isti način i u istoj količini, kako bi se ispitalo da li fiziološki

rastvor ima bilo kakav uticaj na prag bola. U eksperimentima se antagonistima, u kontrolnoj grupi ubrizgavane su najveće doze antagonista/inhibitora, izostavljajući primenu magnezijum-sulfata i dizocilpina, kako bi ispitali da li oni *per se* imaju analgetički efekt.

Intenzitet hiperalgezije izazvan karageninom je izražen kao razlika pritiska [d (g)] koji izaziva podizanje šape pacova pre i posle injekcije karagenina za svakog pacova u grupi, prema sledećoj formuli (Milovanovic i sar., 2009; Srebro i sar., 2014a; Srebro i sar., 2014b):

d(g) = srednji pritisak (g) koji izaziva bol pre karagenina – srednji pritisak (g) koji izaziva bol posle karagenina

Prosečna vrednost sa standardnom greškom razlike u pritisku svih pacova je zatim izračunata i korišćena u daljim ispitivanjima.

Da bi ispitali da li neki lek smanjuje bol, za svakog pacova u grupi intenzitet hiperalgezije izražen je kao razlika pritiska [d(g)] koji izaziva podizanje šape pre (srednji bazalni prag bola, kontrola) i posle injekcije karagenina i leka koji se ispituje, prema sledećoj formuli (Milovanovic i sar., 2009; Srebro i sar., 2014a; Srebro i sar., 2014b):

d(g) = srednji pritisak (g) koji izaziva bol pre karagenina i leka – srednji pritisak (g) koji izaziva bol posle karagenina i leka (test)

Antihiperalgezijska aktivnost svakog leka, u različitim dozama, za svakog pacova u grupi, u svakoj vremenskoj tački je izražena kao procenat analgetičkog dejstva (AA%) i izračunata je po sledećoj formuli (Vuckovic i sar., 2006):

$$\%AA = [(kontrola\ dg - test\ dg\ za\ svakog\ pacova) / kontrola\ dg] \times 100,$$

gde *kontrola dg* predstavlja srednju razliku pritiska koji izaziva bol u kontrolnoj tj. karageninskoj grupi, a *test dg* predstavlja srednju razliku pritiska koji izaziva bol u grupi gde se ispituje lek (karagenin + lek). Ako je testirana grupa imala d veće od kontrolne grupe, %AA je označen kao 0. Prosečna vrednost sa standardnom greškom %AA svih pacova je zatim izračunata.

Za utvrđivanje trajanja efekta nekog leka, kao i za određivanje vremena dostizanja maksimalnog efekta, korišćeni su izvorni podaci (bol u g). Trajanje efekta je definisano kao vreme u prvoj i poslednjoj tački u kojoj postoji statistički značajna razlika između grupa koje su primale lek i kontrolne grupe.

Analiza efekta i dužine trajanja dejstva lekova na edem šape

Paralelno sa ispitivanjem bola, ispitivali smo i edem šape koji je nastao kao posledica inflamacije izazvane karageninom. Zatim smo ispitali kakav efekt magnezijum-sulfat i dizocilpin imaju na edem šape. Da bi ispitali mehanizam dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpina na edem šape, koristili smo različite antagoniste.

Proedematozna aktivnost karagenina je izražena kao razlika u volumenu šape [d(v)] izmerena posle (test volumen) i pre injekcije (kontrolni, bazalni volumen) karagenina za svakog pacova u grupi, u svakoj vremenskoj tački, prema formuli (Koeberle i sar, 2011):

d(v) = srednji volumen (ml) posle karagenina (test v) – srednji volumen (ml) pre karagenina (bazalni v)

Prosečna vrednost sa standardnom greškom razlike u volumenu svih pacova u grupi je zatim izračunata i korišćena u daljem ispitivanju.

Da bi ispitali da li neki lek smanjuje otok nastao usled zapaljenja, za svakog pacova u grupi, u svakoj vremenskoj tački, promena volumena šape je izražena kao razlika u

volumenu [d(v)] šape izmerena posle i pre injekcije karagenina i leka koji se ispituje, prema sledećoj formuli:

d(v) = srednji volumen (ml) posle karagenina i leka (test v) – srednji volumen (ml) pre karagenina i leka (bazalni v)

Prosečna vrednost sa standardnom greškom razlike u volumenu svih pacova je zatim izračunata i korišćena u daljem ispitivanju.

Sposobnost leka da u različitim dozama smanji razliku u volumenu šape je izražena kao procenat antiedematoznog dejstva (AE%) i izračunata je za svakog pacova u grupi, u svakoj vremenskoj tački, po sledećoj formuli (Ren i sar., 2007):

$$\%AE = [1 - \text{kontrola } dv / \text{test } dv \text{ za svakog pacova}] \times 100,$$

gde *kontrola dv* predstavlja srednju razliku volumena kontrole grupe, koja je dobila karagenin, a *test dv* predstavlja srednju razliku volumena za svakog pacova u grupi, koja je dobila karagenin i ispitivani lek. Ako je testirana grupa imala d veće od kontrolne grupe, %AE je označen kao 0. Prosečna vrednost sa standardnom greškom %AE svih pacova je zatim izračunata.

Za utvrđivanje trajanja efekta nekog leka, kao i za određivanje vremena dostizanja maksimalnog efekta, korišćeni su izvorni podaci (volumen u ml). Trajanje efekta je definisano kao vreme u prvoj i poslednjoj tački u kojoj postoji statistički značajna razlika između grupa koje su primale lek i kontrolne grupe.

Analiza dejstva antagonista na efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina

U cilju ispitivanja mehanizama antihiperalgezijskog i antiedematoznog dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpina, praćen je uticaj sledećih antagonista:

- L-NAME, neselektivni inhibitor NOS

- L-NPA, selektivni inhibitor nNOS
- SMT, selektivni inhibitor iNOS
- L-arginin, prekursor sinteze NO-a

Svi antagonisti (L-NAME, L-NPA, SMT) su injektovani 10 min pre magnezijum-sulfata ili dizocilpina, dok je L-arginin ubrizgan istovremeno sa magnezijum-sulfatom, ali na drugoj strani leđa. U eksperimentima se antagonistima, u kontrolnoj grupi ubrizgavane su najveće doze antagonista, izostavljajući primenu magnezijum-sulfata i dizocilpina, kako bi ispitali da li oni *per se* imaju analgetski ili antiedematozni efekt.

Procenat inhibicije antihiperalgezijske aktivnosti u prisustvu antagoniste izračunat je prema sledećoj formuli (Milovanovic i sar., 2009):

$$\%I = 100 - [(\%AA \text{ antagonist i lek} / \%AA \text{ lek}) \times 100]$$

Procenat inhibicije antiedematozne aktivnosti u prisustvu antagoniste izračunat je po sledećoj formuli:

$$\%I = 100 - [(\%AE \text{ antagonist i lek} / \%AE \text{ lek}) \times 100]$$

Za utvrđivanje trajanja efekta nekog leka, kao i za određivanje vremena dostizanja maksimalnog efekta, korišćeni su izvorni podaci (bol u g, volumen u ml). Trajanje efekta je definisano kao vreme u prvoj i poslednjoj tački u kojoj postoji statistički značajna razlika između grupa koje su primale lek i kontrolne grupe.

3.4.1.2. Magnezijum-sulfatom indukovana hiperalgezija i edem šape

Indukcija hiperalgezije

Intraplantarna injekcija rastućih doza magnezijum-sulfata u zadnju desnu šapu pacova izazva perifernu hiperalgeziju, bez edema šape. Najveća ispitivana doza magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi ili 25 μ mol/šapi) odgovara izotoničnom rastvoru magnezijum-sulfata (6,2% ili 250 mmol/l), sa pH vrednošću od 5,9-6,1 (Srebro i sar., 2015).

Testiranje hiperalgezije i edema šape

Bol je merena primenom mehaničkog stimulusa elektronskim von Frey testom. Potapanje šape u pletizmometar je korišćeno za merenje volumena šape. Postupak merenja i računanja izmerenih parametara je isti kao što je opisan kod karageninom-indukovane mehaničke hiperalgezije i edema.

Analiza rezultata

U eksperimentalnom modelu magnezijum-sulfatom-indukovane hiperalgezije ispitivali smo:

- efekte rastućih doza lokalno periferno primenjenog magnezijum-sulfata na pojavu bola i otoka šape pacova
- efekte pH nekorigovanog i pH korigovanog rastvora magnezijum-sulfata na pojavu bola
- uticaj različitih lokalno periferno primenjenih antagonista na hiperalgezijski efekt lokalno periferno primenjenog magnezijum-sulfata

Ispitivanje dejstva magnezijum-sulfata na prag bola nakon lokalne periferne primene

Neposredno nakon merenja bazalnih vrednosti praga bola u gramima, magnezijum-sulfat je primenjen potkožno (i.pl.) u taban šape pacova. U posebnim grupama životinja, ispitivane su rastuće doze magnezijum-sulfata. Kontrolna grupa dobijala je rastvarač

(0,9% NaCl, ili destilovanu vodu) na isti način i u istoj zapremini. Da bi se isključila sekundarna hiperalgezija, u posebnoj grupi životinja, meren je prag bola kontralateralno (tj. na levoj šapi). Test merenja su vršena 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 i 6 sati nakon injekcije magnezijum-sulfata. Za testiranje edema šape, sve je na isti način sprovedeno, samo je merni parametar volumen šape.

Intenzitet hiperalgezije izazvan magnezijum-sulfatom je izražen kao razlika pritiska [d(g)] koji izaziva podizanje šape pacova pre i posle injekcije magnezijum-sulfata za svakog pacova u grupi, prema sledećoj formuli:

d(g) = srednji pritisak (g) koji izaziva bol pre magnezijum-sulfata – srednji pritisak (g) koji izaziva bol posle magnezijum-sulfata

Prosečna vrednost sa standardnom greškom razlike u pritisku svih pacova u grupi je zatim izračunata i korišćena u daljim ispitivanjima.

Ispitivanje uticaja pH rastvora magnezijum-sulfata na prag bola nakon lokalne periferne primene

U cilju ispitivanja da li pH rastvora magnezijum-sulfata utiče na pojavu bola izmerili smo pH tog rastvora, a zatim ispitali efekte pH nekorigovanog (5,9-6,1) i korigovanog (7,4) rastvora magnezijum-sulfata na pojavu bola. Izotonični pH ne korigovan ili pH korigovan rastvor magnezijum-sulfata je korišćen u daljim eksperimentima da bi se istražio mogući mehanizam dejstva. Intenzitet hiperalgezije je meren i izračunat na isti način kao što je prethodno navedeno.

Ispitivanje dejstva različitih antagonista na hiperalgezijski efekt lokalno perifereno primenjenog magnezijum-sulfata

U cilju ispitivanja mehanizama hiperalgezijskog dejstva magnezijum-sulfata, praćen je lokalni uticaj sledećih antagonista:

- kamfor, neselektivni antagonist TRPA1 receptora

- HC-030031, selektivni antagonist TRPA1 receptora
- kapsazepin, selektivni antagonist TRPV1 receptora
- RN-1734, selektivni antagonist TRPV4 receptora
- amilorid, selektivni antagonist ASIC3 kanala
- dizocilpin, selektivni antagonist NMDA receptora
- L-NAME, neselektivni inhibitor NOS
- ARL-174777, selektivni inhibitor nNOS
- SMT, selektivni inhibitor iNOS
- metilensko plavo, neselektivni inhibitor gvanilatne ciklaze
- diklofenak, neselektivni inhibitor COX

U jednoj i.pl. injekciji su primenjeni magnezijum-sulfat i određeni antagonist. U posebnim grupama životinja, ispitivane su po 2 do 3 doze svakog antagoniste. U posebnim grupama životinja, u pH nekorigovanom i korigovanom rastvoru magnezijum-sulfata ispitivan je i efekt najveće doze antagonista koji mogu biti povezani sa kiselim uslovima sredine. Svaka kontrolna grupa dobijala je samo i.pl. injekciju magnezijum-sulfata, u istoj zapremini. Posebne grupe pacova dobile su najveće ispitivane doze antagonista kontralateralno (tj. u levu šapu), neposredno pre injekcije magnezijum-sulfata u desnu šapu, da bi isključili moguće sistemske efekte antagonista usled resorpcije sa mesta primene (i.pl.). Takođe, da bi utvrdili da li antagonisti imaju *per se* uticaj na prag bola, ispitane su najveće korišćene doze antagonista, bez primene magnezijum-sulfata. Test merenja su vršena 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 i 6 sati nakon injekcije magnezijum-sulfata.

Antihiperalgezijska aktivnost svakog antagoniste za svakog pacova u grupi, u svakoj vremenskoj tački izražena je u procentima analgetičke aktivnosti (AA%) i izračunata je po sledećoj formuli:

$$\%AA = [(kontrola\ dg - test\ dg) / kontrola\ dg] \times 100,$$

gde *kontrola dg* predstavlja srednju razliku pritiska koji izaziva bol u kontrolnoj grupi (magnezijum-sulfat), a *test dg* predstavlja srednju razliku pritiska koji izaziva bol za svakog pacova u grupi koja je dobijala magnezijum-sulfat i određenog antagonistu. Ako je testirana grupa imala dg veće od kontrolne grupe, %AA je označen kao 0.

Za utvrđivanje trajanja efekta nekog leka, kao i za određivanje vremena dostizanja maksimalnog efekta, korišćeni su izvorni podaci (bol u g). Trajanje efekta je definisano kao vreme u prvoj i poslednjoj tački u kojoj postoji statistički značajna razlika između grupa koje su primale lek i kontrolne grupe.

3.4.1.3. AITC-om/kapsaicinom indukovana mehanička hiperalgezija

Indukcija hiperalgezije

I.pl. injekcija kapsaicina (100 nmol) ili AITC (0,05%) predstavlja model akutnog bola izazvanog iritantnom (algogenom) supstancom (Walker i sar., 2003; Wang i sar., 2013). Svaka supstanca je data u konačnoj zapremini od 0,1 ml po šapi pacova. Svaka kontralna grupa je dobila rastvarač u istoj zapremini na isti način.

Testiranje hiperalgezije

Bol je merena primenom mehaničkog stimulusa elektronskim von Frey testom. Postupak merenja bola i izračunavanja parametara je isti kao što je opisano kod karageninske mehaničke hiperalgezije.

Analiza rezultata

Da bi ispitali da li diklofenak smanjuje magnezijum-sulfatom indukovanu mehaničku hiperalgeziju blokadom ASIC i TRP kanala, ispitali smo iste efekte istih doza diklofenaka i na mehaničkoj hiperalgeziji indukovanoj sledećim direktnim agonistima: AITC-om za TRPA1, kapsaicinom za TRPV1, sirćetnom kiselinom za ASIC receptore.

Diklofenak je dat istovremeno sa agonistom u obliku jedne i.pl. injekcije. U posebnim grupama životinja, ispitivane su po 2 do 3 doze diklofenaka posebno sa svakim agonistom. Svaka kontrolna grupa dobijala je samo i.pl. injekciju agoniste ili rastvarača, u istoj zapremini.

Postupak izračunavanja parametara je isti kao što je opisano kod magnezijum-sulfatom indukovane mehaničke hiperalgezije.

3.4.1.4. AITC-om/kapsaicinom/sirćetnom kiselinom indukovano bolno ponašanje pacova

Indukcija nociceptivnog odgovora

I.pl. injekcija AITC (0,05%), kapsaicina (100 nmol) ili sirćetne kiseline (0,6%) (Perin-Martins i sar., 2013) predstavlja model akutnog iritirajućeg bola. Svaka supstanca je data u konačnoj zapremini od 0,1 ml po šapi pacova. Svaka kontrolna grupa je dobila rastvarač u istoj zapremini i na isti način.

Testiranje nocicepcije

Sat vremena pre eksperimenta pacovi se unose u laboratoriju radi adaptacije. Pojedinačno u kaveze od pleksiglasa se postavljaju 30 min pre izazivanja bola. Bol se manifestuje karakterističnim bihevioralnim ponašanjem, koje obuhvata trzanje, dizanje, otresanje, lizanje i griženje ubrizgane šape. Merni parametar je vreme (u sekundama) provedeno u bolnom ponašanju. Sa merenjem se započinje odmah po ubrizgavanju iritantne (algogene) supstance i nastavlja se narednih 30 minuta. Nociceptivni odgovor se meri u blokovima od po pet minuta.

Analiza rezultata

Da bi ispitali da li nociceptivno bolno ponašanje utiče na testiranje mehaničke hiperalgezije, u posebnim grupama životinja ispitali smo efekte agonista sa i bez diklofenaka.

Diklofenak je dat istovremeno sa agonistom u obliku jedne i.pl. injekcije. U posebnim grupama životinja, ispitivane su po 2 do 3 doze diklofenaka posebno sa svakim agonistom. Svaka kontrolna grupa dobijala je samo i.pl. injekciju agoniste ili rastvarača, u istoj zapremini.

Antinociceptivna aktivnost određuje se tako što ispitivani lek smanjuje vreme provedeno u bolnom ponašanju u odnosu na vreme provedeno u kontrolnoj grupi. Za svakog pacova u grupi, u svakom vremenskom bloku, je to smanjenje izraženo kao procenat analgetičke aktivnosti (%AA) na osnovu formule:

$$\%AA = [(bol(s) \text{ u kontrolnoj grupi} - bol(s) \text{ u test grupi}) / bol(s) \text{ u kontrolnoj grupi}] \times 100$$

%AA svih pacova u grupi je zatim izražen kao prosečna vrednost sa standardnom greškom za određeni vremenski blok.

3.4.2. Model visceralnog bola

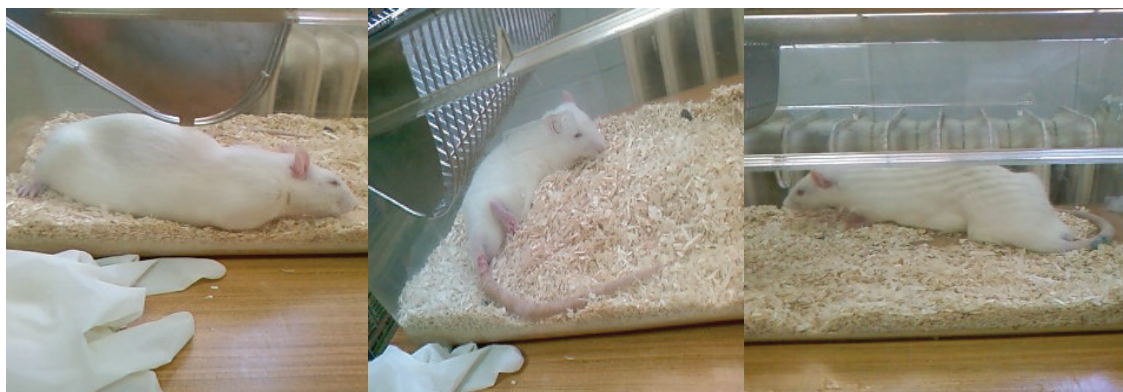
3.4.2.1. Test abdominalnih grčeva (*eng.* „writhing test„)

Indukcija grčeva

Intraperitonealna injekcija 0,7% rastvora sirćetne kiseline (u zapremini od 10 ml/kg) izaziva stereotipno bolno ponašane pacova u vidu karakterističnih grčeva. Ovaj test predstavlja model visceralnog bola jer se direktno draže visceralni nociceptori (LeBars i sar., 2001) i model inflamatornog bola jer se u peritoneumu povećano stvaraju prostaglandini (Deraedt i sar., 1980). Test grčeva se ubraja u tonični model bola. U metodama toničnog bola hemijska (iritirajuća, algogena) supstanaca izaziva perzistirajući bol („dugodelujući stimulus„) koji se prati preko bihevioralnih promena kod životinja.

Testiranje nocicepcije

Životinje su aklimatizovane u laboratoriji sat vremena pre izazivanja grčeva. Pola sata pre indukcije grčeva pacovi su smešteni pojedinačno u kaveze od pleksiglasa. Merni parametar je broj grčeva. Refleks grčenja se definiše kao uvlačenje (konstrukcija) prednjeg ili bočnog trbušnog zida, istežanje tela s izvijanjem tela unazad i/ili uvijanje ili okretanje trupa zajedno sa jednom ili obe zadnje šape, opružanje jedne ili obe zadnje šape. Brojanje grčeva započinje 5 min nakon injekcije sirćetne kiseline i traje narednih 20 minuta (Al-Mamun i sar., 2011; Vučković i sar., 2015).



Slika 7. Manifestacija bolnog ponašanja kod pacova u testu grčeva izazvanog intraperitonealnim rastvorom sirćetne kiseline (autorski snimci).

Analiza rezultata

U ovom modelu bola ispitali smo:

- efekte magnezijum-sulfata i dizocilpina nakon sistemske primene
- uticaj različitih antagonista na efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina

Ispitivanje efekata magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva

Da bi ispitali da li magnezijum-sulfata i dizocilpin imaju sistemski antinociceptivni efekt u testu abdominalnih grčeva pacovi su dobili supkutanu injekciju magnezijum-

sulfata ili dizocilpina 15 min pre rastvora sirćetne kiseline. Kontrolna grupa je dobila u istoj količini supkutane injekcije 0,9% NaCl, umesto ispitivanih supstanci.

Broj grčeva je u svakoj testiranoj grupi poređen sa kontrolom. Antinociceptivno dejstvo lek ostvaruje kada dovodi do značajnog smanjenja broja grčeva. Na svakom pacovu u grupi antinociceptivno dejstvo je izraženo kao procenat analgetičke aktivnosti (%AA), koji je izračunat prema formuli (Ruan i sar., 2000; Vučković i sar., 2015):

$$\%AA = [(Wc - Wt) / Wc] \times 100,$$

gde Wc predstavlja broj grčeva („writhing,“) u kontrolnoj grupi, a Wt broj grčeva („writhing,“) u testiranoj grupi. Ukoliko je pojedinačan broj grčeva pacova bio veći u odnosu na prosečnu vrednost grčeva u kontrolnoj grupi, %AA je označen sa 0.

Vrednosti ED_{50} (doza ispitivane supstance koja smanjuje broj grčeva za 50%, tj. koja daje 50% AA) sa odgovarajućim srednjim standardnim greškama (SEM) računane su iz odgovarajućih kriva log odnosa doze i efekta linearnom ili ne-linearnom regresionom analizom uz pomoć GraphPad kompjuterskog programa (GraphPad Prism 6 demo, GraphPad Softver, San Diego, CA).

Analiza dejstva antagonista na sistemski efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva

Da bi utvrdili mehanizam analgetskog dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpin u modelu abdominalnih grčeva ispitali smo uticaj NO i NO/cGMP/K⁺ATP puta pomoću sledećih antagonista:

- L-NAME, neselektivni inhibitor NOS
- L-NPA, selektivni inhibitor nNOS
- SMT, selektivni inhibitor iNOS
- metilensko plavo, neselektivni inhibitor gvanilatne ciklaze
- glibenklamid, antagonist ATP-zavisnih kalijumskih kanala

L-NAME (i.p.) ili L-NPA (i.p.) ili SMT (i.p.) ili metilensko plavo (s.c.) ili glibenklamid (s.c.) su administrirani 10 min pre magnezijum-sulfata ili dizocilpina. Da bi proverili da li ispitivani antagonisti imaju neki efekat na broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom, u posebnoj grupi pacova ispitali smo efekte najvećih doza primenjenih antagonista. Kontrolne grupe pacova dobile su u istom volumenu i na isti način 0,9% NaCl ili alkohol (kod glibenklamida), kako bi se ispitali da li rastvarač ima bilo kakav uticaj na broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom.

Procenat inhibicije (%I) analgetskog dejstva u prisustvu antagoniste je izračunat na sledeći način (Vuckovic i sar., 2015):

$$\%I = 100 - [(\%AA \text{ u prisustvu antagonista} / \%AA \text{ bez antagonista}) \times 100]$$

3.4.3. Test za procenu motorne spretnosti pacova - Rotarod test

Da bi otklonili lažno pozitivni analgetički efekat magnezijum-sulfata ili dizocilpina i ispitali bezbednost primene magnezijum-sulfata ili dizocilpina, ispitali smo da li ove dve supstance izazivaju oštećenje motorne koordinacije koristeći „rotarod“, aparat za pacove (Treadmill for rats model 47700, Ugo Basile, Milano, Italija). Aparat se sastoji od rotirajućeg vretena prečnika 5 cm, podeljenog na pet odeljaka širine 8 cm.

Dan pre eksperimenta pacovi su trenirani dva puta, sa razmakom između merenja, da „voze“, rotarod u trajanju od 120 sekundi pri konstantnoj brzini od 12 obrtaja u minuti. Na dan eksperimenta, 60 min pre ubrizgavanja lekova ili 0,9% NaCl, životinje su ponovo prošle kontrolno merenje pod istim uslovima. Samo oni pacovi koji nisu pali sa vretena tokom 120 sekundi vožnje dan pre i na dan eksperimenta su bili uključeni u eksperiment. Nakon supkutane injekcije magnezijum-sulfata ili dizocilpina ili 0,9% NaCl (u kontrolnoj grupi) merilo se vreme koje pacovi provedu na vretenu od momenta postavljanja do pada životinje sa vretena. Maksimalna dužina vožnje rotarod aparata (“cut-off”) bila je 120 sekundi (Suetake-Koga et al., 2006). Merenja su vršena 30 min od supkutane primene leka/fiziološkog rastvora tj. u vremenu kada je ispoljen

maksimalni antinociceptivni efekt (po metodi Lai i sar., 2007). Rezultati su izraženi u sekundama koliko dugo je pacov mogao da održi ravnotežu na vretenu u pokretu. Za pacove koji su uspeali da se održe na rotirajućem vretenu 120 sekundi smatralo se da nisu motorno onesposobljeni.

3.4.4. Statistička analiza

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ standardna greška srednje vrednosti (SEM) u grupi od 6-8 pacova. Između eksperimentalnih grupa, statistička značajnost razlike u registrovanim parametrima procenjena je uz pomoć jednosmerne analize varijanse (one way ANOVA) i Tukey HSD *post hoc* testa. U testu abdominalnih grčeva, AITC/kapsaicinom/sirćetnom kiselinom-indukovanom nociceptivnom odgovoru i u rotarod testu, razlike između grupa su određivane Kruskal-Wallis testom iza koga sledi, Mann-Whitney U test. Kada je ispitivana statistička značajnost razlike parametra između dve gupe koristio se Studentov *t*-test. Pri statističkoj obradi podataka koristio se i kompjuterski program GraphPad (GraphPad Prism 6 demo, GraphPad Softver, San Diego, CA).

4. REZULTATI

4.1. Uporedni efekti magnezijum-sulfata i dizocilpina u modelu somatskog inflamatornog bola i otoka kod pacova

4.1.1. Karageninom indukovana hiperalgezija i edem šape pacova

Supkutana injekcija karagenina (500 µg) u taban zadnje šape pacova izaziva zapaljenje koje je praćeno pojavom edema i eritema. Pojava bola se manifestuje sniženjem praga povlačenja šape na mehanički stimulus. Hiperalgezija i edem su najizraženiji oko 3 h. Nepromenjen prag podizanja šape na suprotnoj (kontralateralnoj) šapi ukazuje na odsustvo sekundarne hiperalgezije (nije prikazano). Nije bilo statistički značajne razlike u bazalnim vrednostima praga povlačenja šape i volumena šape između eksperimentalnih grupa, kao ni između eksperimentalnih grupa i kontrola ($p>0,05$).

4.1.2. Efekti magnezijum-sulfata na karageninom izazvan bol i otok nakon sistemske i lokalne primene kod pacova

U modelu somatskog inflamatornog bola i otoka kod pacova, magnezijum-sulfat je ispoljio statistički značajno i dozno-nezavisno antihiperalgezijsko i antiedematozno dejstvo nakon sistemske primene. Magnezijum-sulfat je smanjio bol i otok koji su nastali tokom razvoja zapaljenja, kao i bol i otok u već razvijenom zapaljenju. Lokalno periferno primenjen magnezijum-sulfat ne utiče na inflamatorni bol, a smanjuje otok.

Sistemijski antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata primenjenog u pretretmanu i tretmanu

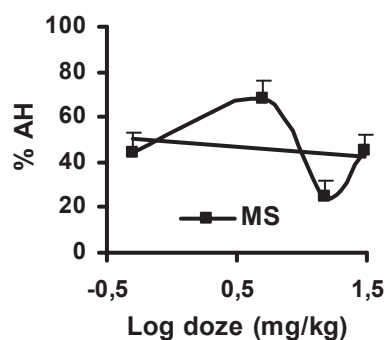
Sistemijski primenjen magnezijum-sulfat pre indukcije inflamacije (pretretman) statistički značajno ($p<0,05$) povećava prag podizanja šape pacova nakon injekcije karagenina. Efekt je dozno-nezavisan. Magnezijum-sulfat primenjen s.c. u dozi od 5 mg/kg statistički značajno ($p<0,05$) smanjuje hiperalgeziiju za $68 \pm 8,4$, $52 \pm 5,7$, i $45 \pm 6,8\%$ u 1, 2 i 3 h, respektivno. Efekt traje do 3 h. Manja doza magnezijum-sulfata od 0,5

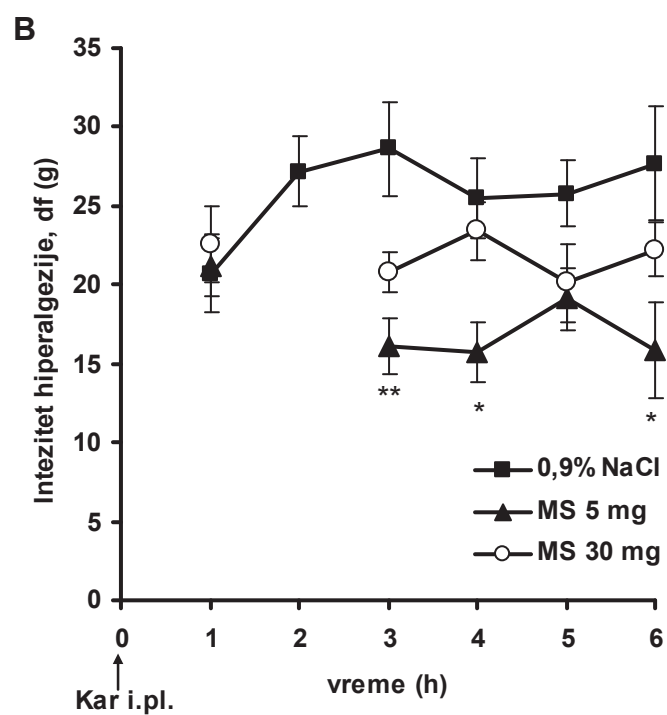
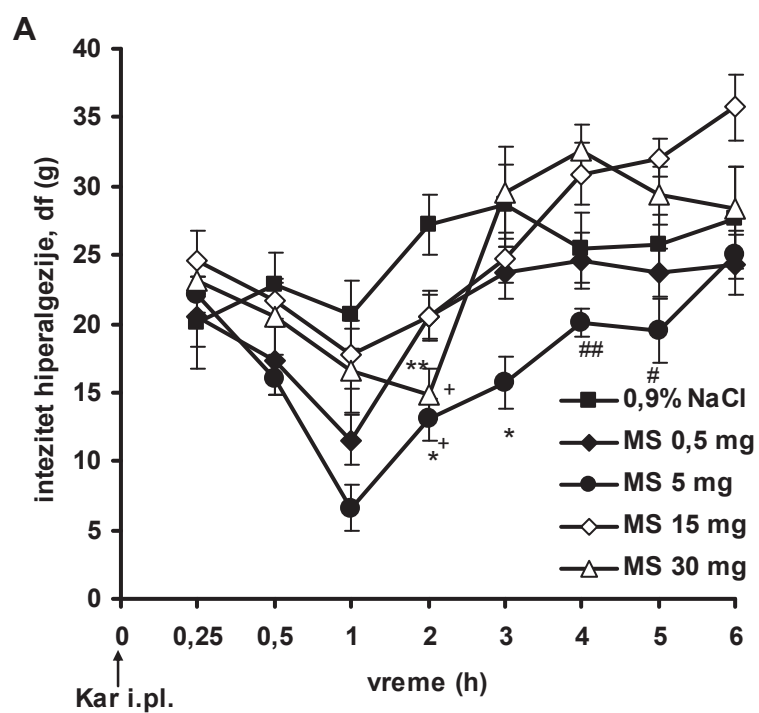
mg/kg smanjuje hiperalgeziju za $44,4 \pm 8,8$ i $24,4 \pm 6,8\%$ u 1 i 2 h, respektivno. Magnezijum-sulfat primenjen u većim dozama od 15 i 30 mg/kg proizvodi statistički značajan ali slabiji maksimalni antihiperalgezijski efekt od $24,6 \pm 6,9$ ($p>0,05$) i $45,3 \pm 6,7\%$ ($p<0,01$), koji je takođe postignut u 2 h (slika 8A, veliki grafikon). Kriva odnosa log doze i efekta magnezijum-sulfata konstruisana za vrednosti maksimalnog antihiperalgezijskog dejstva i u vreme postizanja maksimalnog dejstva (1-2 h posle injekcije karagenina) nema linearan tok i pokazuje da efekt ne zavisi od doze (slika 8A, mali grafikon).

Magnezijum-sulfat primenjen sistemski u tretmanu smanjuje hiperalgeziju u vreme kada je ona najizraženija. Neposredno pre postizanja maksimalne karageninske hiperalgezije, supkutano primenjen magnezijum-sulfat u dozi od 5 mg/kg prouzrokuje visoko statistički značajan ($p<0,01$) analgetički, odnosno antihiperalgezijski efekt od $43,7 \pm 6,1\%$. Efekt je dobijen jedan sat posle primene leka (u vremenskoj tački 3 h) i trajao je naredna tri sata. Magnezijum-sulfat primenjen, 2 h posle injekcije karagenana, u većoj dozi od 30 mg/kg ima slab antihiperalgezijski efekt od samo $27,3 \pm 4,5\%$ ($p>0,05$) (slika 8B).

Sa najvišom ispitivanom dozom magnezijum-sulfat (30 mg/kg) nije promenio prag podizanja šape na kontralateralnoj (neinflamiranoj) šapi, što sugerise da magnezijum-sulfat ne narušava bihejviorano testiranje nociceptivne osetljivosti (nije prikazano).

U kontrolnim grupama koje su dobijale fiziološki rastvor, supkutana injekcija fiziološkog rastvora (0,2 ml/kg) nije imala značajan efekt na prag za podizanje šape ($p>0,05$). U kontrolnoj grupi sistemski primenjen magnezijum-sulfat (30 mg/kg, s.c.) nije imao statistički značajan ($p>0,05$) uticaj na prag bola za podizanje zdrave šape (nije prikazano).





Slika 8. Intezitet i trajanje antihiperalgezijskog dejstva magnezijum-sulfata (MS 0,5, 5, 15 i 30 mg/kg, s.c.) primenjenog sistemski 5 min pre (A) ili 2 h posle (B) injekcije karagenina (Kar, i.pl.). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost $\pm$ SEM antihiperalgezijskog dejstva izraženog u gramima dobijenu testiranjem 6 pacova. (A)

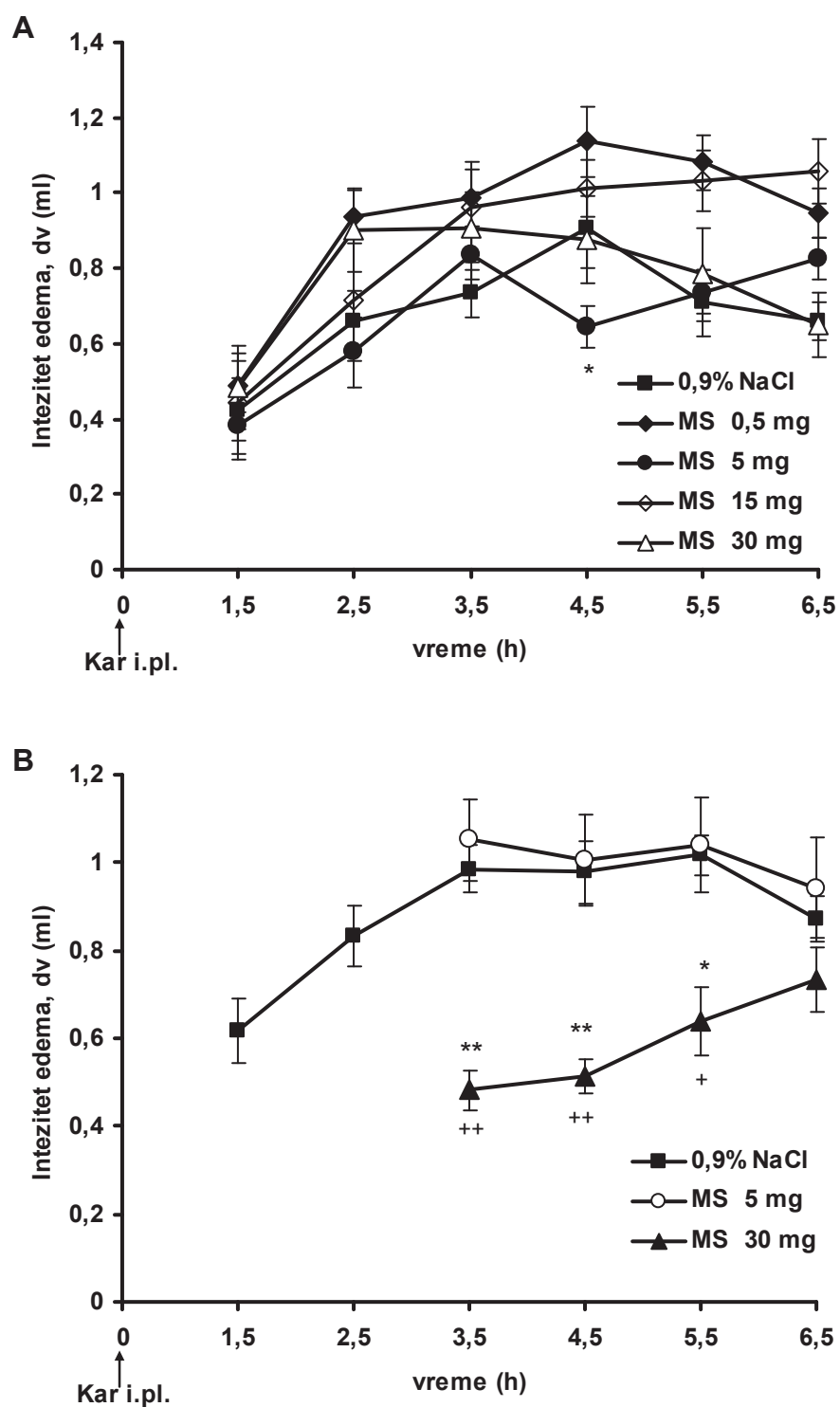
Statistička značajnost je dobijena: poređenjem sa kontrolom (0,9% NaCl) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), poređenjem MS 5 ili 30 sa 0,5 ($^+p < 0,05$) i poređenjem MS 5 i 15 ($^{\#}p < 0,05$, $^{\#\#}p < 0,01$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). (B) Statistička značajnost (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) je dobijena poređenjem sa kontrolom (0,9% NaCl) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). Mali grafikon predstavlja regresionu krivu odnosa log doze i antihiperalgezijskog dejstva (%AH) magnezijum-sulfata (MS) u trenutku (1 ili 2 h posle inj. karagenina) postizanja maksimalnog efekta u inflamatornom modelu bola u pacova. s.c., supkutano. i.pl. intraplantarno. df (g), srednja razlika u pritiscima na šapu pre i posle nastanka zapaljenja.

Sistemske antiedematozne efekte magnezijum-sulfata primenjenog u pretretmanu i tretmanu

Magnezijum-sulfat je primenjen sistemski pre nastanka zapaljenja (profilaktički) u dozama od 0,5, 5, 15 i 30 mg/kg. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjen je edem šape samo sa dozom od 5 mg/kg za $29,1 \pm 6,1\%$ i to samo u vreme maksimalno razvijenog edema tj. u 4,5 satu (slika 9A).

Magnezijum-sulfat primenjen sistemski u vreme maksimalno razvijenog edema usled zapaljenja statistički značajno ($p < 0,05$, $p < 0,01$) smanjuje edem samo u najvećoj testiranoj dozi od 30 mg/kg. Antiedematozni efekat traje tri sata nakon primene tj. u 3,5, 4,5 i 5,5 satu i iznosi $51,1 \pm 4,7$, $47,3 \pm 3,9$ i $37,3 \pm 7,4\%$, respektivno. Doza magnezijum-sulfata (5 mg/kg) koja ostvaruje antiedematozni efekat u pretretmanu, nema statistički značajan ($p > 0,05$) uticaj na edem u tretmanu (slika 9B).

U kontrolnoj grupi životinja, magnezijum-sulfat (30 mg/kg s.c.) nema statistički značajan ($p > 0,05$) uticaj na promenu volumena šape pacova. U kontrolnim grupama koje su dobijale fiziološki rastvor, supkutana injekcija fiziološkog rastvora (0,2 ml/kg) nije značajno menjala ($p > 0,05$) bazalni volumen šape.



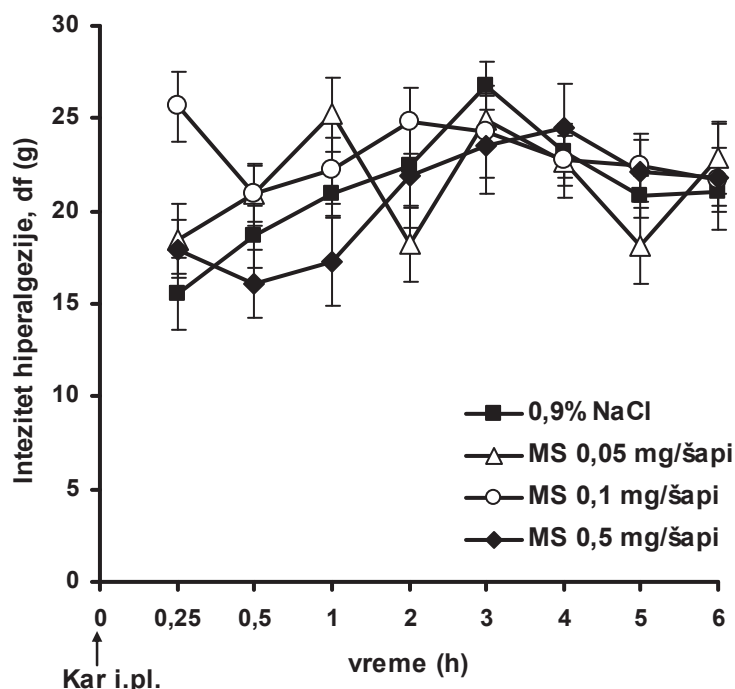
Slika 9. Intezitet i trajanje antiedematoznog dejstva magnezijum-sulfata (MS 0,5, 5, 15 i 30 mg/kg, s.c.) primenjenog sistemski 5 min pre (A) ili 2 h posle (B) injekcije karagenina (Kar, i.pl.). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost $\pm$ SEM antiedematoznog dejstva izraženu u mililitrima dobijenu testiranjem 6 pacova. (A)

Statistička značajnost (* $p < 0,05$) je dobijena poređenjem sa kontrolom (0,9% NaCl) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). (B) Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa kontrolom (0,9% NaCl) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) i poređenjem MS 5 sa 30 (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). s.c., supkutano. i.pl. intraplantarno. dv (ml), srednja razlika u volumenu šape pre i posle nastanka zapaljenja.

Lokalni periferni efekt magnezijum-sulfata na hiperalgeziju

Nakon lokalne periferne primene magnezijum-sulfat nije imao nikakav uticaj na razvoj hiperalgezije u toku inflamcije. I.pl. koadministriran sa karageninom, magnezijum-sulfat u dozi od 0,05, 0,1 i 0,5 mg/šapi nije imao statistički značajan ($p > 0,05$) uticaj na već sniženi prag bola za podizanje šape (slika 10). Magnezijum-sulfat ubrizgan u kontralateralnu (neinflamiranu) šapu u dozi od 0,1 mg/šapi nije imao statistički značajan ($p > 0,05$) efekt na hiperalgeziju izazvanu karageninom (nije prikazano).

U kontrolnoj grupi pacova, magnezijum-sulfat primenjen sam i.pl.u zdravu (intaktnu) šapu smanjuje prag bola za podizanje šape (slika 35).



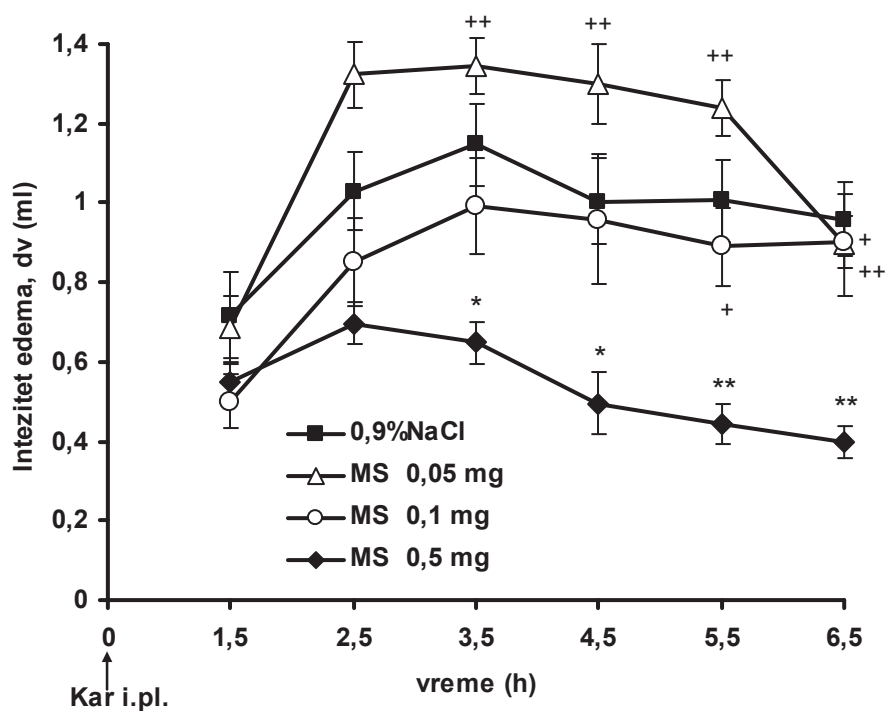
Slika 10. Odsustvo lokalnog antihiperalgezijskog dejstva magnezijum-sulfata (MS, 0,05, 0,1 i 0,5 mg/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa

karageninom (Kar). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost nije nađena ni u jednoj vremenskoj tački ($p>0,05$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

Lokalni periferni antiedematozni efekt magnezijum-sulfata

Magnezijum-sulfat je primenjen lokalno i.pl. u dozi od 0,05, 0,1 i 0,5 mg/šapi istovremeno sa karageninom. Statistički značajno ($p<0,05$, $p<0,01$) smanjuje otok šape samo u najvećoj ispitivanoj dozi (slika 11). Antiedematozni efekt magnezijum-sulfata (0,5 mg/šapi) počinje u 3,5 i prestaje u 6,5 satu nakon izazivanja zapaljenja. Antiedematozni efekt iznosi $43,6 \pm 4,7$, $50,7 \pm 7,7$, $55,8 \pm 4,9$ i $58,6 \pm 4,3\%$, u 3,5, 4,5, 5,5 i 6,5 satu, respektivno. Efekt je lokalnog karaktera, jer u istoj dozi i na isti način magnezijum-sulfat (0,5 mg/šapi, i.pl.) primenjen u kontralateralnoj šapi statistički značajno ($p>0,05$) ne utiče na otok šape izazvan karageninom.

U kontrolnoj grupi životinja, intraplantarna injekcija magnezijum-sulfata (0,5 mg/šapi) ne utiče značajno na promenu volumena šape pacova.



Slika 11. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antiedematoznog dejstva magnezijum-sulfata (MS 0,05, 0,1 i 0,5 mg/šapi) primenjenog intraplantarno (i.pl.) istovremeno sa karageninom (Kar). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike volumena šape u mililitrima $dv(ml) \pm SEM$ pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa kontrolom (0,9% NaCl) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) i sa MS 0,5 ($^+p < 0,05$, $^{++}p < 0,01$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

4.1.3. Efekti dizocilpina na karageninom izazvan bol i otok nakon sistemske i lokalne primene kod pacova

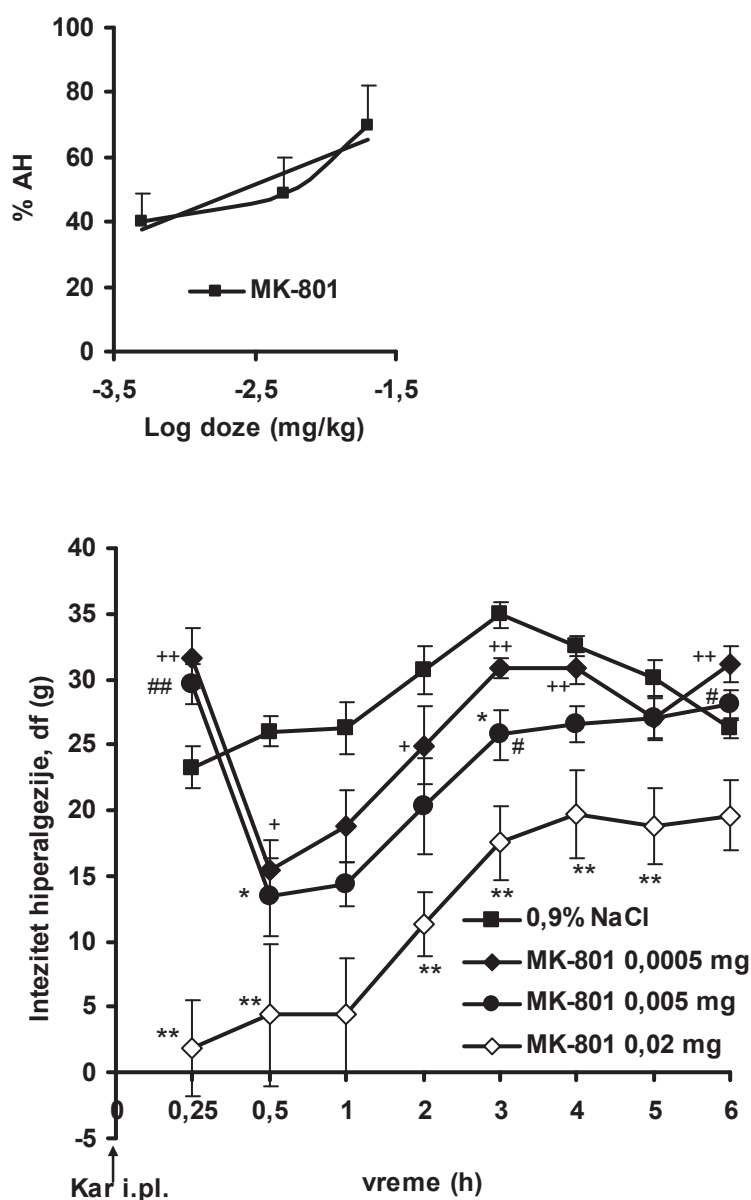
U modelu somatskog inflamatornog bola kod pacova, dizocilpin je ispoljio statistički značajno antihiperalgezijsko dejstvo nakon sistemske i lokalne periferne primene. Antihiperalgezijsko i antiedematozno dejstvo dizocilpina nakon sistemske primene je dozno-zavisno.

Sistemički antihiperalgezijski efekt dizocilpina

Supkutano primenjen dizocilpin pre nastanka zapaljenja statistički značajno i na dozno-zavisna način povećava snižen prag bola izazvan karageninom. Oko 30 min posle injekcije dizocilpina u dozi od 0,0005, 0,005 i 0,02 mg/kg (što odgovara 0,5, 5 i 20 $\mu g/kg$) ispoljava statistički značajno ($p < 0,05$, $p < 0,01$) smanjenje hiperalgezije za $40,3 \pm 8,4$, $48,5 \pm 11,4$ i $79,1 \pm 22\%$, respektivno (slika 12). Antihiperalgezijski efekt dostiže maksimum pola sata posle s.c. primene, a održava se narednih 3 do 5 h. Dužina trajanja dejstva dizocilpina zavisi od doze. Kriva odnosa log doze i efekta dizocilpina konstruisana za vrednosti maksimalnog antihiperalgezijskog dejstva i u vreme postizanja maksimalnog dejstva (30 min posle injekcije karagenina) pokazuje linerani tok tj. da efekt zavisi od doze (slika 12, mali grafikon).

U kontrolnim grupama, supkutana injekcija fiziološkog rastvora nije imala efekt na prag za podizanje šape. U kontrolnoj grupi sistemski primenjen dizocilpin (0,005 mg/kg, s.c.) nije imao statistički značajan ($p > 0,05$) uticaj na prag bola za podizanje zdrave šape. Jedino u najvećoj ispitanoj dozi, dizocilpin (0,02 mg/kg) u prva dva sata nakon injekcije

izaziva blagi porast praga bola za podizanje šape na zdravoj šapi. U poređenju sa vrednostima dobijenim posle primene 0,9% NaCl razlika u pragu bola se kretala od $2,7 \pm 2,8$ do $9 \pm 5,5$ g ($p > 0,05$; Studentov t- test za nezavisne uzorake) (nije prikazano). Ovaj rezultat ukazuje da bihejvioralna procena nociceptivne osetljivosti kod pacova može biti narušena velikim dozama dizocilpina.

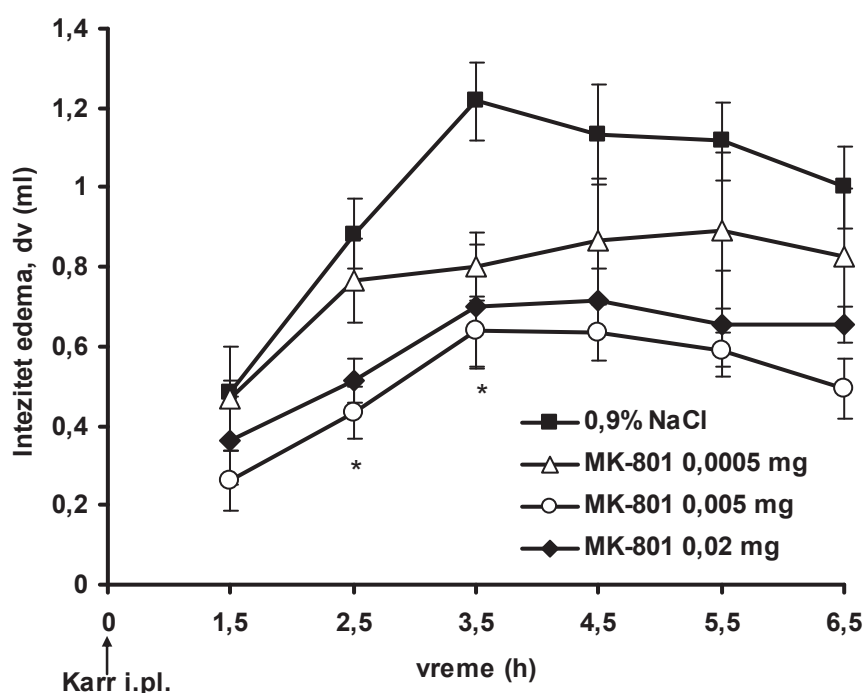


Slika 12. Intezitet i trajanje sistemskog antihiperalgezijskog dejstva dizocilpina (MK-801; 0,0005, 0,005 i 0,02 mg/kg, s.c.) primenjenog 5 min pre injekcije karagenina (Kar, i.pl.). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima df(g) $\pm$ SEM na šapu pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je

dobijena poređenjem sa kontrolom (0,9% NaCl) (* $p<0,05$, ** $p<0,01$), poređenjem MK-801 0,0005 sa 0,02 ($^+p<0,05$, $^{++}p<0,01$) i poređenjem MK-801 0,005 sa 0,02 ($^{\#}p<0,05$, $^{\#\#}p<0,01$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). Mali grafikon predstavlja regresionu krivu odnosa log doze i antihiperalgezijskog dejstva (%AH) dizocilpina u trenutku (30 min posle inj. karagenina) postizanja maksimalnog efekta u inflamatornom modelu bola u pacova. s.c., supkutano. i.pl. intraplantarno.

Sistemiški antiedematozni efekt dizocilpina

Supkutano primenjen dizocilpin pre nastanka zapaljenja statistički značajno smanjuje edem šape izazvan zapaljenjem. Dizocilpin u dozi od 0,0005, 0,005 i 0,02 mg/kg (što odgovara 0,5, 5 i 20 $\mu\text{g/kg}$) ispoljava statistički značajno ($p<0,05$) smanjenje edema šape izazvanog zapaljenjem samo u dozi od 0,005 mg/kg (slika 13). Maksimalni antiedematozni efekt iznosi $47,3 \pm 7,7$ i $45,4 \pm 7,6\%$ i postiže se u 2,5 i 3,5 satu nakon izazivanja zapaljenja. Antiedematozno dejstva dizocilpina ne zavisi od doze.



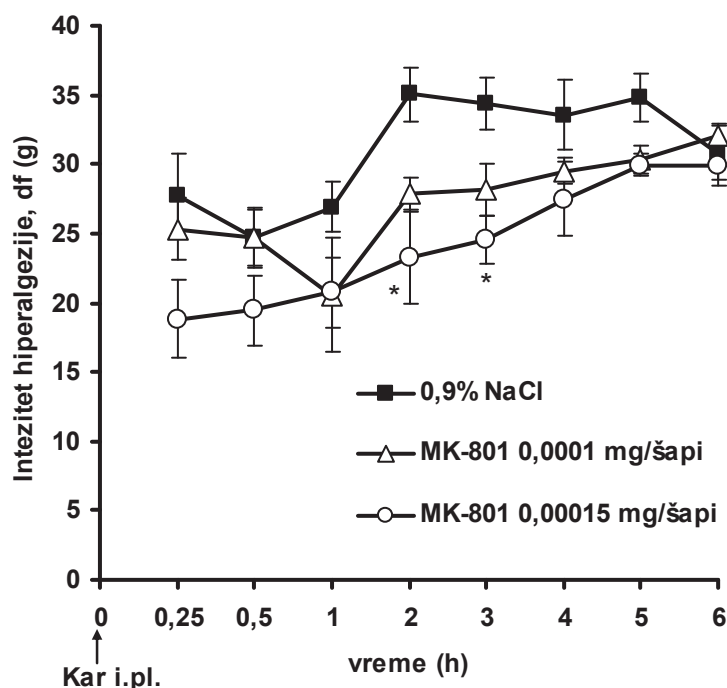
Slika 13. Intezitet i trajanje sistemskog antiedematoznog dejstva dizocilpina (MK-801; 0,0005, 0,005 i 0,02 mg/kg, s.c.) primenjenog 5 min pre injekcije karagenina (Kar, i.pl.). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike volumena šape u mililitrima dv(ml) $\pm$

SEM pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost ($p < 0,05$) je dobijena poređenjem sa 0,9% NaCl (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

Lokalni periferni antihiperalgezijski efekt dizocilpina

Intraplantarna istovremena primena dizocilpina sa karageninom ostvaruje statistički značajan ($p < 0,05$) lokalni periferni antihiperalgezijski efekt. Dizocilpin u dozi od 0,0001 mg/šapi (0,1 μ g/šapi) povećava smanjeni prag bola za samo $20,7 \pm 3,6\%$ u 2 h. Dizocilpin u dozi od 0,00015 mg/šapi (0,15 μ g/šapi) statistički značajno ($p < 0,05$) smanjuje karageninsku hiperalgeziju za $34,6 \pm 8,8$ i $28,5 \pm 5,2\%$ u 2 i 3 h, respektivno (slika 14). Ukupno trajanje efekta iznosi dva sata. Efekt dizocilpina je lokalne prirode, s obzirom da najveća ispitana doza ubrizgana u kontralateralnu (zdravu) šapu nije imala nikakav značajan ($p > 0,05$) uticaj na karageninom indukovanu hiperalgeziju (nije prikazano). Dozna-zavisnost efekta nije mogla biti ispitana jer je mali raspon između doza sa lokalnim i sistemskim efektom.

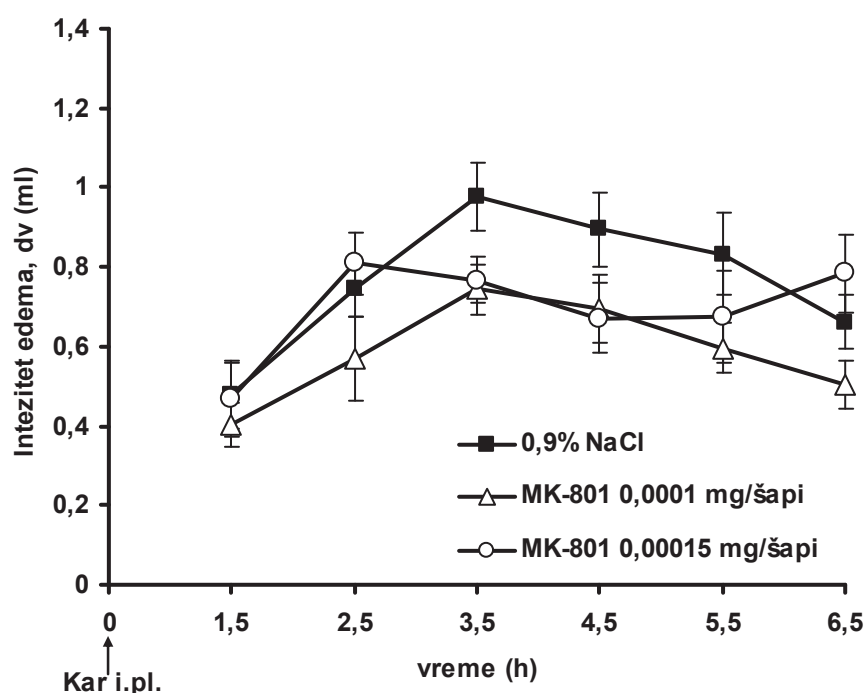
U kontrolnoj grupi pacova, dizocilpin (0,00015 mg/šapi) primenjen sam i.pl.u zdravu (intaktnu) šapu ne utiče statistički značajno ($p > 0,05$) na prag bola za podizanje šape (nije prikazano).



Slika 14. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva dizocilpina (MK-801; 0,0001 i 0,00015 mg/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa karageninom (Kar). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa kontrolom (0,9% NaCl) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

Lokalni efekt dizocilpina na edem šape izazvan karageninom

Dizocilpin (0,0001 i 0,00015 mg/šapi) ubrizgan intraplantarne istovremeno sa karageninom nema statistički značajan ($p > 0,05$) uticaj na razvoj edema koji izazva karagenin (slika 15). Najveća ispitana doza dizocilpina (0,00015 mg/šapi) nema sistemsko dejstvo tj. kada se dizocilpin ubrizga u kontralateralnu šapu nema statistički značajnog ($p > 0,05$) uticaja na edem šape izazvan karageninom (nije prikazano).



Slika 15. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog dejstva dizocilpina (MK-801) na edem šape pacova izazvan karageninom (Kar). MK-801 (0,0001 i 0,00015 mg/šapi) je primenjen intraplantarno (i.pl.) istovremeno sa Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike volumena šape u mililitrima dv (ml) $\pm$ SEM pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost nije nađena ni u jednoj vremenskoj tački ($p > 0,05$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

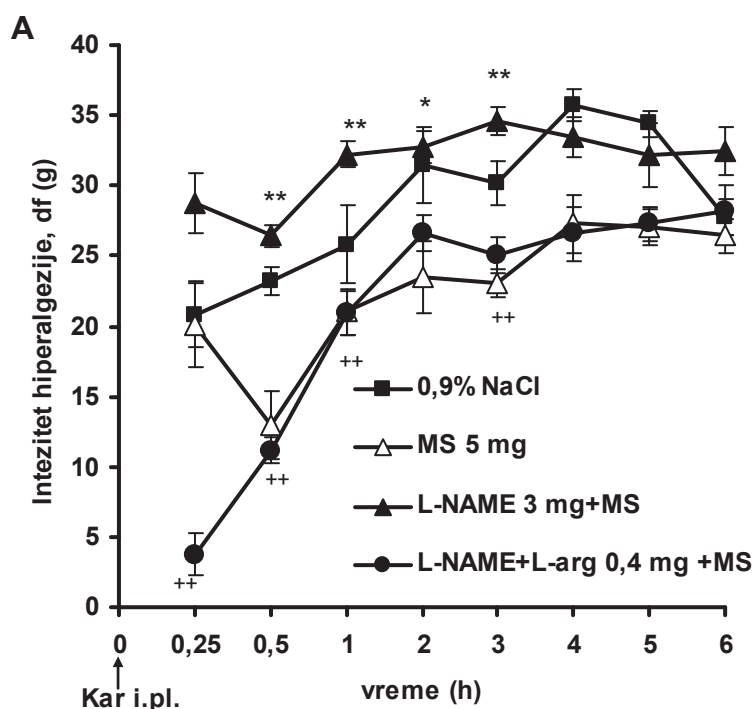
4.2. Uloga NO-a u mehanizmu antihiperalgezijskog i antiedematoznog dejstva magnezijum-sulfata u modelu somatskog inflamatornog bola i otoka kod pacova

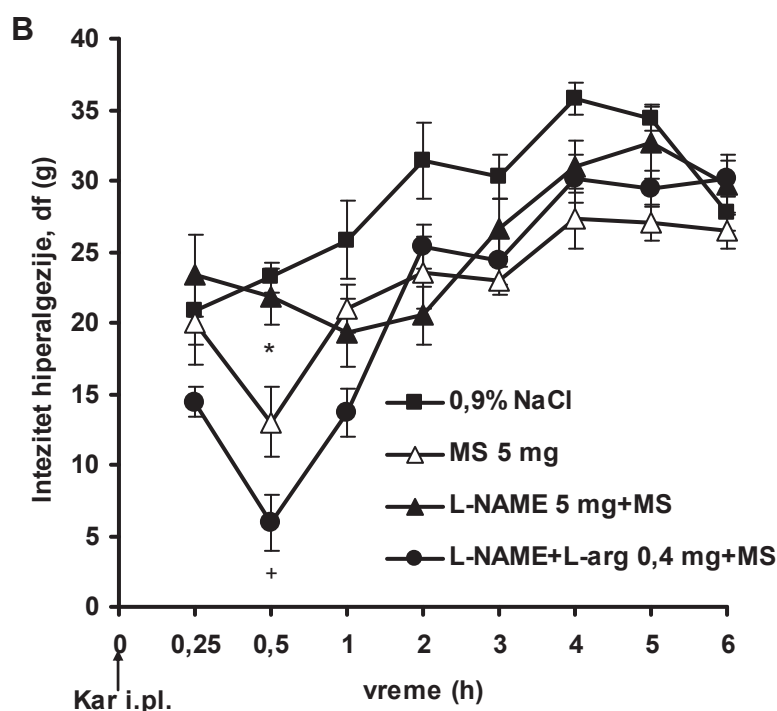
Da bismo ispitali da li magnezijum-sulfat ostvaruje dejstvo preko NO-a, ispitali smo uticaj neselektivnog (L-NAME), neuralnog (L-NPA) i inducibilnog (SMT) inhibitora NOS na antihiperalgezijski i antiedematozni efekt magnezijum-sulfata u somatskom inflamatornom modelu bola i otoka kod pacova.

4.2.1. Dejstvo prekursora i inhibitora sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata

L-NAME, neselektivni inhibitor NOS, primenjen i.p. u dozi od 3 mg/kg u potpunosti (100%) ($p<0,01$) prekida antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata (5 mg/kg) u 0,5, 1, 2 i 3 h. U većoj dozi od 5 mg/kg značajno ($p<0,05$) antagonizuje efekt magnezijuma-sulfata za 84,1% u 0,5 h (slika 16, A i B). L-arginin, prekursor NO-a, (0,4 mg/kg, s.c.) primenjen u kombinaciji sa L-NAME i magnezijum-sulfatom statistički značajno ($p<0,01$) smanjuje efekt L- NAME od 3 i 5 mg/kg na dejstvo magnezijum-sulfata za 57,8 i 72,9%, respektivno. Maksimalno dejstvo L-arginin dostiže u 0,5 h (slika 16, A i B).

Kada se primeni sam, L-NAME (3 i 5 mg/kg) ill L-arginin ne utiče značajno na karageninsku hiperalgeziju u poređenju sa 0,9% NaCl ($p>0,05$) (nije prikazano).



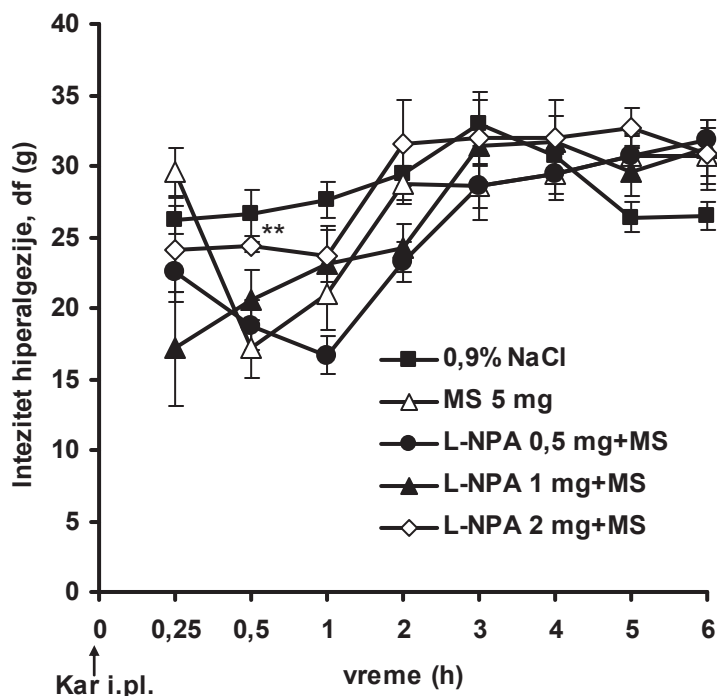


Slika 16. Vremenski tok dejstva L-NAME sa i bez L-arginina (L-arg) na efekt magnezijum-sulfata (MS) tokom karageninske (Kar) hiperalgezije kod pacova. L-NAME (3 i 5 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MS (5 mg/kg) $\pm$ L-arg (0,4 mg/kg) koji su dati simultano supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima df(g) $\pm$ SEM na šapu pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. (A) Statistička značajnost je dobijena poređenjem kombinacije L-NAME 3+MS sa MS (* p <0,05, ** p <0,01) i kombinacije L-arg+L-NAME 3+MS and L-NAME 3+MS (^{++}p <0,01) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). (B) Statistička značajnost je dobijena poređenjem kombinacije L-NAME 5+MS sa MS (* p <0,05) i poređenjem kombinacije L-arg+L-NAME 5+MS sa L-NAME 5+MS (^{++}p <0,01) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl. intraplantarno.

4.2.2. Dejstvo inhibitora neuralne sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata

L-NPA, selektivni inhibitor nNOS, u dozi od 2 mg/kg, i.p. statistički značajno (p <0,01) antagonizuje antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata (5 mg/kg) za 75% u 0,5 h, dok u manjim dozama od 1 i 0,5 mg/kg ima slab ili nikakav uticaj na antihiperalgezijski

efekt magnezijum-sulfata (slika 17). U odnosu na 0,9% NaCl, sam L- NPA (2 mg/kg) nije imao statistički značajnog uticaja na karageninsku hiperalgeziju (nije prikazano).

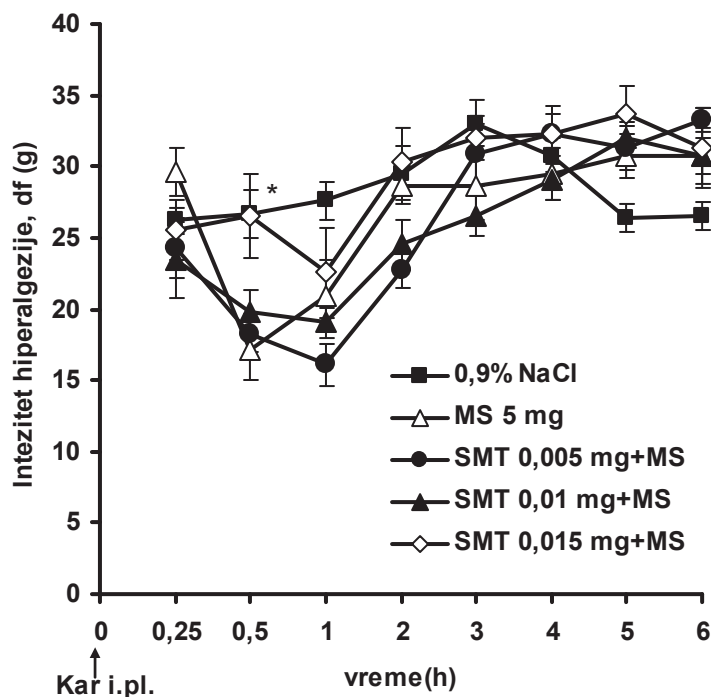


Slika 17. Vremenski tok dejstva L-NPA na efekt magnezijum-sulfata (MS) tokom karageninske (Kar) hiperalgezije kod pacova. L-NPA (0,5, 1 i 2 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MS (5 mg/kg) koji je dat supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost (** $p < 0,01$) je dobijena poređenjem kombinacije L-NPA 2+MS i MS (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl. intraplantarno.

4.2.3. Dejstvo inhibitora inducibilne sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata

SMT, potentan i selektivan inhibitor iNOS, u dozama od 0,005 i 0,01 mg/kg (5 i 10 pg/kg), nije imao statistički značajan ($p > 0,05$) uticaj na antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata (5 mg/kg) tokom hiperalgezije izazvane karageninom. U najvećoj testiranoj dozi od 0,015 mg/kg (15 pg/kg) SMT statistički značajno ($p < 0,01$) antagonizuje antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata za 98,5% u 0,5 h (slika 18). U

odnosu na 0,9% NaCl, SMT (0,015 mg/kg), primenjen bez magnezijum-sulfata, nije imao statistički značajnog uticaja na karageninsku hiperalgeziju (nije prikazano).

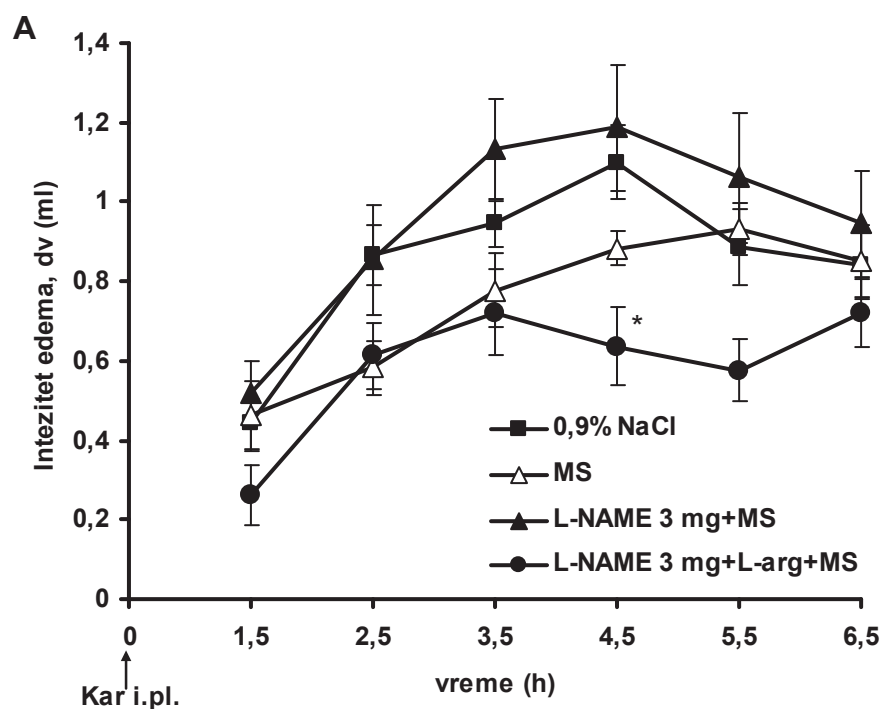


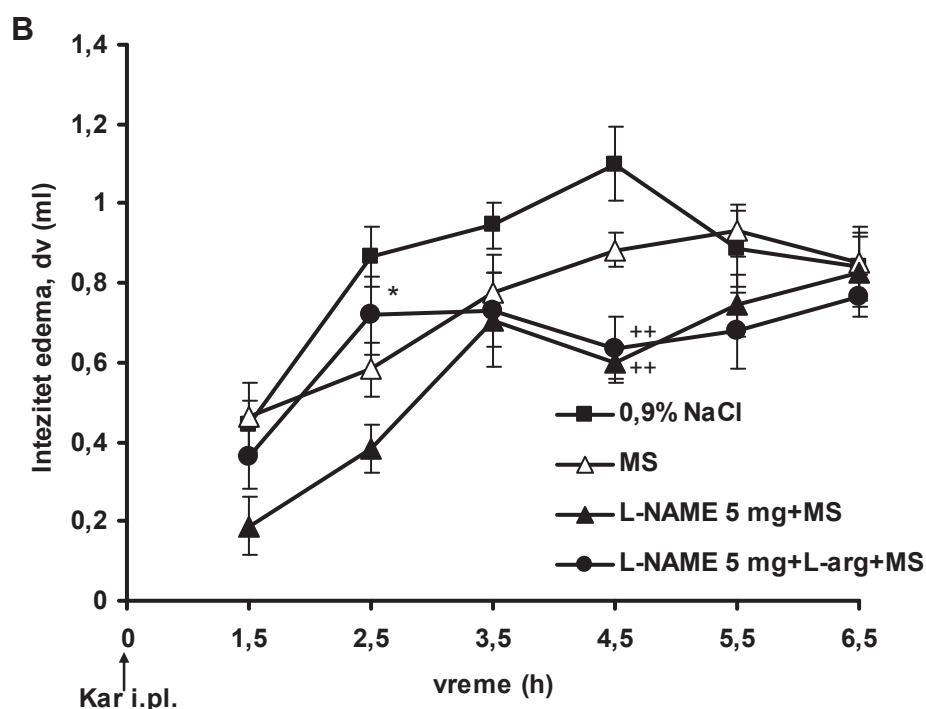
Slika 18. Vremenski tok dejstva SMT na efekt magnezijum-sulfata (MS) tokom karageninske (Kar) hiperalgezije kod pacova. SMT (0,005, 0,01 i 0,015 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MS (5 mg/kg) koji je dat supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost ($*p < 0,05$) je dobijena poređenjem kombinacije SMT 0,015+MS sa MS (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl. intraplantarno.

4.2.4. Dejstvo prekursora i inhibitora sintaze NO-a na antiedematozni efekt magnezijum-sulfata

Magnezijum-sulfat u dozi od 5 mg/kg, s.c. smanjuje edem šape izazvan zapaljenjem za $34 \pm 7,6$, $20,1 \pm 9,3$ i $20,9 \pm 3,9\%$ u 2,5, 3,5 i 4,5 h, respektivno. L-NAME, neselektivni inhibitor NOS, primenjen i.p. u dozi od 3 mg/kg antagonizuje efekt magnezijum-sulfata za 51,9, 55,7 i 47,6% u 2,5, 3,5 i 4,5 h, respektivno. L-arginin, prekursor NO-a, (0,4 mg/kg, s.c.) primenjen u kombinaciji sa L-NAME i magnezijum-sulfatom u potpunosti

antagonizuje efekt L-NAME od 3 mg/kg na dejstvo magnezijum-sulfata (slika 19A). L-NAME u dozi od 5 mg/kg u kombinaciji sa magnezijum-sulfatom potencira antiedematozno dejstvo magnezijum-sulfata u 2,5 h, a L-arginin smanjuje dejstvo L-NAME 5 mg/kg na efekt magnezijum-sulfata za 67,3% (slika 19B). U kontrolnoj grupi pacova, L-NAME (3 i 5 mg/kg) ili L-arginin ne utiču statistički značajno ($p>0,05$) na edem šape izazvan karageninom, u odnosu na 0,9% NaCl (nije prikazano).



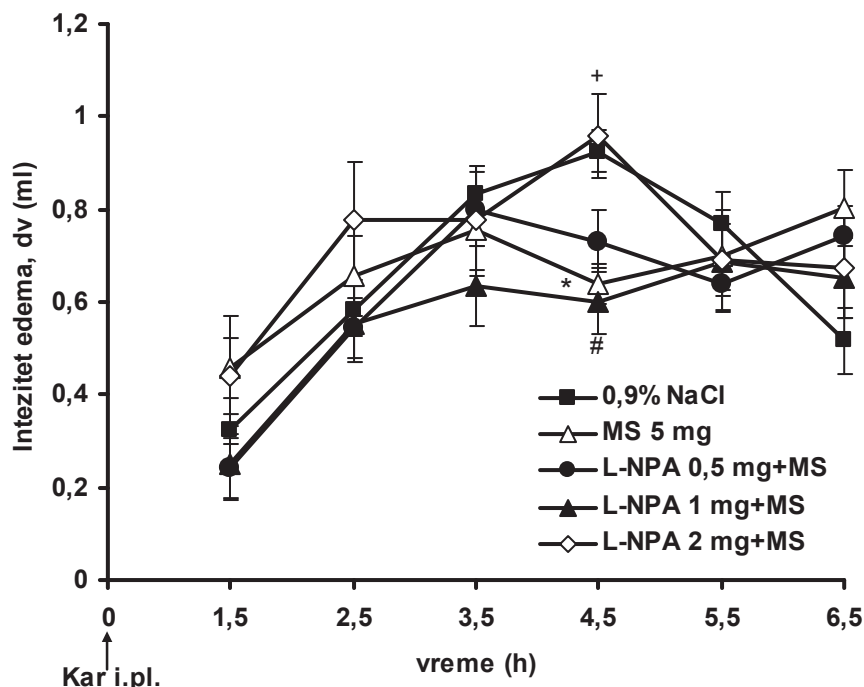


Slika 19. Vremenski tok dejstva L-NAME sa i bez L-arginina (L-arg) na efekt magnezijum-sulfata (MS) na edem šape pacova izazvan karageninom (Kar). L-NAME (3 i 5 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MS (5 mg/kg) $\pm$ L-arg (0,4 mg/kg) koji su dati simultano supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike volumena šape u mililitrima dv(ml) $\pm$ SEM pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. (A) Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa kombinacijom L-NAME 3+MS (* p <0,05) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). (B) Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa 0,9% NaCl (^{++}p <0,01) i poređenjem sa kombinacijom L-NAME 5+MS (* p <0,05) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

4.2.5. Dejstvo inhibitora neuralne sintaze NO-a na antiedematozni efekt magnezijum-sulfata

Magnezijum-sulfat statistički značajno (p <0,05) smanjuje otok šape za $30,9 \pm 4,7\%$ u 4,5 satu nakon izazivanja zapaljenja karageninom. L-NPA, selektivni inhibitor nNOS, u dozi od 2 mg/kg, i.p. statistički značajno (p <0,05) antagonizuje antiedematozni efekt magnezijum-sulfata (5 mg/kg) za 72,3% u 4,5 h, dok u manjim dozama od 1 i 0,5 mg/kg ima slab ili nikakav uticaj na antiedematozni efekt magnezijum-sulfata (slika 20). U

odnosu na 0,9% NaCl, sam L-NPA (2 mg/kg) nije imao statistički značajnog uticaja na edem šape izazvan karageninom (nije prikazano).

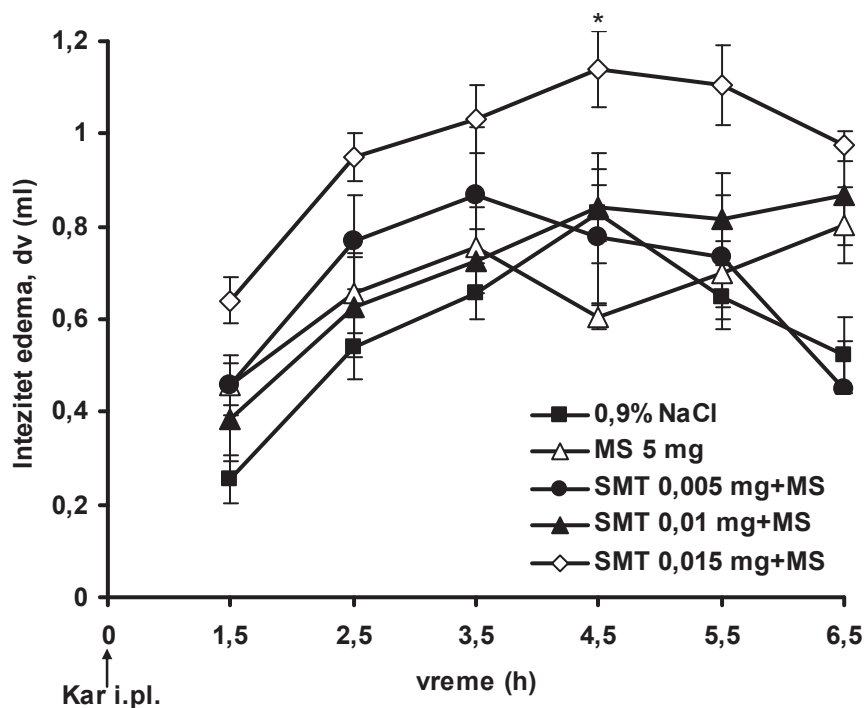


Slika 20. Vremenski tok dejstva L-NPA na efekt magnezijum-sulfata (MS) na edem šape pacova izazvan karageninom (Kar). L-NPA (0,5, 1 i 2 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MS (5 mg/kg) koji je dat supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike volumena šape u mililitrima dv(ml) $\pm$ SEM pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa 0,9% NaCl (* p <0,05), sa MS 5 (+ p <0,05), i poređenjem sa kombinacijom L-NPA 2+MS (# p <0,05) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl., intraplantarno.

4.2.6. Dejstvo inhibitora inducibilne sintaze NO-a na antiedematozni efekt magnezijum-sulfata

SMT, potentan i selektivan inhibitor iNOS, u dozi od 0,005 i 0,01 mg/kg (5 i 10 pg/kg) nije imao statistički značajan (p >0,05) uticaj na antiedematozni efekt magnezijum-sulfata (5 mg/kg) tokom zapaljenja izazvanog karageninom. U najvećoj testiranoj dozi od 0,015 mg/kg (15 pg/kg) SMT je statistički značajno (p <0,05) i u potpunosti (100%)

antagonizovao antiedematozni efekt magnezijum-sulfata u 4,5 h (slika 21). U odnosu na 0,9% NaCl, SMT (0,015 mg/kg), primenjen bez magnezijum-sulfata, nije imao statistički značajan ($p>0,05$) uticaj na edem šape izazvan karageninom (nije prikazano).



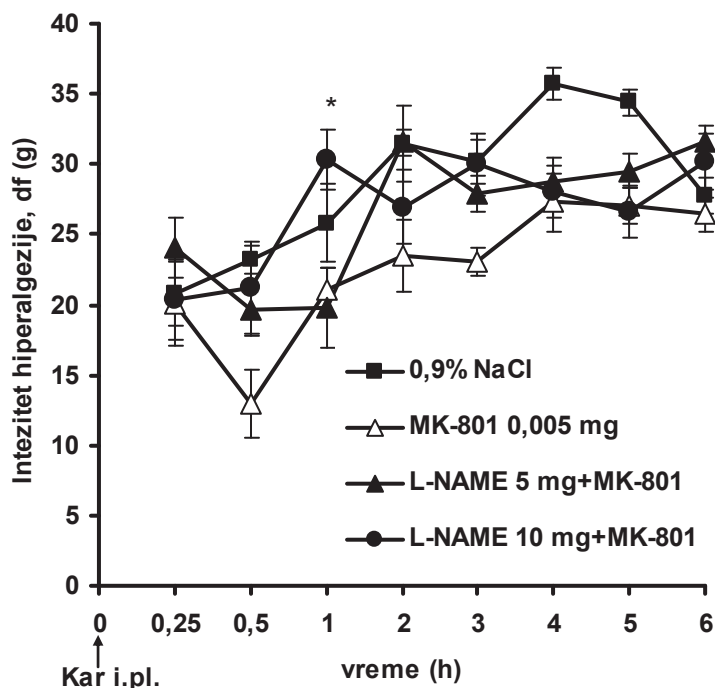
Slika 21. Vremenski tok dejstva SMT na efekt magnezijum-sulfata (MS) na edem šape pacova izazvan karageninom (Kar). SMT (0,005, 0,01 i 0,015 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MS (5 mg/kg) koji je dat supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike volumena šape u mililitrima dv(ml) $\pm$ SEM pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa MS 5 (* $p<0,05$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl., intraplantarno.

4.3. Uloga NO-a u mehanizmu antihiperalgezijskog i antiedematoznog dejstva dizocilpina u modelu somatskog inflamatornog bola i otoka kod pacova

Da bismo ispitali da li dizocilpin deluje preko NO-a, ispitali smo uticaj neselektivnog (L-NAME), neuralnog (L-NPA) i inducibilnog (SMT) inhibitora NOS na antihiperalgezijski i antiedematozni efekt dizocilpina u somatskom inflamatornom modelu bola i otoka kod pacova.

4.3.1. Dejstvo neselektivnog inhibitora sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt dizocilpina

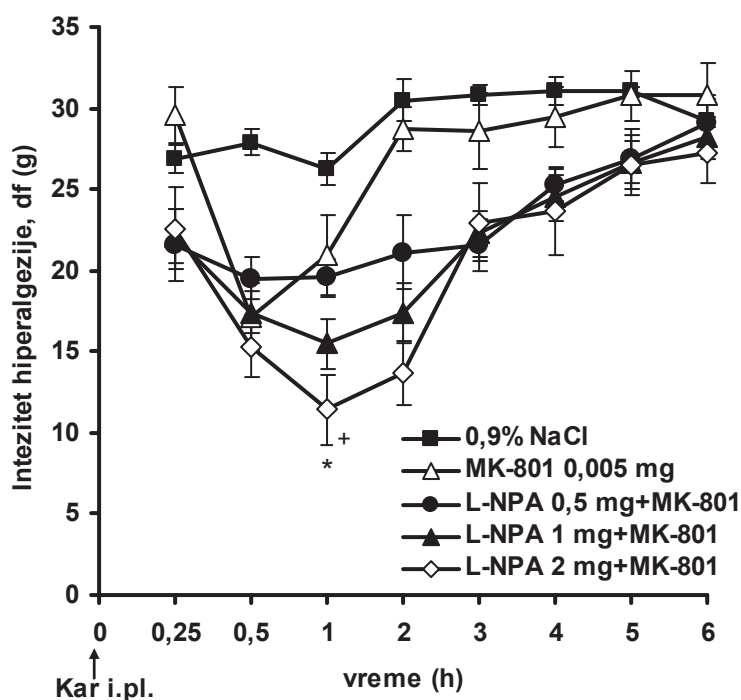
L-NAME, neselektivni inhibitor NOS, primenjen i.p. u pretretmanu u dozi od 10 mg/kg u potpunosti (100%) ($p < 0,05$) antagonizuje antihiperalgezijski efekt dizocilpina (0,005 mg/kg) u 1 h (slika 22). L-NAME u dozi od 5 mg/kg antagonizuje efekt dizocilpina za 55,4, 45 i 48,1% u 0,5, 1 i 5 h, redom. U dozi od 10 mg/kg L-NAME antagonizuje efekt dizocilpina za 77,3, 55,7 i 90% u 0,5, 2 i 3 h. Kada se primeni sam, bez dizocilpina, L-NAME (10 mg/kg) ne utiče statistički značajno ($p > 0,05$) na hiperalgeziju izazvanu karageninom u poređenju sa 0,9% NaCl (nije prikazano).



Slika 22. Vremenski tok dejstva L-NAME na efekt dizocilpina (MK-801) tokom karageninske (Kar) hiperalgezije kod pacova. L-NAME (5 i 10 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MK-801 (0,005 mg/kg) koji je dat supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem kombinacije L-NAME 10+MK-801 sa MK-801 ($*p < 0,05$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl. intraplantarno.

4.3.2. Dejstvo inhibitora neuralne sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt dizocilpina

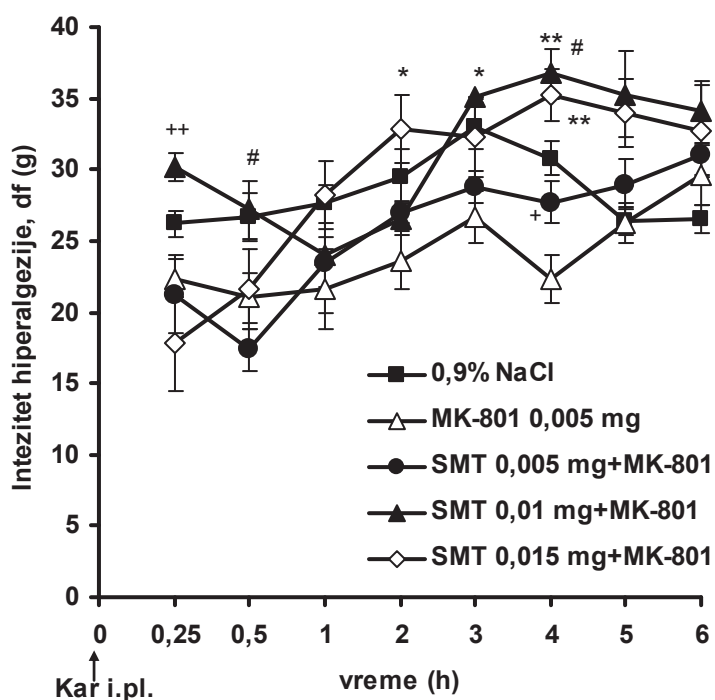
L-NPA, selektivni inhibitor nNOS, u dozi od 2 mg/kg, i.p. statistički značajno ($p<0,05$) povećava antihiperalgezijski efekt dizocilpina (0,005 mg/kg) u 1 h, dok u manjim dozama od 1 i 0,5 mg/kg ima slab ili nikakav uticaj na antihiperalgezijski efekta dizocilpina (slika 23). U poređenju sa 0,9% NaCl, sam L-NPA (2 mg/kg) nema statistički značajan ($p>0,05$) uticaj na karageninsku hiperalgeziju (nije prikazano).



Slika 23. Vremenski tok dejstva L-NPA na efekt dizocilpina (MK-801) tokom karageninske (Kar) hiperalgezije kod pacova. L-NPA (0,5, 1 i 2 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MK-801 (0,005 mg/kg) koji je dat supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem kombinacije L-NPA2+MK-801 sa MK-801 ($*p<0,05$) i poređenjem kombinacije L-NPA2+MK-801 sa kombinacijom L-NPA 0,5+MK-801 ($^+p<0,05$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl. intraplantarno.

4.3.3. Dejstvo inhibitora inducibilne sintaze NO-a na antihiperalgezijski efekt dizocilpina

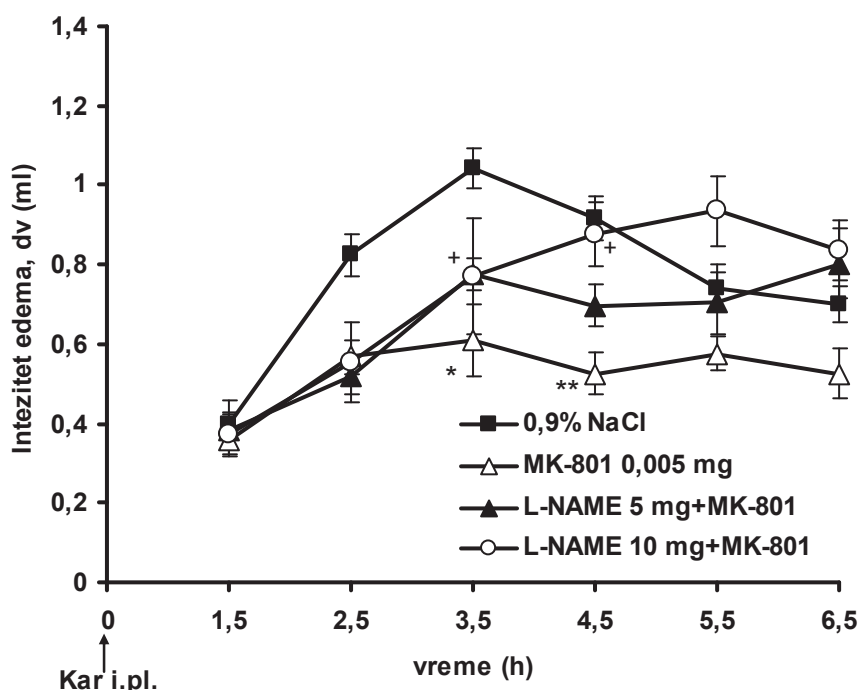
SMT, potentan i selektivan inhibitor iNOS, u dozi od 0,005, 0,01 i 0,015 mg/kg (5, 10 i 15 pg/kg) statistički značajano ($p < 0,05$) i na dozno-zavisan način redukuje antihiperalgezijski efekt dizocilpina (0,005 mg/kg) tokom hiperalgezije izazvane karageninom (slika 24). U odnosu na 0,9% NaCl, sam SMT (0,015 mg/kg) nije imao statistički značajan ($p > 0,05$) uticaj na karageninsku hiperalgeziju (nije prikazano).



Slika 24. Vremenski tok dejstva SMT na efekt dizocilpina (MK-801) tokom karageninske (Kar) hiperalgezije kod pacova. SMT (0,005, 0,01 i 0,015 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MK-801 (5 mg/kg) koji je dat supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: kombinacije SMT 0,01 ili 0,015+MK-801 sa MK-801 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), kombinacije SMT 0,005 ili 0,01+MK-801 sa SMT 15+MK-801 (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$), kao i poređenjem kombinacije SMT 5+MK-801 sa SMT 10+MK-801 (# $p < 0,05$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl. intraplantarno.

4.3.4. Dejstvo neselektivnog inhibitora sintaze NO-a na antiedematozni efekt dizocilpina

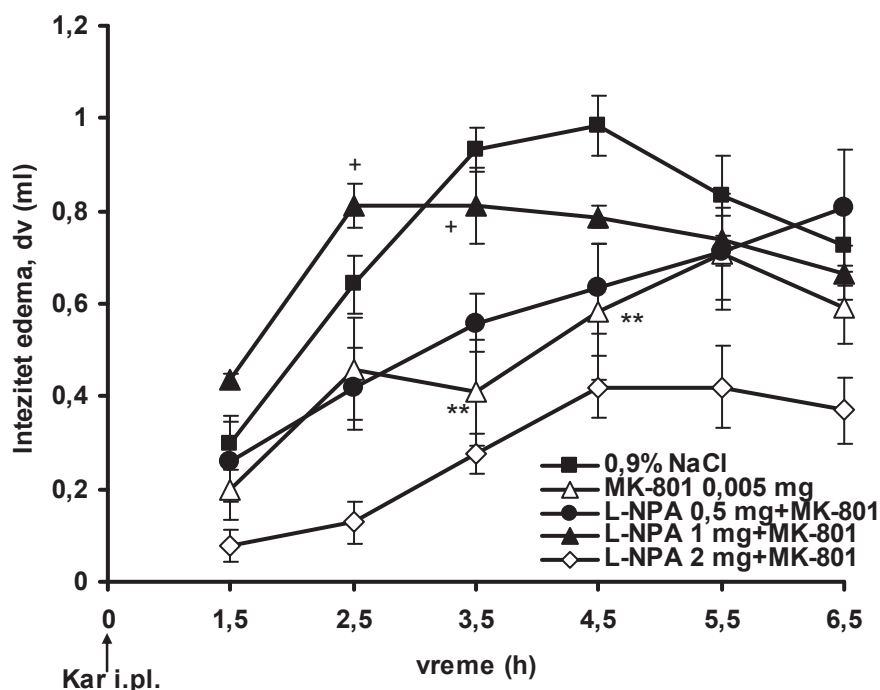
Dizocilpin u dozi od 0,005 mg/kg, s.c. statistički značajno ($p<0,05$, $p<0,01$) smanjuje edem šape izazvan zapaljenjem za $41,6 \pm 8,7$ i $42,7 \pm 5,7\%$ u 3,5 i 4,5 h, respektivno. L-NAME, neselektivni inhibitor NOS, primenjen i.p. u dozi od 10 mg/kg statistički značajno ($p<0,05$) antagonizuje efekt dizocilpina za 22,1 i 79,4% u 3,5 i 4,5 h, respektivno (slika 25). U poređenju sa 0,9% NaCl, L-NAME (10 mg/kg) nema ($p>0,05$) značajnog uticaja na razvoj edema izazvanog karageninom (nije prikazano).



Slika 25. Vremenski tok dejstva L-NAME na efekt dizocilpina (MK-801) na edem šape pacova izazvan karageninom (Kar). L-NAME (5 i 10 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MK-801 (0,005 mg/kg) koji je dat supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike volumena šape u mililitrima dv(ml) $\pm$ SEM pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa 0,9% NaCl (* $p<0,05$, ** $p<0,01$) i poređenjem kombinacije L-NAME 10+MK-801 sa MK-801 (+ $p<0,05$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl., intraplantarno.

4.3.5. Dejstvo inhibitora neuralne sintaze NO-a na antiedematozni efekt dizocilpina

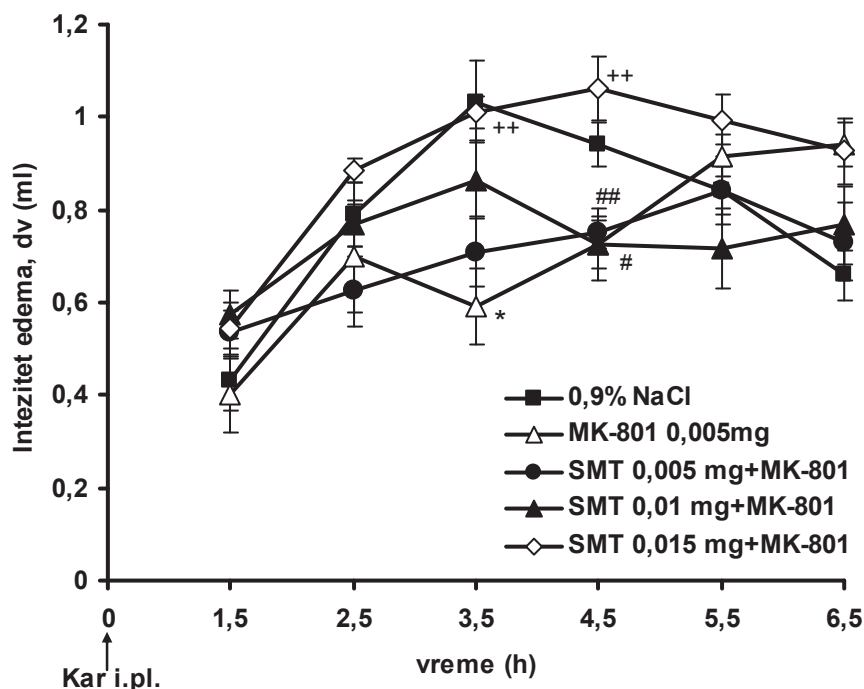
Dizocilpin (0,005 mg/kg, s.c.) statistički značajno ($p<0,01$) smanjuje otok šape za $55,4 \pm 11,8$ i $43,2 \pm 13,8\%$ u 3,5 i 4,5 satu, redom, nakon izazivanja zapaljenja karageninom. L-NPA, selektivni inhibitor nNOS, u dozi od 1 mg/kg, i.p. statistički značajno ($p<0,05$) antagonizuje antiedematozni efekt dizocilpina za 100 i 69,4% u 2,5 i 3,5 satu, redom. U manjoj (0,5 mg/kg) i većoj (2 mg/kg) dozi nema statistički značajan ($p>0,05$) uticaj na antiedematozni efekt dizocilpina (slika 26). U odnosu na 0,9% NaCl, sam L-NPA (2 mg/kg) nije imao statistički značajan ($p>0,05$) uticaj na edem šape izazvan karageninom (nije prikazano).



Slika 26. Vremenski tok dejstva L-NPA na efekt dizocilpina (MK-801) na edem šape pacova izazvan karageninom (Kar). L-NPA (0,5, 1 i 2 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MK-801 (0,005 mg/kg) koji je dat supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike volumena šape u mililitrima dv(ml) $\pm$ SEM pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa 0,9% NaCl ($**p<0,01$) i poređenjem kombinacije L-NPA 1+MK-801 ($^+p<0,05$) sa MK-801 (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl., intraplantarno.

4.3.6. Dejstvo inhibitora inducibilne sintaze NO-a na antiedematozni efekt dizocilpina

SMT, potentan i selektivan inhibitor iNOS, u dozi od 0,005, 0,01 mg/kg (5 i 10 pg/kg), nije imao statistički značajan ($p>0,05$) uticaj na antiedematozni efekt dizocilpina (0,005 mg/kg) tokom zapaljenja izazvanog karageninom. U najvećoj testiranoj dozi od 0,015 mg/kg (15 pg/kg) SMT je statistički značajno ($p<0,01$) antagonizovao antiedematozni efekt dizocilpina u 3,5 i 4,5 h za 85 i 94,9%, redom (slika 27). U odnosu na 0,9% NaCl, sam SMT (0,015 mg/kg), nije imao statistički značajan uticaj ($p>0,05$) na edem šape izazvan karageninom (nije prikazano).



Slika 27. Vremenski tok dejstva SMT na efekt dizocilpina na edem šape pacova izazvan karageninom (Kar). SMT (0,005, 0,01 i 0,015 mg/kg) je dat intraperitonealno 10 min pre MK-801 (0,005 mg/kg) koji je dat supkutano 5 min pre Kar. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike volumena šape u mililitrima dv(ml) $\pm$ SEM pre i posle nastanka zapaljenja, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa 0,9% NaCl (* $p<0,05$), kombinacije SMT 0,015+MK-801 sa MK-801 (++) $p<0,01$) i poređenjem kombinacije SMT 0,005 ili 0,01+MK-801 sa kombinacijom SMT 0,015+MK-801 (# $p<0,05$, ## $p<0,01$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test). i.pl., intraplantarno.

4.4. Uporedni efekti magnezijum-sulfata i dizocilpina u modelu visceralnog inflamatornog bola kod pacova

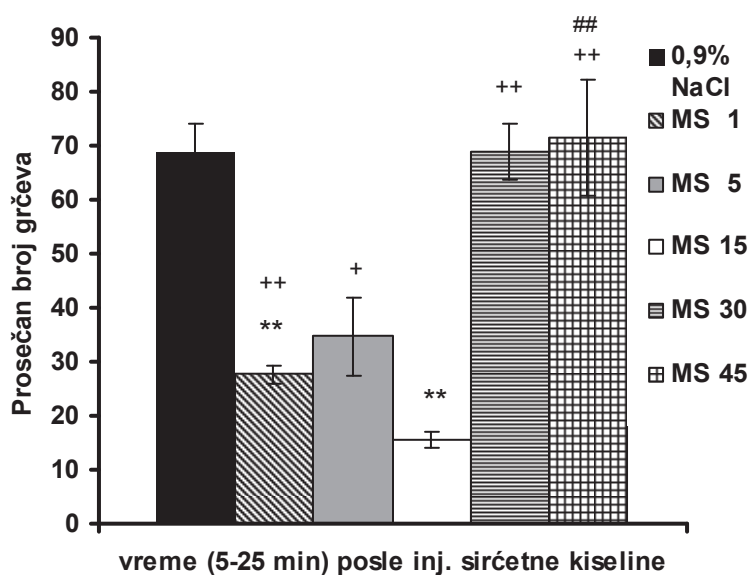
4.4.1. Sirćetnom kiselinom indukovani abdominalni grčevi kod pacova

Rastvor sirćetne kiseline (0,7%) ubrizgan u trbušnu duplju pacova izaziva karakteristično bolno ponašanje u vidu grčeva koji se javljaju 5 min nakon injekcije i broje se narednih 20 min. Između kontrolnih grupa koje su dobijale fiziološki rastvor, umesto ispitivanog leka, nije bilo statistički značajne razlike ($p>0,05$) u broju abdominalnih grčeva (nije prikazano).

4.4.2. Antinociceptivni efekti magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva kod pacova

U testu abdominalnih grčeva supkutana injekcija magnezijum-sulfata ili dizocilpina statistički značajno ($p<0,01$) smanjuje broj abdominalnih grčeva u odnosu na kontrolnu grupu, koja je dobila rastvor sirćetne kiseline i 0,9% NaCl (s.c.) umesto leka.

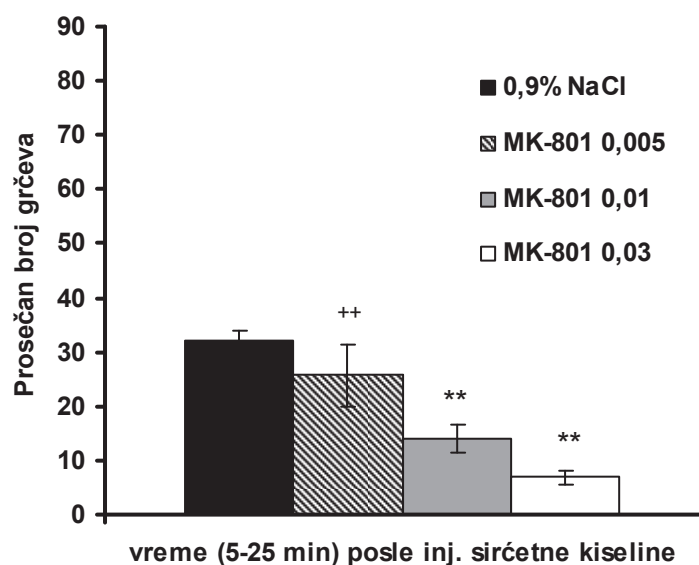
Kao što je pokazano na slici 28, kriva odnosa doze i odgovora nakon supkutane injekcije magnezijum-sulfata nema linearan oblik. Antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata je dvofazan. Magnezijum-sulfat u dozi od 1, 5 i 15 mg/kg ($U=0$, $p=0,002$) smanjuje broj grčeva za 60 ± 2 , 50 ± 11 i $77 \pm 2\%$, respektivno. U većim dozama od 30 i 45 mg/kg magnezijum-sulfat ne utiče statistički značajno ($p>0,05$) na broj grčeva (slika 28). Srednja efektivna (ED_{50}) vrednost (sa 95% intervalom poverenja (CL)) izračunata na osnovu krive odnosa doze i efekta prve, tj. antinociceptivne faze magnezijum-sulfata iznosi 6,6 mg/kg (1,5-11,23).



Slika 28. Antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata (MS) u testu abdominalnih grčeva izazvanih rastvorom sirćetne kiseline. MS (1, 5, 15, 30 i 45 mg/kg) je dat supkutano 10 minuta pre intraperitonealne injekcije (inj.) rastvora sirćetne kiseline. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost broja grčeva $\pm$ SEM dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena Kruskal–Wallis testom, a potom Mann–Whitney U-testom. $**p<0,05$ u odnosu na 0,9% NaCl, $+p<0,05$, $++p<0,01$ u odnosu na MS 15, $##p<0,01$ u odnosu na MS 1.

Supkutano primenjen 15 min pre rastvora sirćetne kiseline, dizocilpin u dozi od 0,005, 0,01 ($U=0$, $p<0,002$) i 0,03 ($U=0$, $p<0,004$) mg/kg statistički značajno smanjuje broj grčeva za 33 ± 11 , 56 ± 8 , i $79 \pm 4\%$, respektivno (slika 29). Kriva odnosa doze i antinociceptivnog dejstva dizocilpina pokazuje linearan oblik, odnosno dozno-zavisni efekt. Odgovarajuća ED_{50} (sa 95% intervalom poverenja) vrednost iznosi 0,009 mg/kg (0,002 – 0,004).

U kontrolnoj grupi pacova supkutana injekcija magnezijum-sulfata ili dizocilpina, bez rastvora sirćetne kiseline, ne izaziva abdominalne grčeve (nije prikazano).



Slika 29. Antinociceptivni efekt dizocilpina (MK-801) u testu abdominalnih grčeva izazvanih rastvorom sirćetne kiseline. MK-801 (0,005, 0,01 i 0,03 mg/kg) je dat supkutano 10 minuta pre intraperitonealne injekcije (inj.) rastvora sirćetne kiseline. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost broja grčeva $\pm$ SEM dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena Kruskal–Wallis testom, a potom Mann–Whitney U-testom. $**p < 0,05$ u odnosu na 0,9% NaCl, $^{++}p < 0,01$ u odnosu na MK-801 0,03.

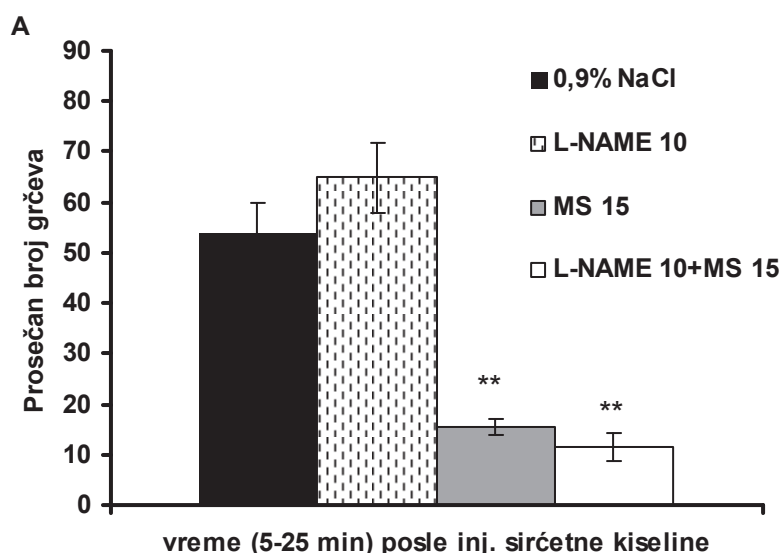
4.5. Uloga NO signalizacije u mehanizmu antinociceptivnog dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva

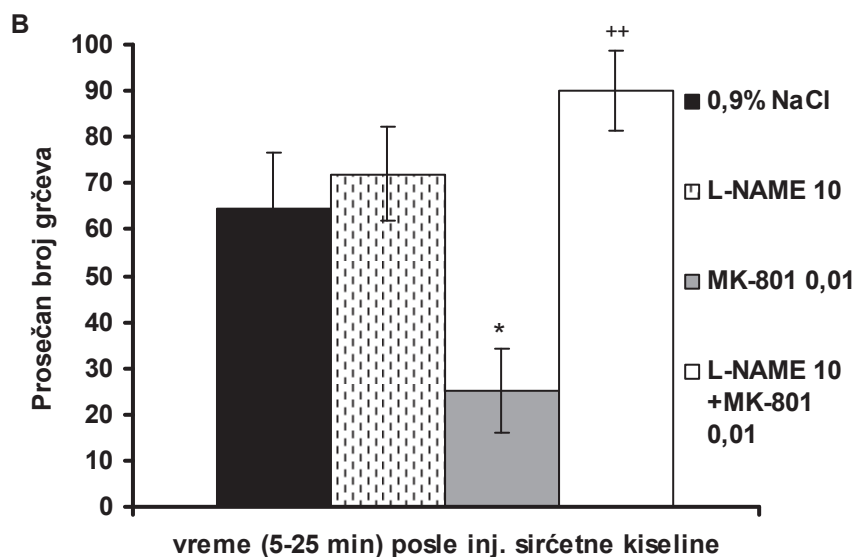
Da bismo ispitali da li magnezijum-sulfat i dizocilpin deluju preko NO-a, ispitali smo uticaj neselektivnog (L-NAME), neuralnog (L-NPA) i inducibilnog (SMT) inhibitora NOS na antinociceptivne efekte magnezijum-sulfata i dizocilpina u visceralnom inflamatornom modelu bola kod pacova. Zatim smo upotrebom inhibitora cGMP-a (metilensko plavo) i antagoniste ATP-zavisnih kalijumskih kanala (glibenklamid) ispitali da li u mehanizmu antinociceptivnih efekta magnezijum-sulfata i dizocilpina u visceralnom inflamatornom modelu bola kod pacova učestvuju cGMP, K^+ ATP sami ili aktivirani NO-om.

4.5.1. Uloga inhibitora NOS u mehanizmu antinociceptivnog dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva

4.5.1.1. Dejstvo neselektivnog inhibitora NOS na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva

L-NAME u dozi od 10 mg/kg i.p. ne utiče statistički značajno ($p>0,05$) na broj grčeva u poređenju sa 0,9% NaCl (slika 30A i 30B). L-NAME u istoj dozi nema uticaja ($p>0,05$) ni na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata (15 mg/kg, s.c.; slika 30A). U dozi od 10 mg/kg i.p., L-NAME u potpunosti antagonizuje antinociceptivni efekt dizocilpina (0,01 mg/kg, s.c.) ($U=1$, $p=0,004$; slika 30B).

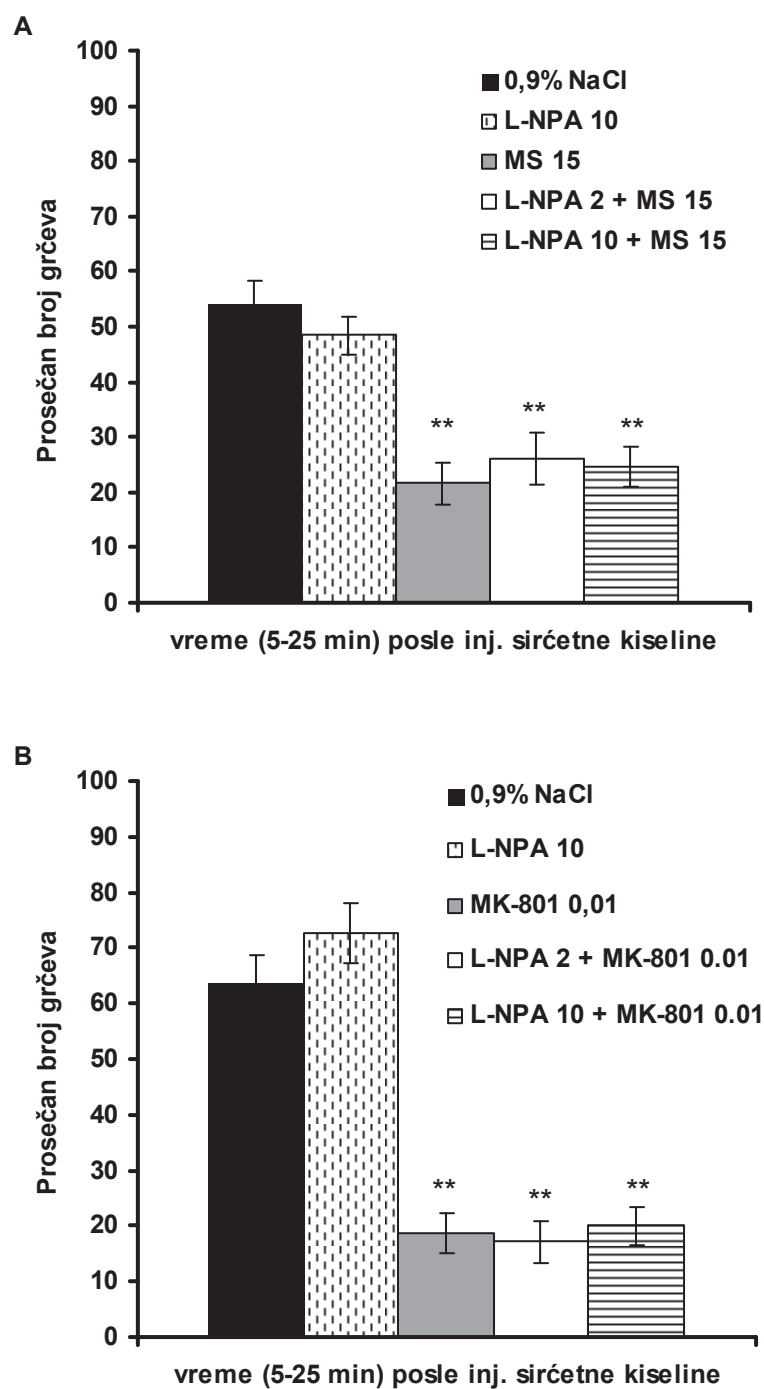




Slika 30. Dejstvo L-NAME na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata (MS) (A) i dizocilpina (MK-801) (B) u testu abdominalnih grčeva izazvanih rastvorom sirćetne kiseline. L-NAME (10 mg/kg) je dat 10 minuta pre MS/MK-801. MS (15 mg/kg)/MK-801 (0,01 mg/kg) je dat supkutano 15 minuta pre intraperitonealne injekcije (inj.) rastvora sirćetne kiseline. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost broja grčeva $\pm$ SEM dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena Kruskal–Wallis testom, a potom Mann–Whitney U-testom. (A) $**p < 0,01$ u odnosu na 0,9% NaCl. (B) $*p < 0,05$ u odnosu na 0,9% NaCl, $^{++}p < 0,01$ u odnosu na MK-801 0,03.

4.5.1.2. Dejstvo inhibitora neuralne sintaze NO-a na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva

L-NPA (2 i 10 mg/kg, i.p.) ne utiče statistički značajno ($p > 0,05$) na broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom u poređenju sa 0,9% NaCl (slika 31A i 31B). Magnezijum-sulfat (15 mg/kg, s.c.) i dizocilpin (0,01 mg/kg, s.c.) u poređenju sa 0,9% NaCl statistički značajno ($p < 0,01$) smanjuju broj grčeva izazvanih i.p. rastvorom sirćetne kiseline (slika 31A i 31B). U kombinaciji sa magnezijum-sulfatom ili dizocilpinom, L-NPA (2 i 10 mg/kg) nema statistički značajan uticaj ($p > 0,05$) na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata (slika 31A) i dizocilpina (slika 31B).

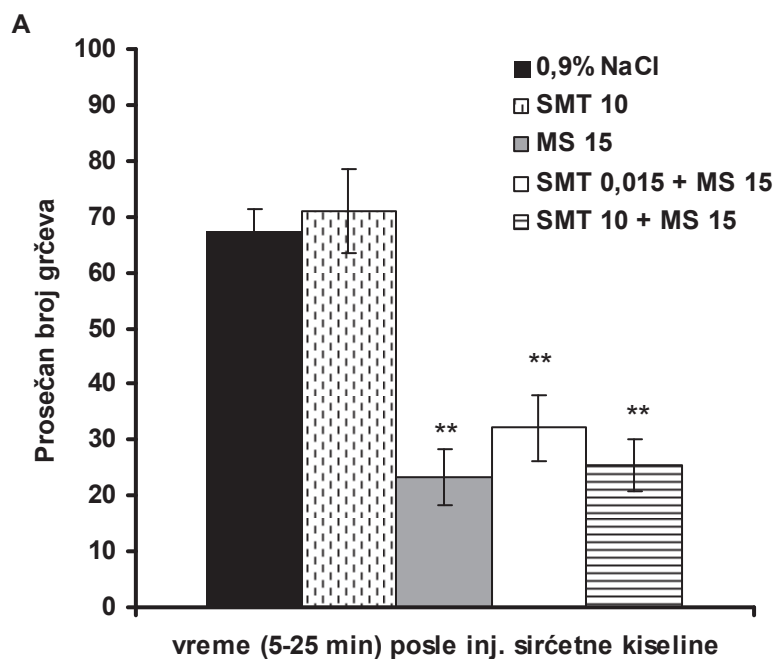


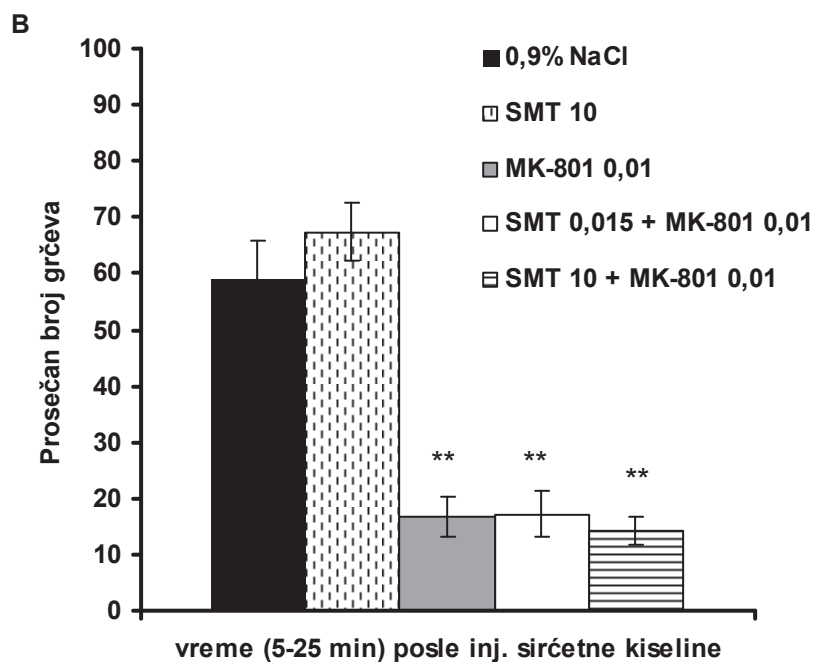
Slika 31. Dejstvo L-NPA na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata (MS) (A) i dizocilpina (MK-801) (B) u testu abdominalnih grčeva izazvanih rastvorom sirćetne kiseline. L-NPA (2 i 10 mg/kg) je dat 10 minuta pre MS/MK-801. MS (15 mg/kg)/MK-801 (0,01 mg/kg) je dat supkutano 15 minuta pre intraperitonealne injekcije (inj.) rastvora sirćetne kiseline. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost broja grčeva $\pm$ SEM

dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je određena Kruskal–Wallis testom, a potom Mann–Whitney U-testom. (A), (B) $**p<0,05$ u odnosu na 0,9% NaCl.

4.5.1.3. Dejstvo inhibitora inducibilne sintaze NO-a na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva

Sam SMT (0,015 i 10 mg/kg, i.p.) u poređenju sa 0,9% NaCl ne utiče statistički značajno ($p>0,05$) na broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (slika 32A i 32B). Magnezijum-sulfat (15 mg/kg, s.c.) i dizocilpin (0,01 mg/kg, s.c.) u poređenju sa 0,9% NaCl statistički značajno ($p<0,01$) smanjuju broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (slika 32A i 32B). SMT (0,015 i 10 mg/kg, i.p.) statistički značajano ne smanjuje ($p>0,05$) antinociceptivne efekte magnezijum-sulfata (slika 32A) i dizocilpina (slika 32B).





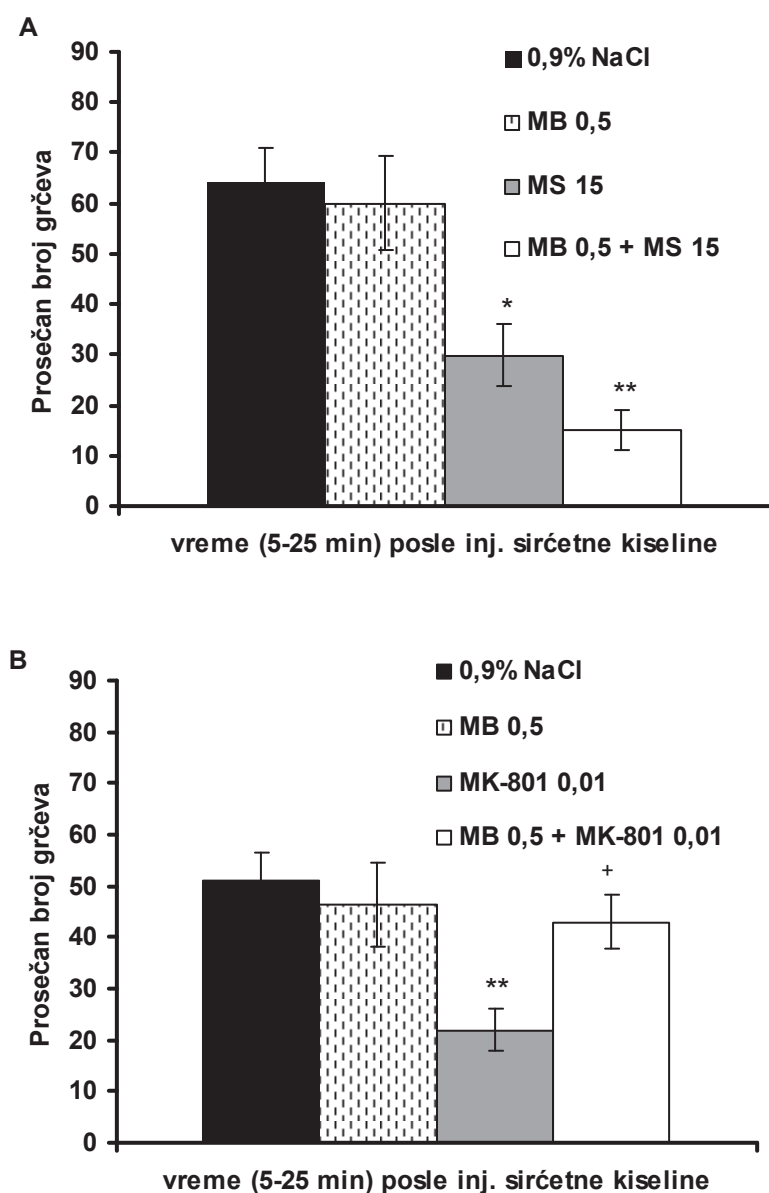
Slika 32. Dejstvo SMT na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata (MS) (A) i dizocilpina (MK-801) (B) u testu abdominalnih grčeva izazvanih rastvorom sirćetne kiseline. SMT (0,015 i 10 mg/kg) je dat 10 minuta pre MS/MK-801. MS (15 mg/kg)/MK-801 (0,01 mg/kg) je dat supkutano 15 minuta pre intraperitonealne injekcije (inj.) rastvora sirćetne kiseline. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost broja grčeva $\pm$ SEM dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je određena Kruskal–Wallis testom, a potom Mann–Whitney U-testom. (A), (B) $**p < 0,01$ u odnosu na 0,9% NaCl.

4.5.2. Uloga NO/cGMP/K⁺ATP puta u mehanizmu antinociceptivnog dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva

4.5.2.1. Uticaj metilenskog plavog na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva

Antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata (15 mg/kg, s.c.) nije statistički značajno ($p > 0,05$) promenjen pod dejstvom metilenskog plavog (0,5 mg/kg, s.c.), koje *per se* ne utiče na broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (slika 33A). Ista doza metilenskog

plavog u kombinaciji sa dizocilpinom statistički značajno ($U=4$, $p=0,026$) antagonizuje antinociceptivni efekt dizocilpina (0,01 mg/kg, s.c.) za 42,7% (slika 33B).

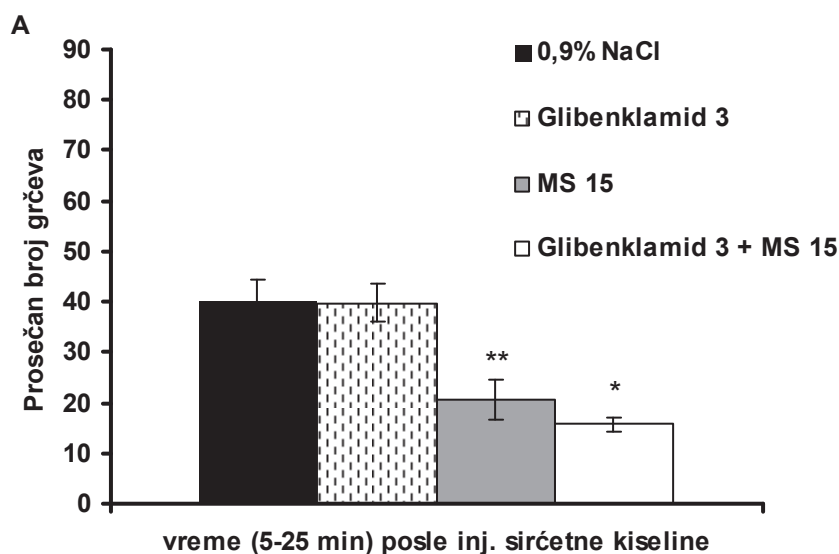


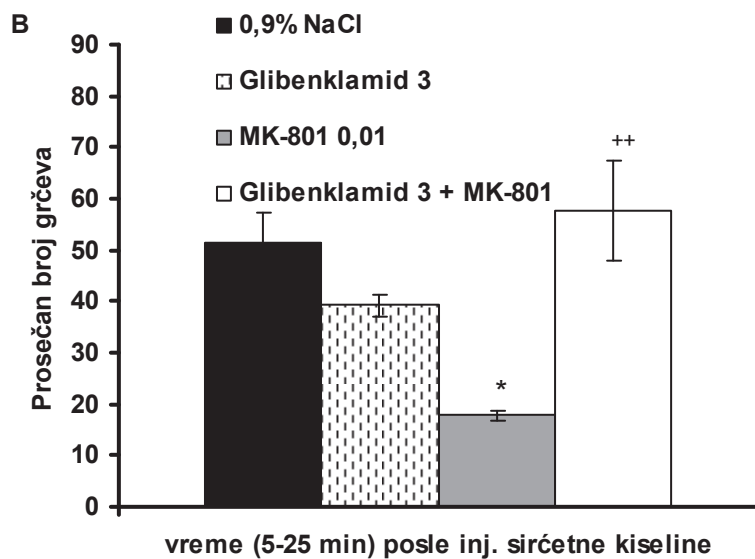
Slika 33. Dejstvo metilenskog plavog (MB) na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata (MS) (A) i dizocilpina (MK-801) (B) u testu abdominalnih grčeva izazvanih rastvorom sirćetne kiseline. MB (0,5 mg/kg) je dat supkutano 10 minuta pre MS/MK-801. MS (15 mg/kg)/MK-801 (0,01 mg/kg) je dat supkutano 15 minuta pre intraperitonealne injekcije (inj.) rastvora sirćetne kiseline. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost broja grčeva $\pm$ SEM dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena Kruskal–Wallis testom, a potom Mann–Whitney U-testom. (A)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ u odnosu na 0,9% NaCl. (B) ** $p < 0,01$ u odnosu na 0,9% NaCl, ⁺ $p < 0,05$ u odnosu na MK-801.

4.5.2.2. Uticaj glibenklamida na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina u testu abdominalnih grčeva

Supkutana injekcija glibenklamida u dozi od 3 mg/kg ne utiče statistički značajno ($p > 0,05$) na broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom, u poređenju sa 0,9% NaCl (slika 34A i 34B). Primenjen u kombinaciji sa magnezijum-sulfatom ili dizocilpinom, glibenklamid u subefektivnoj dozi (3 mg/kg, s.c.) ne utiče statistički značajno ($p > 0,05$) na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata (15 mg/kg, s.c.; slika 34A), dok statistički značajno ($U = 1,5$, $p = 0,004$) smanjuje antinociceptivni efekt dizocilpina (0,01 mg/kg, s.c.; slika 34B) za 64%. U kontrolnoj grupi pacova, alkohol (97% m/v; s.c.) dat u zapremini od 2 ml/kg nije imao statistički značajan uticaj na broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom (nije prikazano).



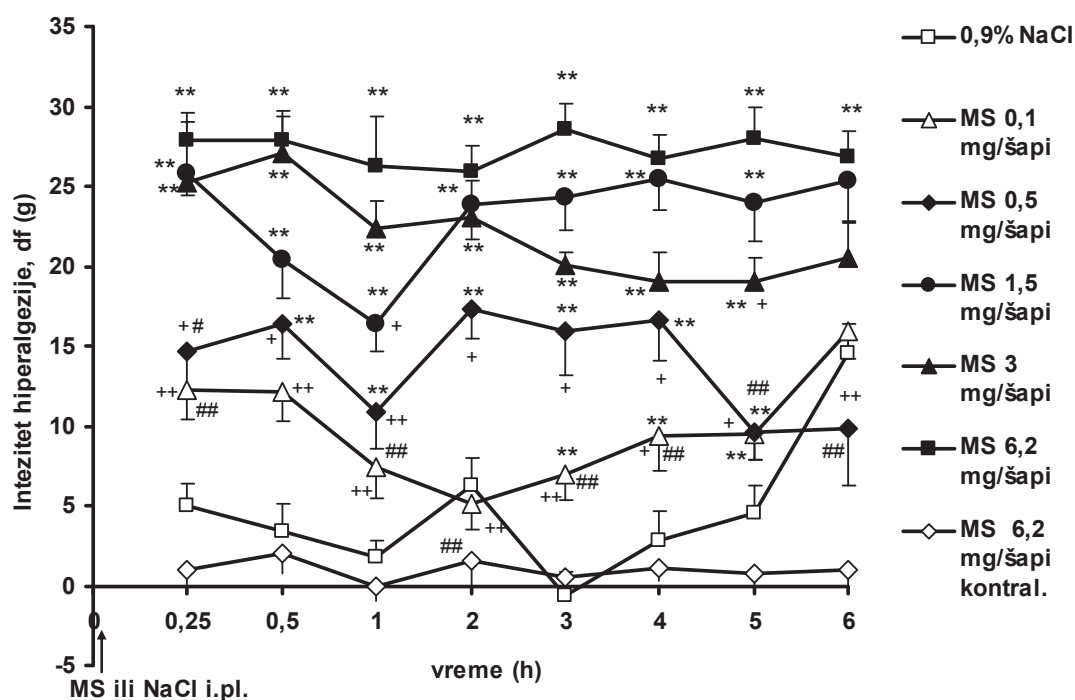


Slika 34. Dejstvo glibenklamida na antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata (MS) (A) i dizocilpina (MK-801) (B) u testu abdominalnih grčeva izazvanih rastvorom sirćetne kiseline. Glibenklamid (3 mg/kg) je dat supkutano 10 minuta pre MS/MK-801. MS (15 mg/kg)/MK-801 (0,01 mg/kg) je dat supkutano 15 minuta pre intraperitonealne injekcije (inj.) rastvora sirćetne kiseline. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost broja grčeva $\pm$ SEM dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena Kruskal–Wallis testom, a potom Mann–Whitney U-testom. (A) $*p<0,05$, $**p<0,01$ u odnosu na 0,9% NaCl. (B) $*p<0,05$ u odnosu na 0,9% NaCl, $^{++}p<0,01$ u odnosu na MK-801.

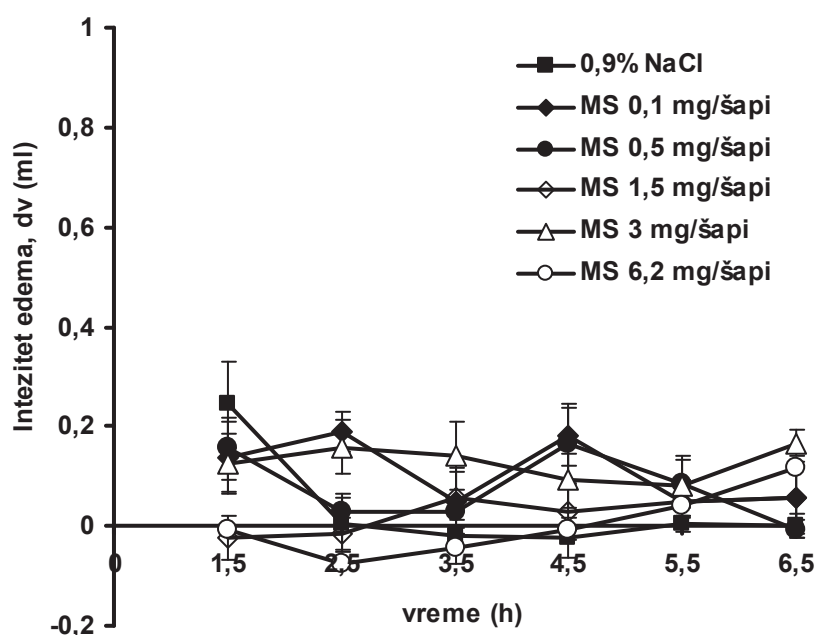
4.6. Lokalna periferna hiperalgezija izazvana intraplantarnom injekcijom magnezijum-sulfata kod pacova

Magnezijum-sulfat dat je supkutano u zadnji desni taban šape pacova u četiri doze. Sa povećanjem doze dolazi do povećanja hiperalgezije. Magnezijum-sulfat (0,5, 5, 3 i 6,2 mg/šapi, s.c.) statistički značajno ($p<0,05$) smanjuje prag podizanja šape na mehanički stimulus na dozno-zavisan način u odnosu na injekciju 0,9% NaCl (slika 35). Nije bilo statistički značajne razlike u bazalnom pragu bola na mehanički stimulus između ispitivanih grupa (nije prikazano). Najveća ispitana doza (6,2 mg/šapi) odgovara izotoničnom rastvoru magnezijum-sulfata (6,2% ili 250 mmol/L). Hiperalgezijski efekt nastupa 15 minuta nakon injekcije i održava se u sličnom intezitetu narednih šest sati. Maksimalno smanjenje praga bola iznosi oko 27 do 33 g i dešava se u 3 satu. Nakon

intraplantarne injekcije najveće ispitane doze magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi) prag bola na kontralateralnoj šapi nije bio izmenjen, što ukazuje na odsustvo sekundarne hiperalgezije i lokalni karakter bola. Lokalna injekcija magnezijum-sulfata u zadnju šapu izaziva blagi eritem na mestu injekcije (slika 37) bez razvoja edema šape (slika 36, 37).



Slika 35. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog dejstva magnezijum-sulfata (MS) na prag povlačenja intaktne šape pacova na mehanički stimulus. MS (0,1, 0,5, 1,5, 3 i 6,2 mg/šapi) je ubrizgan intraplantarно (i.pl.) u zadnji taban šape pacova u konačnom volumenu od 0,1 ml po šapi pacova. Prag povlačenja šape na mehanički stimulus je meren na mestu ubrizgavanja ili na kontralateralnoj (kontral.) šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle primene MS, dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa 0,9% NaCl (** $p < 0,01$), sa MS 6,2 ($^+p < 0,05$, $^{++}p < 0,01$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test), poređenjem MS 1,5 sa 0,5/0,1 ($^{\#}p < 0,05$, $^{\#\#}p < 0,01$).



Slika 36. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog dejstva magnezijum-sulfata (MS) na volumen šape pacova. MS (0,1, 0,5, 1,5, 3 i 6,2 mg/šapi) je ubrizgan intraplantarno (i.pl.) u zadnji taban šape pacova u konačnom volumenu od 0,1 ml po šapi pacova. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike volumena šape u mililitrima dv(ml) $\pm$ SEM pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost nije nađena ni u jednoj vremenskoj tački ($p > 0,05$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).



Slika 37. Fotografije šape pacova nakon intraplantarne injekcije izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata. Magnezijum-sulfat je ubrizgan u desnu šapu. Na slikama se vidi da

na desnoj šapi, u odnosu na levu šapu, nema promene volumena šape (edema) i da je prisustna hiperemija na mestu injekcije.

4.7. Mehanizam nastanka hiperalgezije posle intraplantarne injekcije izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata kod pacova

Magnezijum-sulfat u dozi od 6,2 mg/šapi odgovara izotoničnom rastvoru magnezijum-sulfata, sa pH vrednošću oko 6,0. U toj dozi, supkutano dat u šapu pacova izaziva smanjenje praga bola, koje je po intezitetu sličano bolu koji se izaziva nekim eksperimentalnim supstancama (npr. karageninu, kao u našem istraživanju).

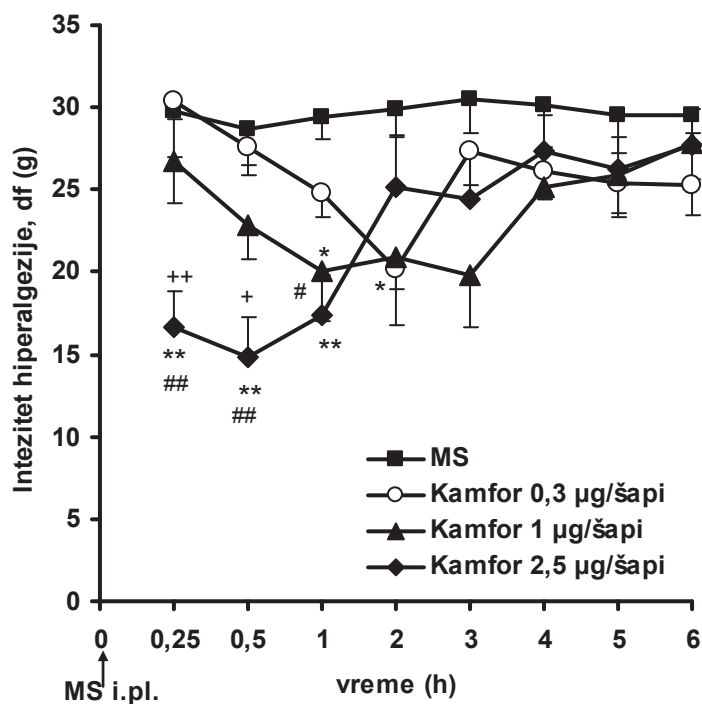
Cilj ovog dela istraživanja bio je ispitivanje mehanizma pronociceptivnog dejstva izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata. Koristili smo antagoniste TRPA1 kanala (kamfor-neselektivni i HC-030031-selektivni), antagonistu TRPV1 kanala (kapsazepin), antagonistu TRPV4 kanala (RN-1734), neselektivnog ASIC inhibitora (amilorid), antagonistu NMDA receptora (dizocilpin), neselektivnog (L-NAME)-, neuralnog (ARL-17477) i inducibilnog (SMT) inhibitora sintaze azotnog oksida, neselektivnog inhibitora gvanilatne ciklaze (metilensko plavo) i neselektivnog inhibitora ciklooksigenaze (diklofenak).

4.7.1. Uloga TRP receptora u nastanku pronociceptivnog efekta izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata

4.7.1.1. Uticaj inhibicije TRPA1 receptora na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziiju šape pacova

Kamfor, neselektivni TRPA1 antagonist, statistički značajno ($p < 0,05$, $p < 0,01$) antagonizuje pronociceptivni efekt magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi). U dozama od 0,3, 1 i 2,5 $\mu\text{g}/\text{šapi}$ kamfor izaziva maksimalni antihiperalgezijski efekt od $32,4 \pm 9,5$, $31,5 \pm 8,1$ i $49,8 \pm 6,5\%$ koji se javlja u 2, 1 i 0,5 h nakon injekcije, respektivno (slika 38). Efekt je dozno-zavisan u prvih sat vremena nakon primene. Kamfor (2,5 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) injiciran u kontralateralnu šapu nije imao statistički značajan ($p > 0,05$) efekt na

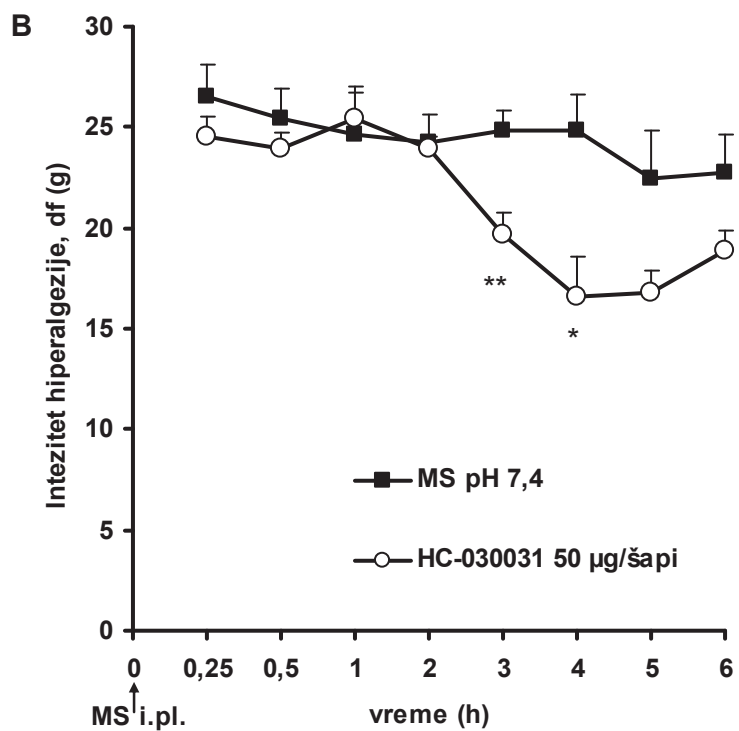
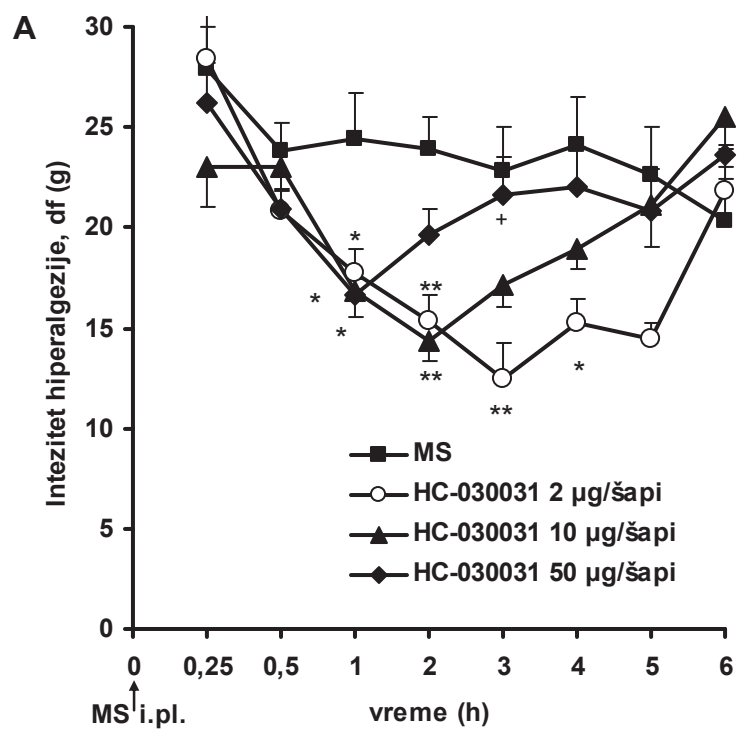
hiperalgeziju izazvanu magnezijum-sulfatom, što ukazuje na lokalno dejstvo kamfora (nije prikazano).



Slika 38. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva kamfora (0,3, 1 i 2,5 µg/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa magnezijum-sulfatom (MS, 6,2 mg/šapi). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima df(g) ± SEM na šapu pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost dobijena je poređenjem: sa kontrolom (MS) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), kamfora 2,5 i 1 (* $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$) i između kamfora 2,5 i 0,3 (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$) (One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

Intraplantarna koadministracija magnezijum-sulfata sa selektivnim TRPA1 inhibitorom HC-030031 dovodi do statistički značajnog ($p < 0,05$, $p < 0,01$) i dozno-zavisnog povećanja praga bola (slika 39A). Maksimalna inhibicija hiperalgezije sa HC-030031 u dozi od 2, 10 i 50 µg/šapi (ili 5,6, 28,1 i 140 nmol/šapi, redom) iznosi $45,7 \pm 8,2$, $40,1 \pm 3,9$ i $31,9 \pm 3,6\%$, i postiže se u 3, 2 i 1 h, respektivno (slika 39A). Kontralateralna injekcija HC-030031 u dozi od 140 nmol/šapi statistički značajno ($p > 0,05$) nije uticala

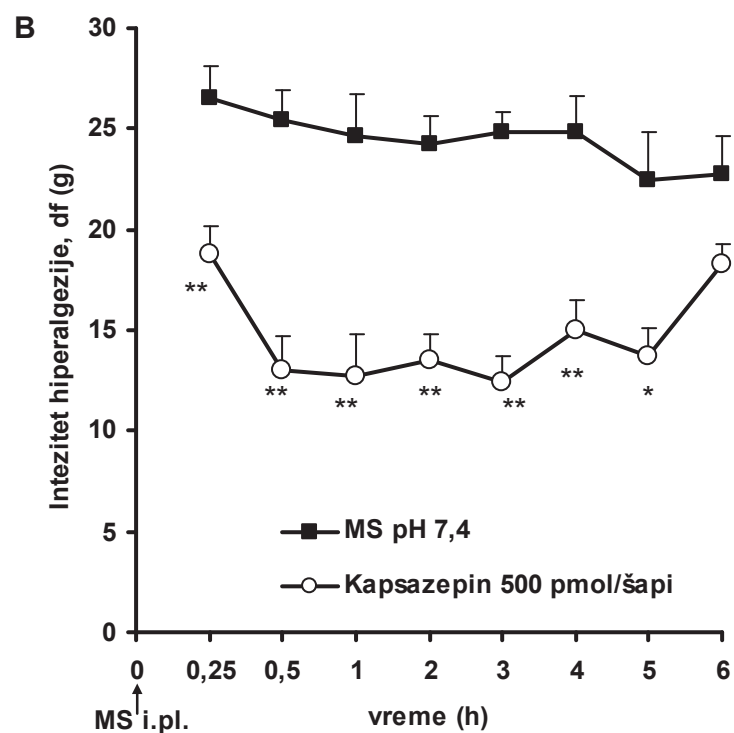
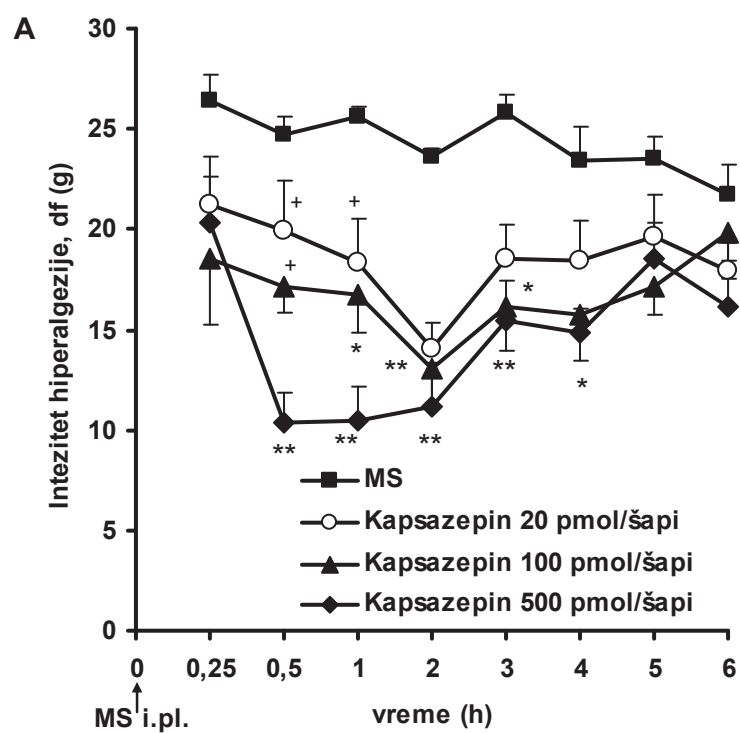
na hiperalgeziju, ukazujući na lokalno periferno antihiperalgezijsko dejstvo (nije prikazano).



Slika 39. Efekt TRPA1 antagoniste na mehaničku hiperalgeziju izazvanu izotoničnim pH-nepodešenim (A) i pH-podešenim (B) rastvorom magnezijum-sulfata. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva HC-030031 (2, 10 i 50 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (MS, 6,2 mg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $\text{df(g)} \pm \text{SEM}$ na šapu pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom (A) i Studentov t-test za nezavisne uzorke (B). (A) Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (MS) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), HC-030031 2 i 50 (* $p < 0,05$). (B) Statistička značajnost (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) je dobijena poređenjem sa kontrolom (pH-podešeni izotoničan MS, pH 7,4).

4.7.1.2. Uticaj inhibicije TRPV1 receptora na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziju šape pacova

Intraplantarna injekcija magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi) sa rastućim dozama kapsazepina dovodi do statistički značajnog ($p < 0,05$, $p < 0,01$) porasta praga bola na mehanički stimulus (slika 40). Efekt je dozno-zavisan u prvih sat vremena nakon administracije. Maksimalna inhibicija hiperalgezije sa dozama od 20, 100 i 500 pmol/šapi (ili 0,0075, 0,04 i 0,2 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) je registrovana u 2, 2 i 1 satu nakon administracije i iznosi $40,3 \pm 5,4$, $44,5 \pm 8,3$ i $59,4 \pm 6,8\%$, respektivno (slika 40A). Antihiperalgezijski efekt kapsazepina ima lokalni periferni karakter, s obzirom da kontralateralno ubrizgan sa najvećom testiranom dozom (500 pmol/šapi) nije imao statistički značajan ($p > 0,05$) uticaj na magnezijum-sulfatom indukovanu hiperalgeziju (nije prikazano).

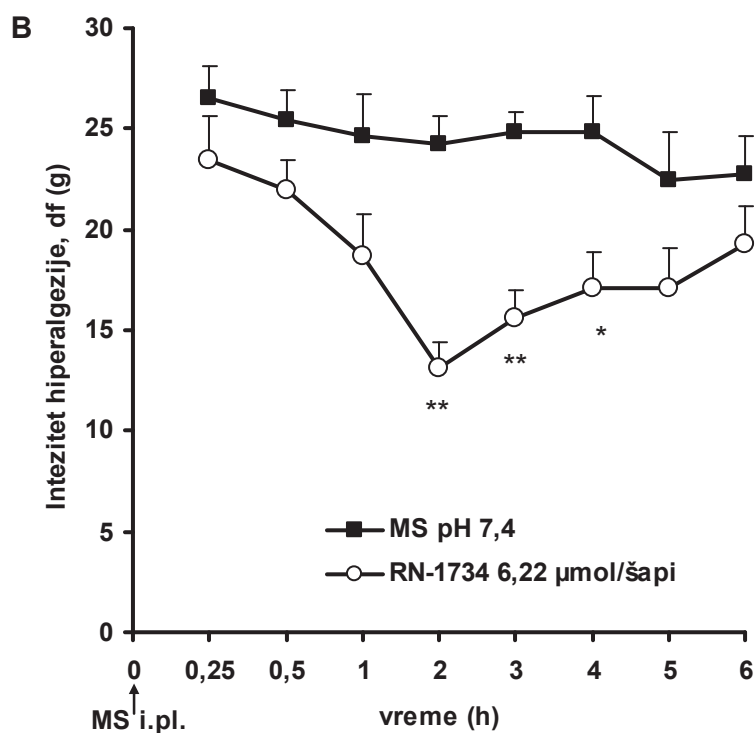
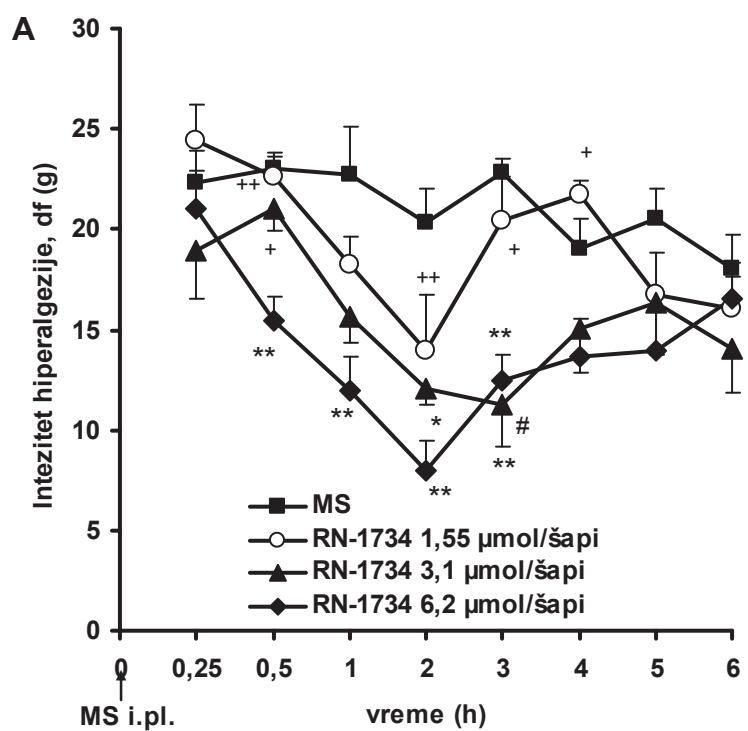


Slika 40. Efekt TRPV1 antagoniste na mehaničku hiperalgeziju izazvanu izotoničnim pH-nepodešenim (A) i pH-podešenim (B) rastvorom magnezijum-sulfata. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva kapsazepina (2, 100 i 500

pmol/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (MS, 6,2 mg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom (A) i Studentov t-test za nezavisne uzorke (B). (A) Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (MS) ($*p<0,05$, $**p<0,01$), kapsazepina 20/100 sa 50 ($^+p<0,05$). (B) Statistička značajnost ($*p<0,05$, $**p<0,01$) je dobijena poređenjem sa kontrolom (pH-podešeni izotoničan MS, pH 7,4).

IV.7.1.3. Uticaj inhibicije TRPV4 receptora na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziju šape pacova

Nakon lokalne periferne primene, RN-1734 primenjen istovremeno sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi) u zadnju šapu pacova statistički značajno ($p<0,05$, $p<0,01$) smanjuje pronociceptivno dejstvo magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi) (slika 41A). Inhibitorni efekt ovog selektivnog TRPV4 antagoniste je dozno-zavisan. Sa porastom doze RN-1734 (1,55, 3,1 i 6,2 $\mu\text{mol/šapi}$ ili 0,55, 1,1 i 2,2 mg/šapi, respektivno) značajno se povećava antihiperalgezijski efekt. Maksimum inhibitornog dejstva iznosi $31,5 \pm 13,6$, $50,9 \pm 9$ i $60,7 \pm 7,4\%$ i postiže se u 2, 3 i 2 h nakon administracije, redom. Kada je RN-1734 (6,2 $\mu\text{mol/šapi}$, i.pl.) ubrizgan u kontralateralnu šapu nije imao statistički značajnog ($p>0,05$) uticaja na hiperalgeziju izazvanu magnezijum-sulfatom što ukazuje na lokalno periferno dejstvo (nije prikazano).

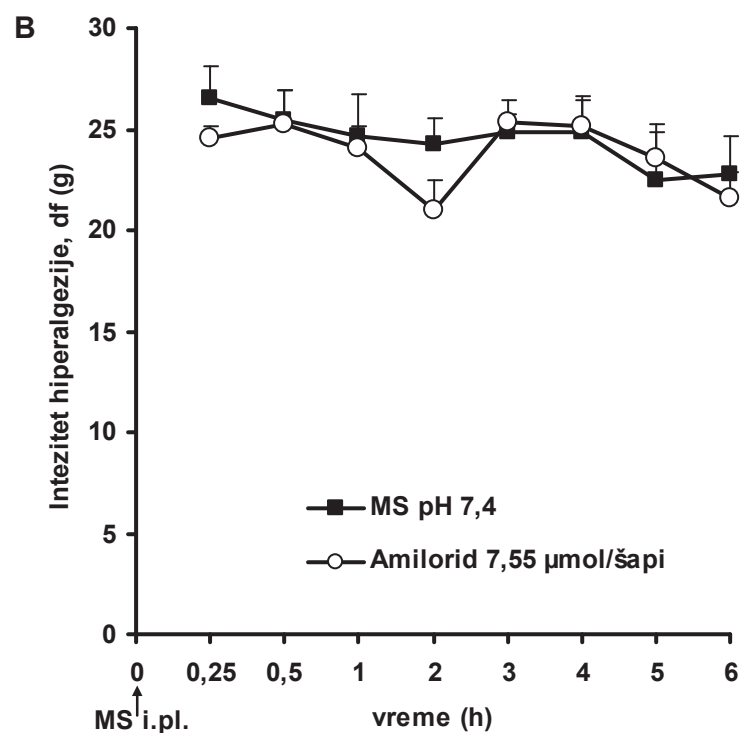
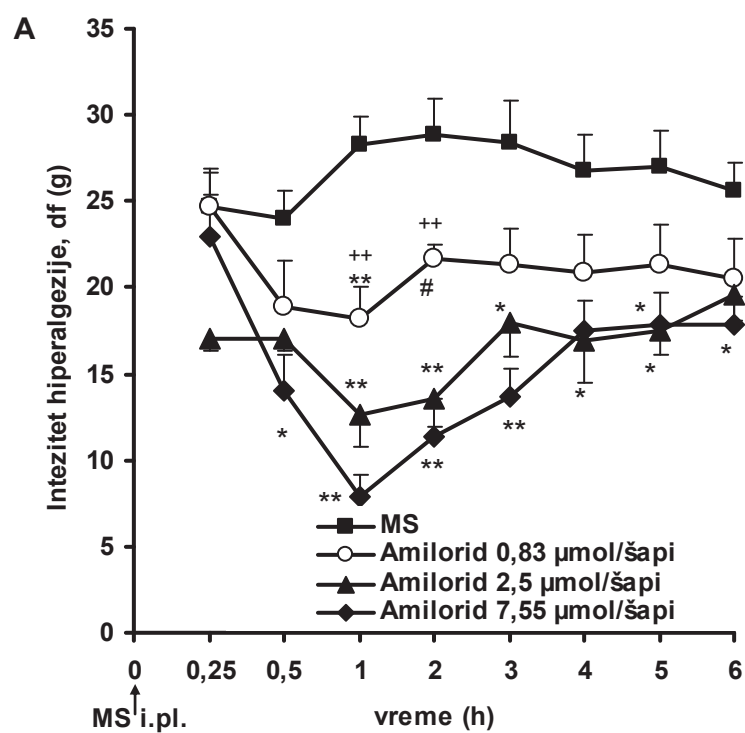


Slika 41. Efekt TRPV4 antagoniste na mehaničku hiperalgeziju izazvanu izotoničnim pH-nepodešenim (A) i pH-podešenim (B) rastvorom magnezijum-sulfata. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva RN-1734 (1,55, 3,1 i 6,2

μmol/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (MS, 6,2 mg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom (A) i Studentov t-test za nezavisne uzorke (B). (A) Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (MS) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), RN-1734 1,55/3,1 sa 6,2 (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$). (B) Statistička značajnost (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) je dobijena poređenjem sa kontrolom (pH-podešeni izotoničan MS, pH 7,4).

4.7.1.4. Uticaj inhibicije ASIC receptora na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziju šape pacova

Istovremena intraplantarna primena amilorida (neselektivnog inhibitora ASIC kanala) i izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata u zadnju šapu pacova izaziva statistički značajno ($p < 0,05$, $p < 0,01$) i dozno-zavisno smanjenje hiperalgezije na mehanički stimulus. U rastućim dozama amilorid (0,83, 2,5 i 7,55 μmol/šapi ili 0,22, 0,67 i 2 mg/šapi, redom) povećava prag podizanja šape na mehanički stimulus za $35,7 \pm 6,4$, $55,3 \pm 6,8$ i $72,3 \pm 4,8\%$, redom. Inhibitorski uticaj amilorida traje šest sati, a maksimum dostiže sat vremena nakon primene (slika 42A). Amiorid na lokalnom perifernom nivou antagonizuje efekt magnezijum-sulfata, s obzirom da amilorid (7,55 μmol/šapi, i.pl.) nije smanjio hiperalgeziju kada je ubrizgan u kontralateralnu šapu (nije prikazano).



Slika 42. Efekt ASIC inhibitora na mehaničku hiperalgeziju izazvanu izotoničnim pH-nepodešenim (A) i pH-podešenim (B) rastvorom magnezijum-sulfata. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva amilorida (0,83, 2,5 i 7,55 $\mu\text{mol}/\text{šapi}$)

nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (MS, 6,2 mg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom (A) i Studentov t-test za nezavisne uzorke (B). (A) Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (MS) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), amilorida 0,83 sa 7,55 ($^{++}p < 0,01$) i između amilorida 0,83 sa 2,5 ($^{#}p < 0,05$). (B) Statistička značajnost nije nađena ni u jednoj vremenskoj tački ($p > 0,05$).

4.7.2. Uticaj pH rastvora magnezijum-sulfata na razvoj hiperalgezije šape pacova

Nakon intraplantarne injekcije rastvor izotoničnog magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi) koji je pH-podešen do fizioloških vrednosti (7,4) izaziva statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje praga podizanja šape na mehanički stimulus u poređenju sa destilovanom vodom (nije prikazano). U poređenju sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata koji nije pH podešen (pH oko 6,0), pH-podešen izotonični rastvor magnezijum-sulfata izaziva hiperalgeziju sličnog stepena i trajanja ($p > 0,05$).

Efekti najviših testiranih doza antagonista TRP i ASIC receptora su ispitani i pri fiziološkim vrednostima pH rastvora izotoničnog magnezijum-sulfata, a zatim su njihovi efekti upoređivani u odnosu na pH-nepodešene uslove. Efekt antagoniste TRPV1, TRPV4 i TRPA1 receptora na hiperalgeziju pri fiziološkim pH vrednostima (7,4) magnezijum-sulfata je sličan, slabijeg inteziteta ili se kasnije javlja, redom, u odnosu na isti efekt nakon ubrizgavanja pH-nepodešenog rastvora magnezijum-sulfata; antagonist ASIC pri pH vrednostima magnezijum-sulfata od 7,4 nema nikakvog efekta na hiperalgeziju.

HC-030031 (140 nmol/šapi, i.pl.), selektivni TRPA1 antagonist, statistički značajno ($p < 0,05$, $p < 0,01$) antagonizuje hiperalgezijski efekt izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata (pH=7,4). Efekt počinje od trećeg sata posle primene. Maksimalna inhibicija hiperalgezije iznosi $33,1 \pm 7,8\%$ i registrovana je u četvrtom satu nakon administracije (slika 39B). HC-030031 u grupi sa podešenom pH vrednošću rastvora magnezijum-sulfata pokazuje statistički značajano slabiji i odloženi antihiperalgezijski efekt ($p < 0,05$) u poređenju sa efektom u pH-nepodešenoj grupi (nije prikazano).

Intraplantarna istovremena primena **kapsazepina** (500 pmol/šapi, i.pl.), selektivnog antagonist TRPV1 receptora, sa magnezijum-sulfatom (pH=7,4) statistički značajno ($p<0,05$, $p<0,01$) smanjuje mehaničku hiperalgeziju izazvanu pH neutralnim izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata. Step en inhibicije hiperalgezije se održava tokom 5 sati i iznosi oko $45 \pm 1,8\%$ (slika 40B). Prema stepenu i trajanju inhibicije, efekt antagonist je sličan u pH-podešenoj u odnosu na pH-nepodešenu grupu ($p>0,05$; nije prikazano).

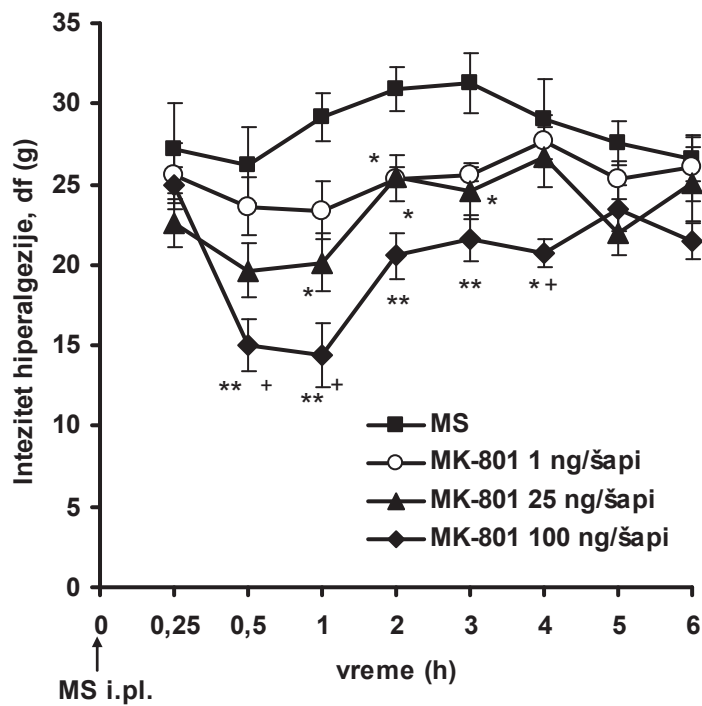
U grupi sa pH-podešenim rastvorom magnezijum-sulfata (pH=7,4) selektivni antagonist TRPV4 receptora, **RN-1734**, statistički značajno povećava prag bola na mehanički stimulus u šapi pacova. RN-1734 u dozi od 6,2 $\mu\text{mol/šapi}$, i.pl. statistički značajno ($p<0,05$, $p<0,01$) smanjuje hiperalgeziju za $46,1 \pm 5,4$, $37,2 \pm 5,6$ i $31,3 \pm 7,3\%$ u 2, 3 i 4 h nakon primene, respektivno (slika 41B). Pola sata nakon ubrizgavanja RN-1734 ima statistički značajno ($p<0,05$) slabiji antihiperalgezijski efekt kada se administrira sa neutralnim rastvorom magnezijum-sulfata, u poređenju sa efektom kada se daje sa kiselim rastvorom magnezijum-sulfata (nije prikazano). Dužina trajanja inhibicije se ne razlikuje pod oba eksperimentalna uslova.

Istovremena intraplantarna primena **amilorida** (7,55 $\mu\text{mol/šapi}$) i izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata fiziološke pH vrednosti nema statistički značajan ($p>0,05$) uticaj na mehaničku hiperalgeziju izazvanu magnezijum-sulfatom (slika 42B). Značajno povećanje praga bola nakon primene amilorida u istoj dozi i na isti način je zabeleženo samo u grupi gde je pH rastvor izotoničnog magnezijum-sulfata ne korigovan (pH=6,0).

4.7.3. Uloga NMDA receptora na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziju šape pacova

Kao što je pokazano na slici 43, dizocilpin statistički značajno ($p<0,05$) antagonizuje hiperalgeziju izazvanu izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata. Efekt je dozno-zavisan. U dozama od 1, 25 i 100 ng/šapi dizocilpin maksimalno smanjuje mehaničku hiperalgeziju u 1 h za $21,4 \pm 6,4$, $30,8 \pm 6,1$ i $50,6 \pm 6,8\%$, respektivno (slika 43). Dužina trajanja efekta iznosi 2, 3 i 4 h, respektivno. Kada je dizocilpin ubrizgan u najvećoj testiranoj dozi (100 ng/šapi) u levu šapu, nije imao statistički značajan ($p>0,05$) efekt na hiperalgeziju izazvanu magnezijum-sulfatom što ukazuje na lokalni

periferni antihiperalgezijski efekt dizocilpina (nije prikazano). Najviša ispitana doza dizocilpina nije *per se* izmenila nociceptivni prag u intaktnoj šapi u odnosu na kontrolnu grupu (nije prikazano).

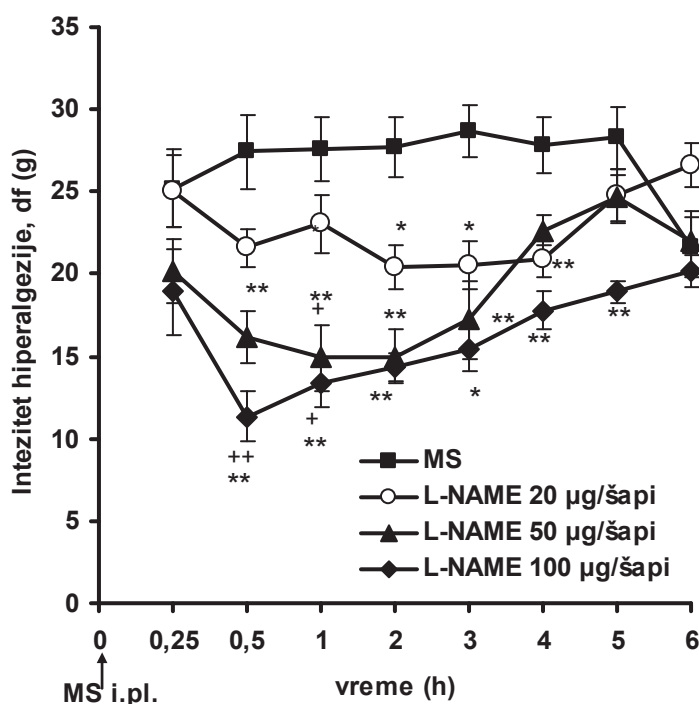


Slika 43. Efekt NMDA antagoniste na mehaničku hiperalgeziju izazvanu izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva dizocilpina (MK-801; 1, 25 i 100 ng/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (MS, 6,2 mg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (MS) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), MK-801 1 sa 100 (+ $p < 0,05$).

4.7.4. Uloga NO-a u magnezijum-sulfatom izazvanoj hiperalgeziji šape pacova

4.7.4.1. Uticaj neselektivne inhibicije NOS na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziju šape pacova

Intraplantarano koadministriran L-NAME (20, 50 i 100 µg/šapi) sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi) statistički značajno ($p<0,05$, $p<0,01$) i na dozno-zavisan način antagonizuje mehaničku hiperalgeziju indukovanu magnezijum-sulfatom (slika 44). Maksimalna inhibicija hiperalgezije javlja se u 3, 2 i 0.5 h i iznosi $32,3 \pm 4,8$, 46 ± 6 i $58,7 \pm 5,5\%$ za dozu od 20, 50 i 100 µg/šapi, respektivno. Efekt L-NAME je lokalnog karaktera, jer injekcija najveće ispitane doze L-NAME u zdravu (kontralateralnu) šapu nije ostvarila inhibiciju hiperalgezijskog efekta magnezijum-sulfata (nije prikazano).

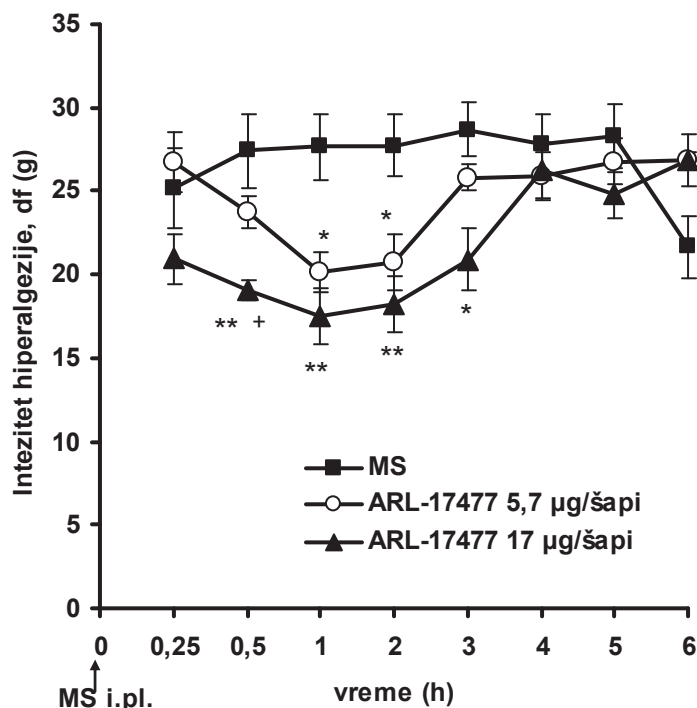


Slika 44. Efekt inhibitora NOS na mehaničku hiperalgeziju izazvanu izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva L-NAME (20, 50 i 100 µg/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (MS, 6,2 mg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja

srednju vrednost razlike u pritiscima $df(g) \pm SEM$ na šapu pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (MS) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), L-NAME 100/50 sa 20 (* $p < 0,05$).

4.7.4.2. Uticaj inhibicije neuralne forme NOS na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziju šape pacova

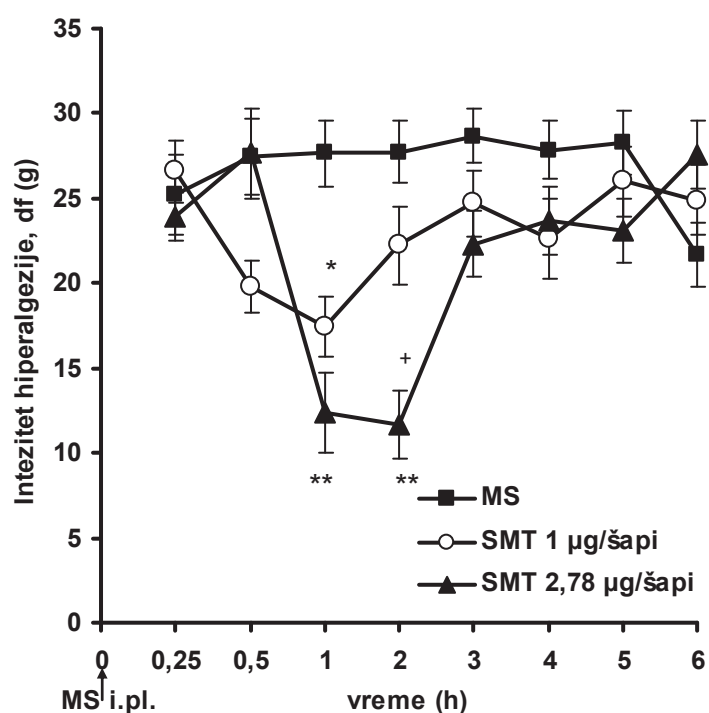
Slika 45 pokazuje da se magnezijum-sulfatom (6,2 mg/šapi) indukovana mehanička hiperalgezija statistički značajno ($p < 0,05$, $p < 0,01$) antagonizuje sa intraplantarnom istovremenom primenom sa ARL-17477. ARL-17477 u dozama od 5,7 i 17 μg /šapi smanjuje mehaničku hiperalgeziju na dozno-zavisani način. Maksimalna inhibicija se ostvaruje 1 h nakon injekcije i iznosi $27,3 \pm 4,4$ i $36,6 \pm 6,1\%$, respektivno. Efekt traje do 2 i 3 h, respektivno. ARL-17477 sa najvišom ispitanom dozom (17 μg /šapi) ubrizganom u zdravu šapu nije imao statistički značajan uticaj na šapu zahvaćenu mehaničkom hiperalgezijom, ukazujući na lokalni periferni antihiperalgezijski efekt (nije prikazano).



Slika 45. Efekt inhibitora neuralne forme NOS na mehaničku hiperalgeziju izazvanu izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva ARL-17477 (5,7 i 17 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (MS, 6,2 mg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $\text{df}(\text{g}) \pm \text{SEM}$ na šapu pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (MS) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), ARL-17477 17 sa 5,7 ($^+p < 0,05$).

4.7.4.3. Uticaj inhibicije inducibilne forme NOS na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziju šape pacova

Injekcija SMT, ubrizgana istovremeno sa magnezijum-sulfatom (6,2 mg/šapi) u šapu pacova, rezultira statistički značajnim ($p < 0,05$, $p < 0,01$) povećanjem praga bola na mehanički stimulus. SMT u dozama od 1 i 2,78 $\mu\text{g}/\text{šapi}$ povećava prag bola za $36,7 \pm 6,4$ i $58 \pm 7,3\%$ u 1 i 2 sata, respektivno (slika 46). Efekt je dozno-zavisan i traje do 2 h. Kada se SMT ubrizga u levu (kontralateralnu) šapu u dozi od 2,78 $\mu\text{g}/\text{šapi}$ smanjuje magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziju u trećem satu, što ukazuje na sistemsko dejstvo (nije prikazano). Međutim, značajno ($p < 0,01$) veći efekt SMT (2,78 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) u ipsilateralnoj u poređenju sa kontralateralnom šapom u 1 i 2 h posle administracije ukazuje na to da SMT ostvaruje pretežno lokalni efekat na mestu primene.

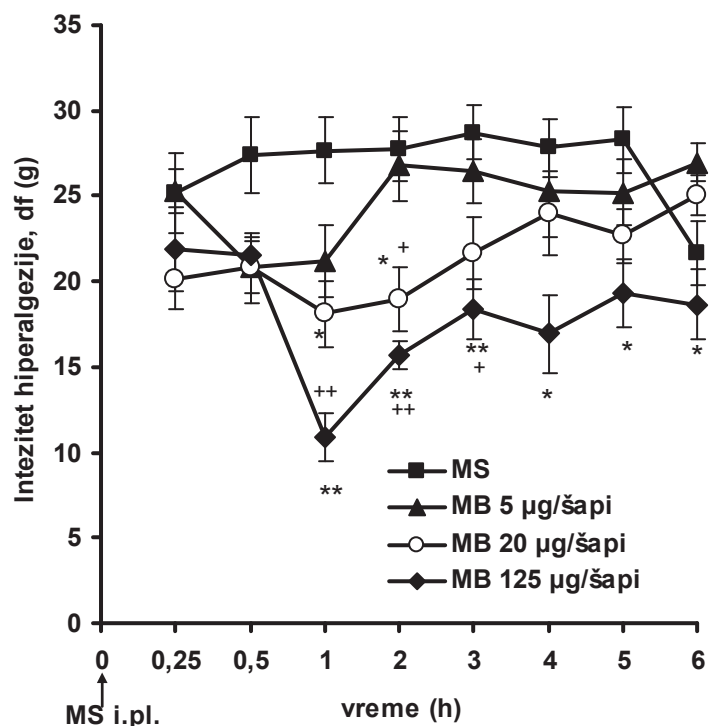


Slika 46. Efekt inhibitora inducibilne forme NOS na mehaničku hiperalgeziju izazvanu izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva SMT (1 i 2,78 µg/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (MS, 6,2 mg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima df(g) ± SEM na šapu pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (MS) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), SMT 1 sa 2,78 (+ $p < 0,05$).

4.7.4.4. Uticaj inhibicije gvanilatne ciklaze na magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziju šape pacova

Istovremena intraplantarna primena metilenskog plavog sa magnezijum-sulfatom (6,2 mg/šapi) statistički značajno ($p < 0,05$, $p < 0,01$) i na dozno-zavisan način antagonizuje pronociceptivni efekt magnezijum-sulfata (slika 47). Maksimalna inhibicija mehaničke hiperalgezije sa metilenskim plavim u dozi od 5, 20 i 125 µg/šapi iznosi $23,3 \pm 7,7$, $34,5 \pm 7,1$ i $60,5 \pm 5,1\%$, respektivno. Dužina trajanja efekta zavisi od doze, a maksimalan

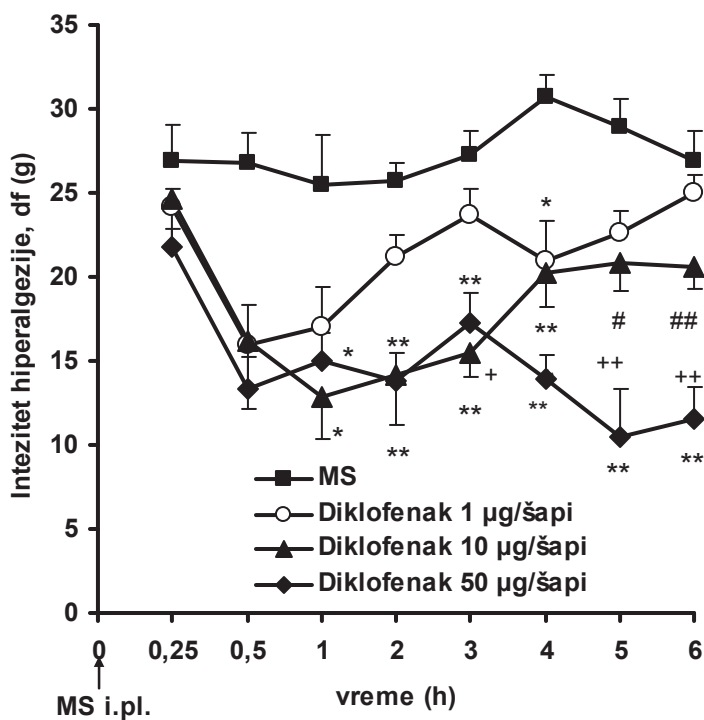
efekt se postiže sat vremena nakon primene. Metilensko plavo ostvaruje lokalni periferni efekt, s obzirom da statistički značajan ($p>0,05$) efekt izostaje kada se metilensko plavo (125 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) ubrizga u kontralateralnu šapu (nije prikazano).



Slika 47. Efekt inhibitora gvanilatne ciklaze na mehaničku hiperalgeziju izazvanu izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva metilenskog plavog (MB, 5, 20 i 125 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (MS, 6,2 mg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $\text{df}(\text{g}) \pm \text{SEM}$ na šapu pre i posle primene magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (MS) ($*p<0,05$, $**p<0,01$), MB 125/20 sa 5 ($^+p<0,05$, $^{++}p<0,01$).

4.7.5. Inhibitorno dejstvo diklofenaka na hiperalgeziju izazvanu izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata

Pronociceptivni efekt izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi) antagonizovan je diklofenakom, neselektivnim inhibitorom COX, na dozno-zavisan način. Sa porastom doze intraplantarno ubrizganog diklofenaka statistički značajno ($p<0,05$, $p<0,01$) se smanjivao intezitet hiperalgezije. Diklofenak u dozi od 1, 10 i 50 $\mu\text{g}/\text{šapi}$ povećava sniženi prag bola maksimalno za $40,2 \pm 9,3$, $49,8 \pm 9,5$ i $63,9 \pm 10,1\%$, za 0,5, 1 i 5 sati nakon primene, respektivno (slika 48). Antihiperalgezijski efekt diklofenaka je lokalne periferne prirode, s obzirom da hiperalgezija nije statistički značajno ($p>0,05$) promenjena pri kontralateralnoj primeni najveće ispitane doze diklofenaka (50 $\mu\text{g}/\text{šapi}$, i.pl.) (nije prikazano).



Slika 48. Efekt inhibitora COX na mehaničku hiperalgeziju izazvanu izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva diklofenaka (1, 10 i 50 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa izotoničnim rastvorom magnezijum-sulfata (MS, 6,2 mg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $\text{df}(\text{g}) \pm \text{SEM}$ na šapu pre i posle primene

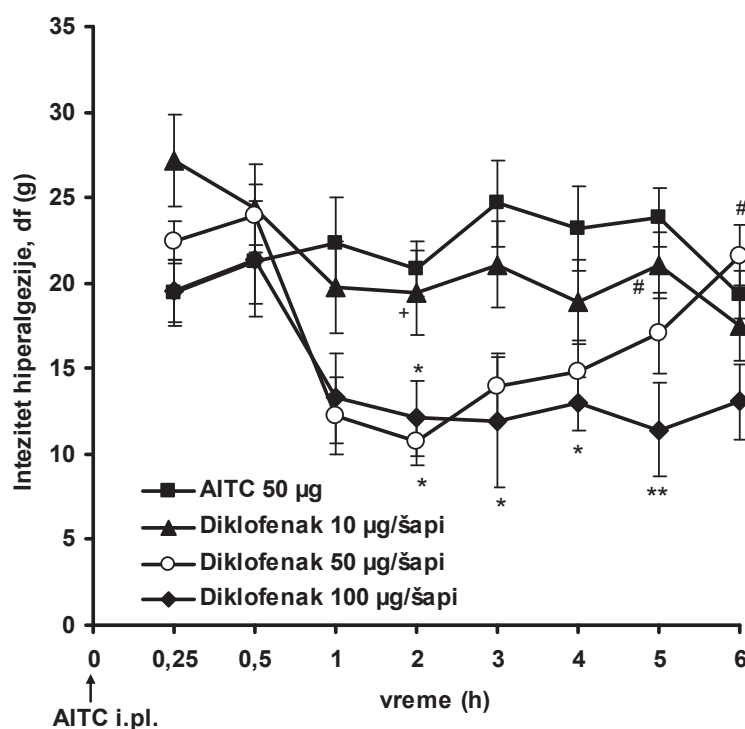
magnezijum-sulfata, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (MS) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), diklofenaka 50/10 sa 1 ($^+p < 0,05$, $^{++}p < 0,01$) i između diklofenaka 10 i 50 ($^{\#}p < 0,05$, $^{\#\#}p < 0,01$).

4.7.5.1. Mehanizam inhibitornog dejstva diklofenaka na hiperalgeziju izazvanu magnezijum-sulfatom

Intraplantarna injekcija rastućih doza magnezijum-sulfata izaziva hiperalgeziju, koja je praćena blagim eritemom na mestu injekcije i odsustvom edema. S obzirom na odsustvo drugih znakova inflamacije na šapi, ispitali smo da li su pored inhibicije COX mogući i/ili drugi mehanizmi dejstva diklofenaka. Na indirektan način, uporednom analizom efekta diklofenaka na mehaničku hiperalgeziju izazvanu sirćetnom kiselinom, kapsaicinom i AITC-om, ispitali smo ulogu ASIC, TRPV1 i TRPA1 receptora, redom. U posebnoj grupi pacova rađen je test nociceptivnog bolnog ponašanja, jer je za pomenute agoniste karakterističan nadražajni bol. U skladu sa tim, naručito u prvih pola sata, testiranje mehaničke hiperalgezije može biti narušeno zbog prisustva bola izazvanog hemijskim nadražajem.

4.7.5.1.1. Dejstvo diklofenaka na somatski bol izazvan AITC-om

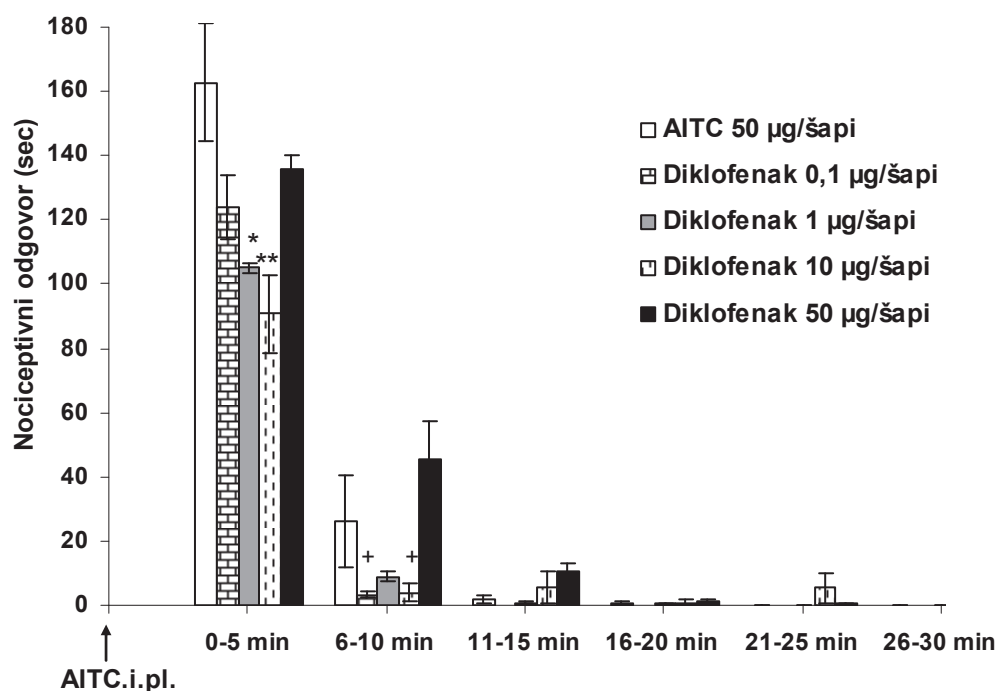
AITC (50 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) ubrizgan supkutano (i.pl.) u šapu pacova dovodi do sniženja praga bola na mehanički stimulus. Mehanička hiperalgezija izazvana i.pl. injekcijom AITC statistički značajno ($p < 0,05$, $p < 0,01$) i dozno-zavisno je smanjena sa istovremenom primenom diklofenaka (slika 49). Diklofenak u dozi od 10, 50 i 100 $\mu\text{g}/\text{šapi}$ i.pl. antagonizuje efekt AITC-a. Maksimum antihiperalgezijske aktivnosti iznosi $18,5 \pm 10,6$, $48,3 \pm 7,1$ i $52,1 \pm 11,4\%$, a postiže se u 4, 2 i 5 satu nakon primene. Dužina trajanja analgetičkog efekta traje od 2 do 5 h.



Slika 49. Efekt inhibitora COX na mehaničku hiperalgeziju izazvanu AITC-om. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva diklofenaka (10, 50 i 100 µg/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa AITC-om (50 µg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima df(g) ± SEM na šapu pre i posle primene AITC-a, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (AITC) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), diklofenaka 10 sa 50 (+ $p < 0,05$) i između diklofenaka 10/50 sa 100 (# $p < 0,05$).

Intraplantarna injekcija AITC-a (50 µg/šapi) izaziva veoma izraženi nadražajni bol u vidu grčenja, podizanja i lizanja ubrizgane šape. Bol se manifestuje odmah posle ubrizgavanja, najizraženija je u naredna dva minuta, a prestaje u desetom minutu (slika 50). Intezitet bola je najjači odmah po ubrizgavanju, vremenom slabi. Ubrizgan i.pl. istovremeno sa AITC-om, diklofenak u dozi od 1 i 10 µg/šapi statistički značajno skraćuje ($p < 0,05$) ukupno vreme koje životinja provede u bolu u prvih pet minuta; antinociceptivna aktivnost iznosi $35,5 \pm 1,0$ i $44,3 \pm 7,5\%$, respektivno. U dozama od

0,1 i 50 $\mu\text{g}/\text{šapi}$, i.pl. diklofenak statistički značajno ($p>0,05$) ne smanjuje bol izazvanu AITC-om (slika 50). Između ove četiri doze u prvih pet minuta nije bilo statistički značajne razlike u efektu.



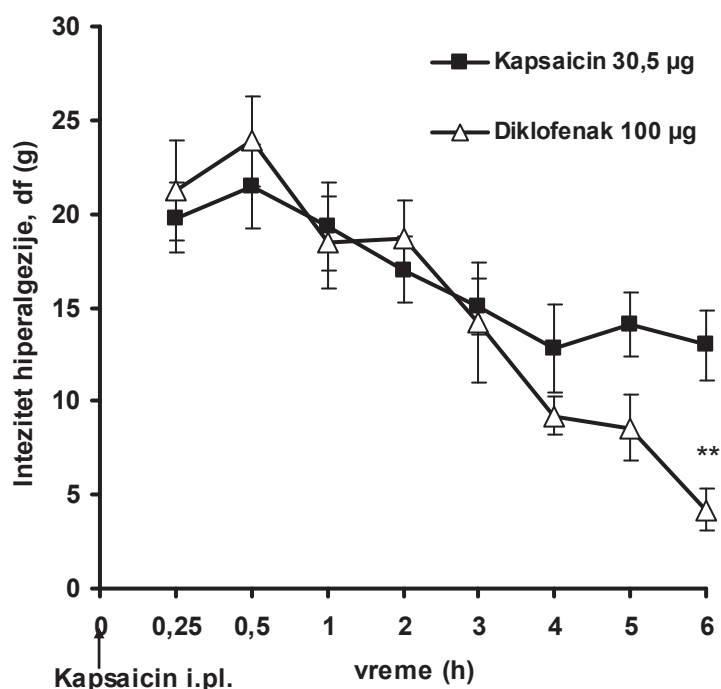
Slika 50. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antinociceptivnog dejstva diklofenaka (0,1, 1, 10 i 50 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa AITC-om (50 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost vremena (u sekundama) provedenog u lizanju i podizanju šape ubrizgane AITC-om $\pm$ SEM, dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost je određena One-Way ANOVA, Tukey's HSD testom. Statistička značajnost je dobijena poređenjem: sa kontrolom (AITC) (* $p<0,05$, ** $p<0,01$), diklofenaka 0,1/10 sa 50 (+ $p<0,05$).

4.7.5.1.2. Dejstvo diklofenaka na somatski bol izazvan kapsaicinom

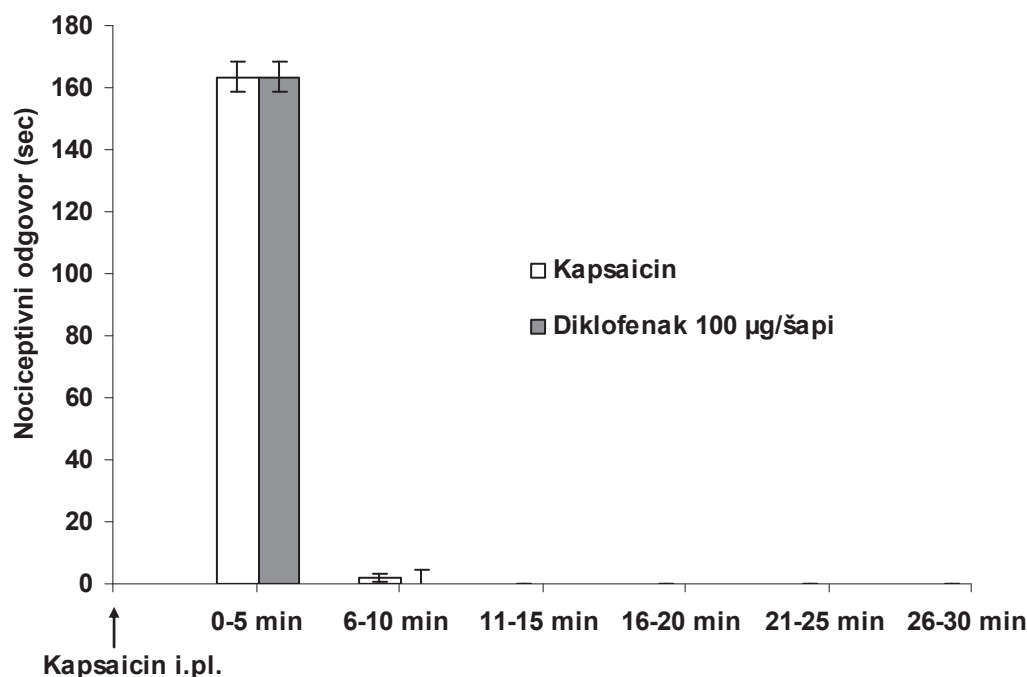
Intraplantarna injekcija kapsaicina (30,5 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) izaziva podizanje, grčenje i lizanje ubrizgane šape. Bol se javlja odmah po ubrizgavanju i traje 2-3 minuta (slika 52). Bol se manifestuje na sličan način kao kad je izazvan AITC-om, ali je slabijeg inteziteta i

kraćeg vremena trajanja. Nakon intraplantarne injekcije kapsaicina dolazi i do snižavanja praga povlačenja šape na mehanički stimulus (slika 51).

U testu pritiska von Fray filameta na šapu pacova, diklofenak u dozi od 100 $\mu\text{g}/\text{šapi}$, i.pl. u istoj injekciji sa kapsaicinom (30,5 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) statistički značajno ($p < 0,01$) antagonizuje efekt kapsaicina jedino u šestom satu posle primene (slika 51). Maksimalna inhibicija hiperalgezije iznosi $67,6 \pm 8,8\%$. U istoj dozi diklofenak statistički značajno ($p > 0,05$) ne utiče na ukupno vreme provedeno u bolnom ponašanju pacova, u testu nociceptivnog bolnog odgovora izazvanog kapsaicinom (30,5 $\mu\text{g}/\text{šapi}$, i.pl.) (slika 52).



Slika 51. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antihiperalgezijskog dejstva diklofenaka (100 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa kapsaicinom (30,5 $\mu\text{g}/\text{šapi}$) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost razlike u pritiscima $\text{df}(\text{g}) \pm \text{SEM}$ na šapu pre i posle primene kapsaicina, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je određena Studentovim t-testom za nezavisne uzorke. Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa kontrolom (kapsaicin) (** $p < 0,01$).



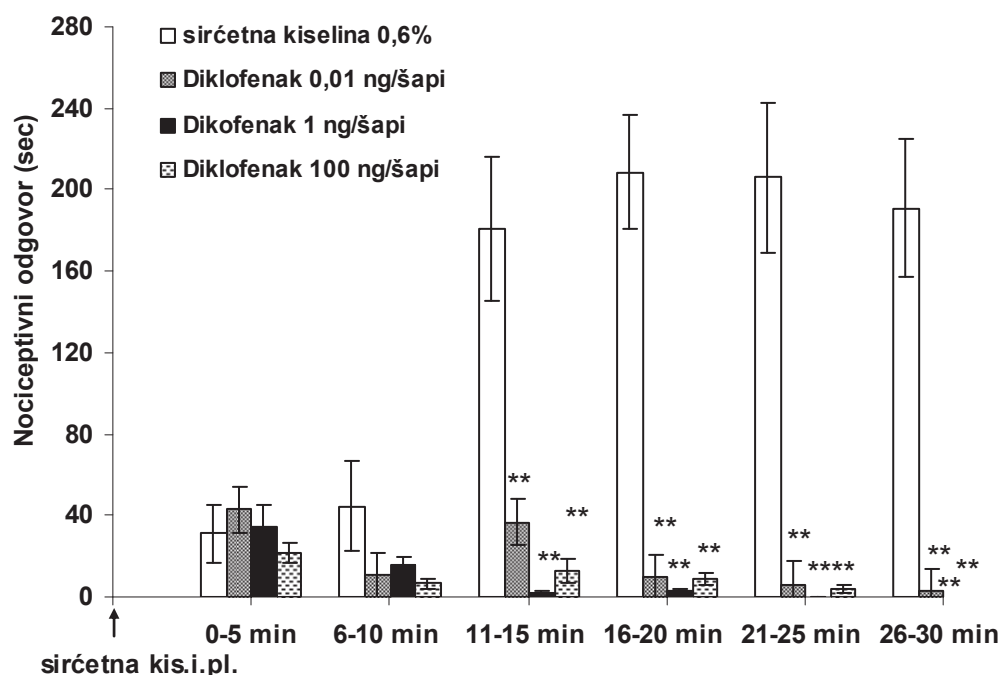
Slika 52. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antinociceptivnog dejstva diklofenaka (100 µg/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa kapsaicinom (30,5 µg/šapi) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost vremena (u sekundama) provedenog u lizanju i podizanju šape ubrizgane kapsaicinom $\pm$ SEM, dobijenu testiranjem 6-8 pacova. Statistička značajnost između ispitivanih grupa nije dobijena Studentovim t-testom za nezavisne uzorke ($p>0,05$).

4.7.5.1.3. Dejstvo diklofenaka na somatski bol izazvan sirćetnom kiselinom

U poređenju sa 0,9% NaCl, rastvor sirćetne kiseline (0,6%, i.pl.) ubrizgan supkutano u šapu pacova dovodi do karakterističnog bolnog ponašanja koje se ispoljava podizanjem ubrizgane šape u serijama. Lizanje ubrizgane šape nije toliko izraženo, kao kod drugih ispitivanih iritanasa (AITC, kapsaicina). Intezitet bola se vremenom pojačava. Bol se javlja u dve faze; prva faza traje od 0 do 10 min i prosečno ukupno vreme životinje provedeno u bolnom ponašanju tokom obe serije praćenja od po 5 minuta iznosi $31 \pm 14,6$ (0-5 min) i $44,4 \pm 22$ (6-10 min) sekunde. Druga faza traje od 11 do 30 minuta, u njoj prosečno ukupno vreme životinje provedeno u bolnom ponašanju tokom serija

praćenja od po 5 minuta iznosi $180,8 \pm 35,4$ (11-15 min), $208,7 \pm 27,6$ (16-20 min), $205,8 \pm 36,7$ (21-25 min) i $191 \pm 33,7$ (26-30 min) sekundi. Bol je najizraženija od 16 do 20 minuta posle ubrizgavanja (slika 53).

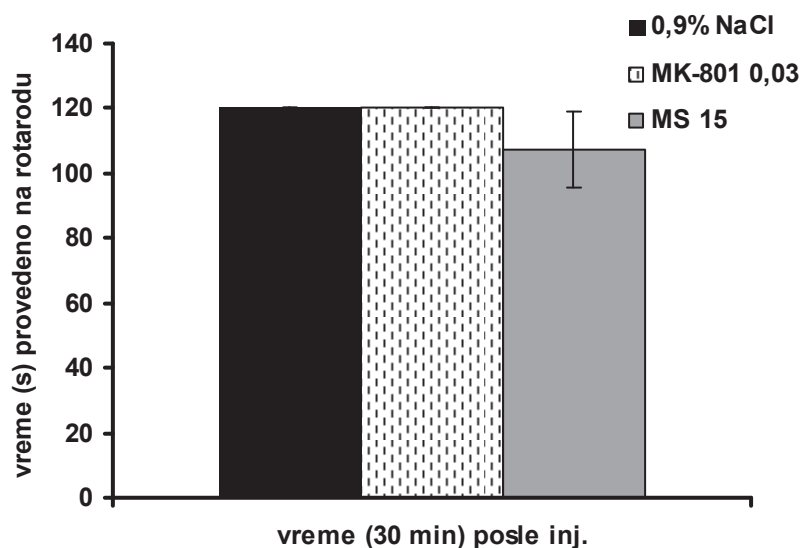
Diklofenak, koadministriran intraplantarano sa 0,6% rastvorom sirćetne kiseline, u dozi od 0,01, 1 i 100 ng/šapi statistički značajno ($p < 0,01$) antagonizuje efekt sirćetne kiseline u drugoj fazi za $79,7 \pm 7,6$ do 100%. Između ispitanih doza, nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$) u efektu, tj. antinociceptivni efekt nije dozno-zavisan. U prvih pet minuta nakon primene diklofenak u pomenutim dozama ne skraćuje vreme provedeno u bolu ($p > 0,05$), a od 6 do 10 minuta antinociceptivni efekt nije statistički značajan ($p > 0,05$) (slika 53).



Slika 53. Intezitet i trajanje lokalnog perifernog antinociceptivnog dejstva diklofenaka (0,01, 1 i 100 ng/šapi) nakon lokalne, intraplantarne (i.pl.) istovremene primene sa sirćetnom kiselinom (0,6%) u konačnom volumenu od 0,1 ml/šapi. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost vremena (u sekundama) provedenog u podizanju i lizanju šape ubrizgane sirćetnom kiselinom $\pm$ SEM, dobijenu testiranjem 6 pacova. Statistička značajnost je dobijena poređenjem sa kontrolom (sirćetna kiselina) (** $p < 0,01$; One-Way ANOVA, Tukey's HSD test).

4.8. Dejstvo magnezijum-sulfata i dizocilpina na motornu spretnost pacova

U najvećim ispitanim analgetičkim dozama magnezijum-sulfat (30 mg/kg, s.c.) i dizocilpin (0,03 mg/kg, s.c.) nemaju uticaja na motornu spretnost pacova (slika 54). Vreme vožnje na rotarod aparatu nije bilo statistički značajno ($p>0,05$) skraćeno, u odnosu na kontrolnu grupu pacova (0,9% NaCl).



Slika 54. Uticaj magnezijum-sulfata (30 mg/kg, s.c.) i dizocilpina (MK-801) (0,03 mg/kg, s.c.) na motornu kordinaciju pacova, korišćenjem rotarod testa. Svaki stubić predstavlja srednju vrednost vremena (u sekundama) provedenog u vožnji $\pm$ SEM, dobijenu testiranjem na 6 pacova. Statistička značajnost između ispitivanih grupa nije dobijena Mann-Whitney U-testom ($p>0,05$).

5. DISKUSIJA

Efekti magnezijum-sulfata i dizocilpina ispitani su na pacovima kod kojih je inflamatorni bol u šapi (model somatskog bola) i abdomenu (model visceralnog bola) provociran mehaničkim ili hemijskim stimulusom.

Karagenin predstavlja mešavinu mukopolisaharida. Dobija se iz crvenih morskih algi. Postoje tri osnovne forme karagenina: kapa (κ), jota (ι) i lambda (λ) karagenin. Podela je zasnovana prema hemijskoj strukturi tj. broju sulfatnih grupa u molekulu karagenina. Sa porastom broja sulfatnih grupa smanjuje se gelirajuće svostvo karagenina. Kapa karagenin ima izrazito gelirajuću sposobnost i zato se koristi u prehrambenoj industriji kao sredstvo za zgušnjavanje i stabilizaciju hrane. Lambda karagenin nema gelirajuće svojstvo i koristi se za izazivanje inflamacije i proučavanje inflamatornog bola i otoka (Prajapati D i sar., 2014). Intraplantarna injekcija lambda karagenina u zadnju šapu pacova izaziva lokalno zapaljenje koje je praćeno razvojem bolne preosetljivosti (hiperalgezija), otoka i povišene temperature upaljenog tkiva. U našim ispitivanjima mehanička hiperalgezija šape pacova izazvana karageninom je najizraženija u periodu od 3 do 5 sati od injekcije karagenina. I kod drugih autora intezitet ove hiperalgezije je najizraženiji u ovom periodu (Duarte i Ferreira, 2000). Karageninska inflamacija protiče kroz dve faze, ranu i kasnu. Rana faza traje prva dva sata i tada dolazi do oslobađanja histamina, bradikinina i 5-hidroksitriptamina. U kasnoj fazi (od drugog do šestog sata) dolazi do oslobađanja prostaglandina, slobodnih kiseoničnih radikala, do lokalne infiltracije i aktivacije neutrofila (Kumar i sar., 2004). Poznato je da karageninom izazvan edem šape pacova prolazi kroz dve faze. Rana faza traje od 1 do 2 h, a kasna faza traje od 2 do 6 h (Kumar i sar., 2004; Sidhapuriwala i sar., 2007). Prema nekim autorima kasna faza počinje od 3 ili 4 h (Salvemini i sar., 1996). Za inflamaciju izazvanu karageninom karakteristična je proizvodnja NO-a, zbog povećane sinteze i konstitutivnog i inducibilnog oblika NOS u šapi pacova (Salvemini i sar., 1996; Handy i Moore, 1998). Karagenin aktivira nNOS u ranoj i kasnoj fazi inflamacije, dok do aktivacije iNOS dolazi u kasnoj fazi inflamacije. U drugom satu od nastanka zapaljenja najizraženija je proizvodnja NO-a (Omote i sar., 2001). Dalje, NO dovodi do

oslobađanja neuropeptida, kao što su supstanca P i CGRP, iz senzornih nervnih završetaka koji dodatno provociraju bol (Omote i sar., 2001). Pored toga, NO povećava sintezu/oslobađanje citokina i reaktivnih kiseoničnih vrsta (Marcinkiewicz i sar., 1995), kao i prostanoida (Sautebin i sar., 1995). Karageninom-izazvana mehanička inflamatorna hiperalgezija u šapi pacova dovodi do povećanog oslobađanja glutamata i posledične aktivacije NMDA receptora u kičmenoj moždini (Okano i sar., 1998). Razvoj hiperalgezije kao i uticaj sistemski i lokalno periferno primenjenog magnezijum-sulfata ili dizocilpina na razvoj hiperalgezije ispitani su primenom mehaničkog stimulusa elektronskim von Frey testom.

Sistemske primene magnezijum-sulfata (0,5-30 mg/kg, s.c.) u pretretmanu (profilaktički) i tretmanu (terapijski) značajno smanjuje mehaničku inflamatornu hiperalgeziju izazvanu u šapi pacova (Srebro i sar., 2014a). Efekt nije dozno-zavisan. Iako je poznato analgetičko dejstvo magnezijum-sulfata u neuropatskom bolu, podaci o njegovom dejstvu u inflamatornom bolu su oskudni i kontroverzni. Sistemske primene magnezijum u obliku sulfata (30 i 90 mg/kg, i.p.) ne utiče na drugu fazu formalinskog testa (Begon i sar., 2002b), dok u obliku oksida (5 i 10 mg/kg, i.p.) u drugoj fazi formalinskog testa ima dozno-zavisan antinociceptivni efekt (Jahangiri i sar., 2013). Međutim, Takano i saradnici (2000) i Ishizaki i saradnici (1999) su izvestili da intratekalno primenjen magnezijum-sulfat na dozno-zavisan način smanjuje bol tokom druge faze formalinskog testa. Ove razlike su verovatno posledica korišćenja različitih supstanci za izazivanje inflamacije (karagenin vs. formalin), stimulusa za izazivanje bola (mehanički vs. hemijski), načina primene (sistemske vs. centralne), doza kao i/ili različitih vrsta životinja koje su korišćene u eksperimentima. Za drugu fazu formalinskog testa i karageninsku hiperalgeziju zajedničko je to da na periferiji inflamatorna reakcija u tkivu dovodi do funkcionalnih promena u dorzalnim rogovima kičmene moždine, koje uključuju i NMDA receptore (Tjolsen i sar., 1992; Ren i sar., 1992b; Lawand i sar., 2000). Sa tim u vezi, u modelu akutnog nociceptivnog bola magnezijum-sulfat nije efikasan, jer tada nema aktivacije NMDA receptora (Nechifor i sar., 2011) tj. izostaju neuroplastične promene u centralnom nervnom sistemu koje se dešavaju tokom inflamatornog i neuropatskog bola. U eksperimentalnom modelu neuropatskog bola je pokazano da sistemske primenjeni magnezijum-sulfat i dizocilpin,

takođe NMDA antagonist, imaju sličan analgetički efekt (Begon i sar., 2000; Rondón i sar., 2010). U tom istraživanju, u odnosu na rezultate našeg istraživanja, magnezijum-sulfat je korišćen u mnogo većoj dozi (150 mg/kg, i.p.) i dva puta dnevno, što ukazuje da je magnezijum-sulfat mnogo potentniji u terapiji inflamatornog, u odnosu na neuropatski bol. Sa tim u vezi, u našem istraživanju ispitali smo analgetičko i antiedematozno dejstvo doza magnezijum-sulfata koje se koriste u ispitivanjima na životinjama i u kliničkoj praksi u drugim indikacijama (prevencija deficita magnezijuma, terapija eklampsije) (Drugs.com). Magnezijum-sulfat se u prevenciji i lečenju bolesti primenjuje *per os* ili intravenski. U literaturi postoji svega nekoliko istraživanja gde je magnezijum-sulfat primenjen supkutano, kao i u našem istraživanju. Autori su istakli da se supkutana samoprimeana magnezijum-sulfata pokazala efikasna, praktična i bezbedna u korekciji hipomagnezijemije (Martínez-Riquelme i sar., 2005; Alfaro Martinez i sar., 2009).

Lokalno periferno primenjen magnezijum-sulfat nije imao uticaja na razvoj mehaničke hiperalgezije šape pacova izazvane karageninom (Srebro i sar., 2014a). U našoj studiji su po prvi put ispitane rastuće doze magnezijum-sulfata nakon istovremene intraplantarne primene sa nekim proinflamatornim sredstvom.

U našim eksperimentima antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata je detektovan nakon sistemskog, ali ne i nakon lokalnog perifernog davanja što bi moglo da ukaže na centralno dejstvo. Međutim, da bi to razjasnili neophodno je intratekalno ili intracerebroventrikularno davanje magnezijum-sulfata pod istim eksperimentalnim uslovima.

Sistemska primena dizocilpina (0,0005-0,02 mg/kg, s.c.) statistički značajno i na dozno-zavisan način smanjuje mehaničku inflamatornu hiperalgeziју izazvanu karageninom u šapi pacova (Srebro i sar., 2014b). Naš rezultat je u skladu sa literaturnim podacima. Koristeći isti model bola, nekoliko istraživača je pokazalo da dizocilpin sistemski primenjen na dozno-zavisan način smanjuje mehaničku (Chizh i

sar., 2001) i termičku hiperalgeziju (Ren i sar., 1992b; Chen i sar., 2010), kao i mehaničku hiperalgeziju tokom artritisa (Cavalcante i sar., 2013). U našem istraživanju prvi put je analgetički efekt dizocilpin postignut sa malim dozama dizocilpina (0,0005-0,02 mg/kg, s.c.), što je u suprotnosti sa literaturnim podacima u kojima je dizocilpin u većim dozama (0,1-2 mg/kg, i.p.) ostvario isti efekt. Poznato je da NMDA antagonisti, kao što su dizocilpin i ketamin, izazivaju pored ostalih neželjenih dejstva i narušenu motornu kordinaciju, zbog koje može biti narušena bihejvioralna procena bola. Prema literaturnim podacima motorna kordinacija od strane dizocilpina nije narušena pri dozama od 0,025, 0,05 i 0,1 mg/kg (Carey i sar., 1998; Yonehara i sar., 2002). Sa tim u vezi je naš rezultat da dizocilpin ne menja statistički značajno prag podizanja bola na mehanički stimulus na kontralateralnoj (ne inflamiranoj) šapi, osim u najvećoj testiranoj dozi koja izaziva blagi porast praga podizanja šape. Ovi rezultati sugerišu da u našem istraživanju dizocilpin ne narušava bihejvioralnu procenu nociceptivne osetljivosti kod pacova, tj. da dizocilpin ostvaruje analgetički efekt u malim dozama koje ne narušavaju motornu kordinaciju. Sličan analgetički efekt dizocilpin je pokazao i u drugim modelima bola koji nastaju usled zapaljenja. Sistemski primenjen dizocilpin smanjuje formalinom izazvan nociceptivni odgovor (Yamamoto i Yaksh 1992; Vaccarino i sar., 1993; Berrino i sar., 2003; Gong i sar., 2011). Dizocilpin je na dozno-zavisani način nakon centralne, sistemske (0,1–10,0 mmol/kg) i lokalne (0,01–1,0 mmol/šapi) primene smanjio nociceptivni bolni odgovor nakon intraplantarne administracije glutamata (Beirith i sar., 2002) ili mehaničku hiperalgeziju nakon intraplantarne primene Freund-ovog adjuvansa (Hama i sar., 2003). Analizom kriva odnosa doze i efekta na bol tokom vremena u našim eksperimentima dizocilpin postiže maksimalni analgetički efekt u skladu sa literaturnim podacima, u kojima dizocilpin nakon i.p. davanja kod pacova maksimalnu koncentraciju u plazmi i mozgu postiže od 10 do 30 minuta nakon injekcije (2 mg/kg) (Vezzani i sar., 1989).

Lokalno periferno primenjen dizocilpin smanjuje mehaničku hiperalgeziju šape pacova izazvane karageninom (Srebro i sar., 2014b). Naši rezultati su u skladu sa prethodnim studijama. Lokalna intraplantarna injekcija dizocilpina smanjuje bol izazvanu formalinom (Davidson i sar., 1997), glutamatom (Beirith i sar., 2002) i vraća Freund-ovim adjuvansom (CFA)-izazvan sniženi prag bola na mehanički stimulus (Du i sar.,

2003). Takođe, i nakon lokalne periferne primene mi smo postigli analgetički efekt sa manjim dozama dizocilpina (0,1 i 0,15 µg/šapi) nego drugi autori (10 nmol = 3 µg i.pl.). Intrartikularno primenjen dizocilpin (0,75 i 1,5 mM) dat pre izazivanja inflamacije karageninom izaziva lokalno periferno dozno-zavisno smanjenje bola nastalog opterećenjem zgloba težinom, ali je analgetički efekt izostao nakon primene dizocilpina u tretmanu tj. nakon izazivanja inflamacije (Zhang i sar., 2003).

S obzirom da antihiperalgezijski efekt dizocilpina nastupa i nakon sistemske i lokalne primene jasno je da je njegovo važno mesto dejstva periferno tkivo. Kako bi razjasnili da li sistemski efekti nastaju samo zbog dejstva na periferiji ili zbog dejstva u CNS-u, neophodna je centralna (intratekalna i intracerebroventrikularna) primena dizocilpina pod istim eksperimentalnim uslovima.

Pod sličnim eksperimentalnim uslovima zapaljenskog bola, ketamin, takođe NMDA antagonist, ostvario je antinociceptivno dejstvo nakon sistemske (Kawamata i sar., 2000; Holtman i sar., 2008) i lokalne primene (Lawand i sar., 1997; Romero i sar., 2011). U našim eksperimentima somatskog inflamatornog bola, analizirajući krive odnosa doze i efekta, sistemski primenjen magnezijum je slabiji ali jednako efikasan analgetik kao dizocilpin, imaju sličan vremenski tok i dužinu trajanja antihiperalgezijskog dejstva. Magnezijum-sulfat ima izraženiji analgetički efekt kada se primeni u pretretmanu, u poređenju sa tretmanom. U našim eksperimentima, dizocilpin za razliku od magnezijum-sulfata ispoljava lokalno analgetičko dejstvo. Pokazano je da i drugi antagonisti NMDA receptora, kao što su ketamin, memantin i deksketorfan mogu smanjiti akutni inflamatorni bol nakon sistemske ili lokalne primene. Nakon sistemske primene oni su smanjili bol u 2. fazi formalinskog testa, a najveću analgetičku aktivnost je pokazao memantin (Berrino i sar., 2003). Lokalni periferni analgetički efekt tokom 2. faze formalinskog testa pokazao je samo deksketorfan, dok druga dva antagonista nisu uticali ni na jednu fazu testa (Sawynok i Reid, 2002).

Visceralni bol je veoma čest simptom akutnih i hroničnih bolesti u gastrointestinalnom i genitourinarnom sistemu. **Sirćetnom kiselinom** izazvane abdominalne konstrikcije, popularno nazvane „grčevi“, predstavljaju standardan test za ispitivanje akutnog toničnog visceralnog bola kod pacova (Mogil i sar., 1996) i miševa (Koster i sar., 1958). Intraperitonealni rastvor sirćetne kiseline direktno aktivira visceralne i somatske nociceptore koji inervišu peritoneum izazivajući inflamaciju uz oslobađanje proinflamatornih supstanci (Satyanarayana, 2004) u subdijafragmatičnim visceralnim organima, ali i u podkožnim mišićima trbušnog zida (Bennett, 2001). Ovom prilikom se oslobađaju histamin, bradikinin, prostaglandini i serotonin. Sirćetnom kiselinom izazvan visceralni bol nastaje usled aktivacije prethodno neosetljivih receptora (periferna senzitivizacija) što dovodi do povećanja neuralne aktivnosti i ekscitabilnosti (centralna senzitivizacija), a sve rezultira intenzivnijim bolom (Giamberardino, 1999). Dakle, visceralni putevi bola su difuzno organizovani u perifernom i centralnom nervnom sistemu, a pored ostalih, NMDA receptori su uključeni u obradu visceralnog bola (Li i sar., 2004; Willert i sar., 2004; Strigo i sar., 2005).

U našim eksperimentima **magnezijum-sulfat i dizocilpin** su pokazali bifazno i dozno-zavisno antinociceptivno dejstvo u visceralnom modelu bola, respektivno. Magnezijum-sulfat je redukovao broj grčeva u dozi od 1, 5 i 15 mg/kg za 60, 50 i 78%, respektivno, dok u dozama od 30 i 45 mg/kg nije imao značajan uticaj na broj grčeva izazvan sirćetnom kiselinom. Pod istim uslovima, antinociceptivni efekat dizocilpina (0,005–0,03 mg/kg) je iznosio od 33–79%. Dakle, i u ovom modelu bola, kao i u somatskom, magnezijum-sulfat je jednako efikasan analgetik kao i dizocilpin, ali i slabiji analgetik u odnosu na dizocilpin. Naši rezultati potvrđuju da magnezijum, statistički značajno smanjuje broj grčeva, što je nedavno objavio Jahangiri sa saradnicima (2013). Međutim, mi smo ovaj efekat potvrdili na različitoj vrsti životinja (pacovi vs. miševi), sa različitom formulacijom magnezijuma (sulfat vs. oksid vs. magnezijum oksid nanočestice), kao i sa različitim načinom primene (supkutano vs. intraperitonealno). Pokazano je da u testu abdominalnih grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom u miševa, magnezijum u obliku sulfata u dozi od 2,5 mg/kg (0,5 mg elementarnog magnezijuma, i.p.) nema analgetički efekat (Assi i sar., 2001), dok magnezijum u obliku oksida u dozi od 5 i 10 mg/kg (3,02 i 6,03 mg elementarnog magnezijuma, i.p.) ima analgetički efekat (Jahangiri i sar., 2013).

Treba istaći da su doze magnezijum-sulfata korišćene u našim eksperimentima (1–45 mg/kg, što iznosi 1–9 mg elementarnog magnezijuma) one koje se najčešće koriste u studijama na životinjama i da su u rasponu terapijskih doza koje se primenjuju na ljudima (Herroeder i sar., 2011). Naši eksperimenti su pokazali da dizocilpin dovodi do dozno-zavisnog smanjenja broja grčeva. Sa povećanjem doze povećava se analgetički efekt, srednja efektivna doza dizocilpina iznosi 0,009 mg/kg (CL95% 0,002–0,004). Naš rezultat je u skladu sa prethodnim izveštajem Suardiaz i saradnika (2007) da dizocilpin dat intraperitonealno 15 minuta pre sirćetne kiseline dovodi do dozno-zavisnog smanjenja broja grčeva kod miševa. U tom istraživanju efekt je postignut sa većim dozama (0,025, 0,05 i 0,1 mg/kg) u odnosu na doze korišćene u našim istraživanjima, kao i u dozama za koje je nađeno da narušavaju motornu kordinaciju (Carey i sar., 1998; Yonehara i sar., 2002).

Saglasno našim rezultatima, pokazano je da i drugi NMDA antagonist (ketamin) smanjuje sirćetnom kiselinom izazvane abdominalne grčeve. Slično sa dizocilpinom, a suprotno od magnezijum-sulfata, ketamin dovodi do dozno-zavisnog smanjenja broja abdominalnih grčeva (Bulutcu i sar., 2002; Mohammad i sar., 2012).

U našim eksperimentima visceralnog inflamatornog bola, magnezijum je slabiji analgetik od dizocilpina, ali jednako efikasan kao dizocilpin. Prema literaturnim podacima, pod istim eksperimentalnim uslovima, antinociceptivni efekti magnezijum-sulfata i dizocilpin u testu grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom do sada nisu ispitivani. Naši rezultati ukazuju da bi primena magnezijuma ili NMDA antagonista u obliku preemtivne analgezije mogla biti korisna. Nalaz da magnezijum i dizocilpin dati pre nadražajnog stimulusa ostvaruju antinociceptivno dejstvo u standardnom modelu visceralnog bola ukazuje na potencijalni klinički značaj u prevenciji postoperativnog bola kod abdominalnih hirurških zahvata.

I ako je test grčeva izazvan sirćetnom kiselinom nespecifičan metod, on je ipak senzitivan jer srednja efektivna doza (ED₅₀) dobijena u testu grčeva na pacovima

pokazuje visoku korelaciju sa analgetičkim dozama kod ljudi (Collier i sar., 1968). Test grčeva je široko korišćen metod koji se koristi za ispitivanje analgetičkih ili antiinflamatornih osobina novih supstanci (Le Bars i sar., 2001). Test je senzitivan za ispitivanje opioda i NSAIL-ova koji deluju perifernim i centralnim mehanizmom. S obzirom da je upotreba pomenutih lekova povezana sa brojnim neželjenim efektima, razvoj novih analgetika sa manje neželjenih efekata je strategija kojoj se teži.

Prvi deo naših istraživanja odnosio se na ispitivanje efekata dva NMDA antagonista magnezijuma i dizocilpina, pod istim eksperimentalnim uslovima, u inflamatornom modelu bola kod pacova. Magnezijum-sulfat i dizocilpin su ostvarili statistički značajno analgetsko dejstvo nakon sistemske (s.c.) primene u somatskom i visceralnom modelu inflamatornog bola. **Mehanizam analgetskog dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpina** do sada nije ispitivan. Poznato je da postoji povezanost između NMDA receptora i NO-a (Kawamata i Omote, 1999), kao i to da je NO molekul koji ima dvostruko dejstvo na bol. Neposredno nakon izazivanja inflamacije kolenog zgloba pacova sa karageninom i kaolinom dolazi do izraženog i produženog porasta nivoa glutamata u zglobu pacova, ali i citrulina i arginina, prekursora NO-a (Lawand i sar., 2000). Takođe, inflamacija izazvana formalinom dovodi do perifernog oslobađanja glutamate i aspartata koji doprinose nastanku bola (Omote i sar., 1998). Ovi rezultati upućuju da je NO jedan od ključnih signalnih puteva koji doprinosi nastanku inflamacije i nocicepcije. Zato je u ovoj tezi ispitan kakav uticaj modulacija NO puta ima na analgetički i antiedematozni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina.

O tačnom mehanizmu analgetičkog dejstva magnezijuma malo se zna. Magnezijum je mineral koji u organizmu ima brojne uloge. On je kofaktor u više od 300 enzimskih reakcija, održava membranski potencijal, ima modulatorno dejstvo na jonske kanale, neurotransmisiju, i dr. Magnezijum je i nekompetitivni antagonist NMDA receptora koji blokira jonski kanal (Fawcett i sar., 1999), dok se dizocilpin vezuje nekompetitivno za fenciklidinsko mesto NMDA receptora, blokira otvaranje kanala i smanjuje frekvencu otvaranja kanala. Različiti mehanizam blokade NMDA receptora, kao i druga NMDA-nezavisna dejstva magnezijuma mogu biti razlog donekle neusaglašenih rezultata

između magnezijum-sulfata i dizocilpina u našem istraživanju. Dizocilpin je potentan i visoko selektivan NMDA antagonist, zbog čega se i koristi kao istraživačko sredstvo u farmakološkom proučavanju NMDA receptora. Zato su naši rezultati sa dizocilpinom konzistentniji sa rezultatima ketamina i drugih NMDA antagonista u inflamatornom bolu i ukazuju da je njegov analgetički efekt NMDA-zavisan. Npr. pokazuju dozno-zavisan efekt, analgetički efekt je prisutan i nakon lokalane periferne primene. Na osnovu svega gore navedenog, mi pretpostavljamo, ali sa sigurnošću ne možemo tvrditi, da je analgetički efekt sistemski primenjenog magnezijum-sulfata u našoj studiji bar jednim delom rezultat blokade NMDA receptora u centralnom nervnom sistemu.

Tačan mehanizam antihiperalgezijskog efekta magnezijum-sulfata u somatskom inflamatornom modelu bola u ovoj tezi ne može se sa apsolutnom sigurnošću odrediti. Razlog za to je što magnezijum ima brojne funkcije u organizmu. Magnezijum redukuje aktivnost presinaptičkih i postsinaptičkih kalcijumskih kanala, on je blokator N-, P- i L-tipa kalcijumskih kanala (Iseri i French, 1984; Shimosawa i sar., 2004; Chang i sar., 2014). Ispoljava modulatorno dejstvo na natrijumske i kalijumske kanale, i tako može da utiče na membranski potencijal (Pathak i sar., 2009; Herroeder i sar., 2011; Vastani i sar., 2013). Magnezijum je i modulator oslobađanja neurotransmitera, smanjuje oslobađanje dopamina, acetilholina i glutamata iz presinaptičkih nerava u mozgu (Chéramy i sar., 1994; Ishizaki i sar., 1999; Lin i sar., 2002). Pored svega navedenog, magnezijum je i nekompetitivni antagonist NMDA receptora koji blokira jonski kanal (Fawcett i sar., 1999; Herroeder i sar., 2011). Barem delimično blokada NMDA receptora može biti uključena u mehanizam dejstva magnezijuma. Aktivacija kalcijum-zavisne NOS i posledična produkcija NO-a podstaknuta glutamatom preko NMDA receptora može imati značajnu ulogu u centralnoj i perifernoj modulaciji nocicepcije (Kawamata i Omote, 1999; Tanabe i sar., 2009). U tom slučaju, magnezijum blokadom NMDA receptora može imati uticaj na proizvodnju i oslobađanje NO-a. Razumno je onda očekivati da inhibicija NOS u centralnom nervnom sistemu može povećati analgetički efekt magnezijum-sulfata (Kawabata i sar., 1994). Suprotno od očekivanog, naši rezultati su pokazali aktivaciju puta NO-a u analgetskom dejstvu magnezijum-sulfata (Srebro i sar., 2014a). Sistemski primenjen L-NAME je smanjio, pre nego što je povećao antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata, a L-arginin, prekursor NO-a je

poništio efekt L-NAME. Takođe, selektivni inhibitori neuralnog i inducibilnog oblika NOS, L-NPA i SMT, redukovali su analgetički efekt magnezijum-sulfata. L-arginin i svi inhibitori NOS su korišćeni u subefektivnim dozama, jer je poznato da oni imaju dozno-zavisno dejstvo na hiperalgeziju. Ova diskrepanca može sa objasniti na više načina. NO je molekul sa dualnim nociceptivnim dejstvom, koje zavisi od koncentracije NO-a, izoforme NOS koja ga proizvodi i mesta produkcije (centralno ili periferno) (Kawabata i sar., 1994; Zhang i sar., 2006). Sa jedne strane, povećana produkcija NO-a ima antinociceptivno dejstvo (Granados-Soto i sar., 1997; Bulutcu i sar., 2002; Sachs i sar., 2004; Garrido-Suárez i sar., 2009; Galdino i sar., 2010), dok inhibitori NOS izazivaju antinocicepciju u nekim modelima akutnog i perzistentnog bola (Yonehara i sar., 1997; DeAlba i sar., 2006). Iako L-NAME pokazuje sinergistički antinociceptivni efekt u interakciji sa morfinom (Yamaguchi i sar., 1996), L-NAME nije promenio antinociceptivnu aktivnost kombinacije morfin-magnezijum-sulfat (Karaaslan i Arslan, 2005) u akutnom nociceptivnom termičkom testu. Moguće je da je ovo neto efekt povećanje antinociceptivnog efekta morfina i smanjenje aktivnosti magnezijum-sulfata u prisustvu L-NAME.

Kako je već više puta naglašeno, dizocilpin je nekompetitivni antagonist NMDA receptora i referentna supstanca za proučavanje NMDA receptora. Sa tim u vezi, njegova analgetička aktivnost u našem istraživanju najverovatnije je rezultat blokade NMDA receptora. Kada je NMDA receptor blokiran sa dizocilpinom onda je to povezano i sa sintezom i oslobađanjem NO-a tj. može se pretpostaviti da inhibicija NOS u centralnom nervnom sistemu povećava analgetički efekt dizocilpina (Kawabata i sar., 1994). Međutim, naša istraživanja pokazuju da sistemski primenjen L-NAME, neselektivni inhibitor NOS, smanjuje, pre nego što povećava antihiperalgezijski efekt dizocilpina. Selektivnom inhibicijom neuralnog (L-NPA) i inducibilnog (SMT) oblika NOS mi smo postigli povećanje i smanjenje antihiperalgezijskog dejstva dizocilpina, respektivno (Srebro i sar., 2014b).

U našoj studiji, po prvi put je ispitan uticaj inhibitora NOS na dejstvo magnezijuma i dizocilpina u bolu. Nedavno je pokazano da L-NAME antagonizuje dizocilpinom i

ketaminom izazvane kognitivne poremećaje kod pacova (Boultadakis i Pitsikas, 2010). Rezultati ove teze ukazuju da NOS ima modulatorno dejstvo na analgetičke efekte magnezijum-sulfata i dizocilpina u somatskom inflamatornom modelu bola tj. moguće je da magnezijum i dizocilpin barem delimično aktiviraju sintezu NO-a. U skladu sa našim rezultatima, pokazano je da ketamin, takođe aktivira NO put i da na taj način ostvaruje centralno i periferno analgetičko dejstvo (Bulutcu i sar., 2002; Romero i sar., 2011). Takođe je pokazano da dizocilpin i ketamin povećanom sintezom NO-a izazivaju kognitivni poremećaj kod pacova. U tom istraživanju je, kao i u našem, L-NAME antagonizovao efekte dizocilpina i ketamina (Boultadakis i Pitsikas, 2010). U našem istraživanju, inhibitori NOS su ostvarili isto dejstvo na efekte magnezijum-sulfata i dizocilpina, osim što je selektivni inhibitor neuralne NOS povećao analgetički efekt dizocilpina, a smanjio analgetički efekt magnezijum-sulfata. Ova nepodudarnost se može objasniti činjenicom da NO ima dvostruki efekt na neurone, u zavisnosti od koncentracije NO-a i aktivnosti određene izofome NOS (Kawabata i sar., 1994; Zhang i sar., 2006). Većina istraživača ukazuje na pronociceptivno dejstvo NO-a na nivou kičmene moždine (Boettger i sar., 2007; Schmidtke i sar., 2009), dok neki istraživači ukazuju na antinociceptivni efekt NO-a na periferiji u ranom stadijumu inflamatornog bola (Hamza i sar., 2010). Generalno, neodgovarajuća i prekomerna produkcija NO-a putem iNOS i/ili nNOS je udružena sa razvojem inflamatornog i neuropatskog bola (Payne i sar., 2010). Pored toga, inhibitori NOS mogu da ispolje i ekscitatorno i inhibitorno dejstvo na događaje vezane za aktivnost NMDA receptora (Dawson i sar., 1991). Naš rezultat da L-NPA, selektivni inhibitor nNOS, povećava analgetički efekt dizocilpina u karageninom-indukovanoj perifernoj hiperalgeziji, sugerise da nNOS inhibitor povećava blokadu NMDA receptora izazvanu sa dizocilpinom. U saglasnosti sa ovim, pokazano je da selektivni inhibitor nNOS potencira antidepresivni efekt dizocilpina (Dhir i Kulkarni, 2008). Nakon injekcije karagenina u šapi pacova u neuronima lumbalnog dela kičmene moždine pokazana je povećana ekspresija nNOS i iNOS (Chu i sar., 2005), dok je nivo eNOS ostao nepromenjen (Tao i sar., 2004). U zapaljenju zgloba pacova izazvanog Freund-ovim adjuvansom intratekalno dat ketamin smanjuje ekspresiju nNOS, a povećava ekspresiju iNOS i eNOS u dorzalnim rogovima kičmene moždine (Infante i sar., 2007). Autori su objasnili da je kompenzatorna interakcija uticala na ekspresiju različitih izoformi NOS. Istaknuto je da inhibitori

nNOS mogu aktivirati transkripcioni NF- κ B (nuklearni faktor kapa-koji poboljšava aktivaciju B ćelija) i iNOS (Togashi i sar., 1997; O'Mahony i Kendall, 1999) kroz ušodnu regulaciju iNOS gena (Xie i sar., 1993). U tom smislu, mi pretpostavljamo da dizocilpin smanjuje ekspresiju nNOS i da se to dovodi u vezu sa potencirajućim efektom L-NPA i redukujućim efektom SMT na antihiperalgezijski efekt dizocilpina. Naši rezultati su u saglasnosti sa prethodnim izveštajem da SMT smanjuje mehaničku i termičku hiperalgeziju tokom artritisa izazvanog sa monosodijum jodoacetatom (More i sar., 2013). I drugi selektivni inhibitori inducibilnog oblika NOS su smanjili bol u šapi pacova izazvanu karageninom ili formalinom (npr. N-(3-(aminometil)benzil) acetamidin (1400W)) (Tang i sar., 2007), kao i mehaničku hiperalgeziju tokom artritisa izazvanog sa Freund-ovim adjuvansom (De Alba i sar., 2006). Uzimajući sve navedeno u obzir, naši rezultati ukazuju da različiti efekti inhibitora NOS mogu biti posledica različitog uticaja izoformi NOS na hiperalgeziju, kao i same interakcije između dizocilpina i izoforme(i) NOS.

Na osnovu rezultata dobijenih u somatskom inflamatornom modelu bola, mi smo pretpostavili da NMDA-zavisani mehanizmi doprinose i antinociceptivnom dejstvu dizocilpina i barem delimično dejstvu magnezijum-sulfata. To je u skladu sa stavom da su NMDA receptori centralno i periferno rasprostranjeni i da učestvuju u procesu visceralne nocicepcije (Li i sar., 2004; Willert i sar., 2004; Strigo i sar., 2005). Pokazano je da dizocilpin blokadom NMDA receptora na spinalnom, ali ne i na supraspinalnom nivou, smanjuje broj grčeva (Ruan i sar., 2010). Receptori za glutamat su prisutni u stomaku, duodenumu i kolonu kod pacova (Burns i sar., 1994; Ennes i sar., 2001) gde učestvuju u crevnom motilitetu i inflamaciji (Varga i sar. 2010). Pošto magnezijum i dizocilpin blokiraju aktivaciju NMDA receptora različitim mehanizmom dejstva i pošto je dizocilpin referentni NMDA antagonist, dok magnezijum ima i druge mehanizme dejstva, za očekivati je da oni imaju donekle različite efekte (Salińska i Lazarewicz, 1995). U *in vivo* animalnom modelu bola mi smo pokazali da magnezijum aktivira TRPA1 kanale na lokalnom perifernom nivou (Srebro i sar., 2015). Elektrofiziološkom studijom je potvrđeno da aktivacija TRPA1 receptora u kičmenoj moždini ima antinociceptivni efekt (Yamanaka i sar., 2015). U skladu sa ovim nalazima, mi pretpostavljamo da u centralnom nervnom sistemu magnezijum može da aktivira

TRPA1 receptore i na taj način doprinese smanjenju bola, dok na periferiji doprinosi lokalnoj hiperalgeziji. TRPA1 receptori učestvuju u razvoju i somatskog i visceralnog inflamatornog bola (Eid i sar., 2008; Pereira i sar., 2013). HC-030031, selektivni antagonist TRPA1 receptora, smanjuje visceralnu nocicepciju mehanizmom koji je nezavisan od modulacije NO-a i opioidnog sistema (Pereira i sar., 2013). Poznato je i da NO učestvuje u modulaciji bola, u perifernom i centralnom nervnom sistemu, u somatskom i visceralnom modelu bola (Bulutcu i sar., 2002; Freire i sar., 2009; Srebro i sar., 2014a; Srebro i sar., 2014b). Zbog povezanosti NMDA receptora i NO signalizacije i naših rezultata u somatskom inflamatornom modelu bola, mi smo očekivali iste rezultate i u visceralnom bolu. Međutim, antinociceptivni efekti magnezijum-sulfata i dizocilpina u visceralnom inflamatornom modelu bola nisu statistički značajno izmenjeni pod dejstvom selektivne inhibicije neuralnog i inducibilnog oblika NOS. Moguće objašnjenje je da magnezijum-sulfat i dizocilpin imaju barem delimično različit mehanizam analgetičkog dejstva u somatskom i visceralnom inflamatornom bolu. Visceralni i somatski bol pokazuju mnoge razlike u neurobiološkom mehanizmu koji učestvuje u senzornom procesu. Postoje i neke sličnosti pošto visceralni bol se može klasifikovati na „pravi“, visceralni bol i visceralni bol koji je „konvergenciono-projekcioni“, odnosno koji nastaje draženjem nociceptora i visceralnih, ali i somatskih nervnih vlakana (Cervero, 1985; LeBars i sar., 2001). Test grčeva izazvan sirćetnom kiselinom predstavlja model bola koji je visoko osetljiv na inhibitore NOS (Larson i sar., 2000). Dalje, modulirajući nishodni put NO-a mi smo pronašli da NO/cGMP/K⁺ATP put ima značajnu ulogu u antinociceptivnom dejstvu dizocilpina, ali i da ne doprinosi antinociceptivnom efektu magnezijum-sulfata u visceralnom bolu (Vuckovic i sar., 2015). Neselektivni inhibitor NOS, L-NAME, gvanilatne ciklaze, metilensko plavo, kao i blokator ATP zavisnih kalijumskih kanala, glibenklamid, nisu promenili antinociceptivni efekt magnezijum-sulfata u našim eksperimentima, što sugerise da NO/cGMP/K⁺ATP put nije mehanizam analgetičkog dejstva magnezijum-sulfata u visceralnom bolu. Navedeni inhibitori, pod istim uslovima, redukovali su analgetički efekt dizocilpina. Međutim, kako selektivni inhibitori neuralne i inducibilne NOS nemaju uticaja na analgetički efekt dizocilpina, kao ni na analgetički efekt magnezijum-sulfata, onda se verovatno aktivacija cGMP i K⁺ATP kanala odvija mehanizmom nezavisnim od NO-a.

Mogući mehanizam koji objašnjava inhibitorno dejstvo L-NAME na antinociceptivni efekt dizocilpina, dobijen u našem eksperimentu, je da L-NAME smanjuje isporuku dizocilpina u mozak, možda zbog L-NAME indukovanih promena u protoku krvi. Mueller i Hunt (1985) su pokazali da postoji farmakokinetička interakcija između L-NAME i ketamina, u kojoj L-NAME zbog vazokonstikcije smanjuje isporuku ketamina u mozak pacova i tako redukuje bihevioralni odgovor na ketamin. Ovaj nalaz je podržan i rezultatom *in vitro* ispitivanja u kome ketamin nema direktni efekt na aktivnost NOS (Tobin i sar., 1994). Kada je u pitanju magnezijum-sulfat, pokazano je da magnezijum-sulfat povećava brzinu cerebralnog protoka krvi (Ludbrook i sar., 1999), kao i da smanjuje hipertenziju izazvanu sa L-NAME kod gravidnih ženki pacova (Standley i sar., 2006). Sa druge strane, postoje dokazi koji isključuju farmakokinetički uticaj L-NAME. Pokazano je da L-NAME (i.p.) delujući na nivou kičmene moždine smanjuje mehaničku hiperalgeziju nastalu tokom oštećenja kičmene moždine (Hao i Xu, 1996).

U našim eksperimentima, glibenklamid je pimenjen u subefektivnoj dozi tj. u dozi koja ne utiče na broj grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom. Glibenklamid je antagonizovao analgetički efekt dizocilpina u testu grčeva kod pacova (Srebro i sar., 2015). Bulutcu i sar. (2002) su pokazali da centralna aktivacija NO-cGMP puta doprinosi antinociceptivnom dejstvu ketamina u testu grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom. Poznato je da ketamin ostvaruje i periferni antinociceptivni efekt, u prostangladin E₂ izazvanoj hiperalgeziji šape pacova, upravo aktivacijom ATP-zavisnih kalijumskih kanala (Romero i Duarte, 2013). Za razliku od dejstva na dizocilpin, glibenklamid nije uticao na analgetički efekt magnezijum-sulfata (Vuckovic i sar., 2015). Znači da ATP-zavisni kalijumski kanali nisu uključeni u analgetički efekt magnezijum-sulfata. Kako glibenklamid specifično blokira ATP-zavisne kalijumske kanale, a nema uticaja na druge tipove kalijumovih kanala, kao što su Ca²⁺-aktivirani K⁺ kanali i voltažno zavisni kalijumski kanali (Lazaro-Ibanez i sar., 2001; Alves i Duarte, 2002; Jesse i sar., 2007), u ovom delu istraživanja mi smo ispitali samo učešće K⁺ATP kanala, ali ne možemo zanemariti i moguće učešće drugih kanala u analgetičkom dejstvu magnezijuma. Skoro je rasvetljeno da vezivanje magnezijumovih jona za voltažno-zavisne natrijumske kanale zavisi od tipa i konformacijskog stanja ovih kanala (Vastani i sar., 2013). Prema tome, tačan efekt magnezijuma na bol preko drugih kanala treba ispitati.

Pored dejstva na hiperalgeziju, u modelu somatske inflamacije kod pacova ispitivano je i **dejstvo magnezijum-sulfata i dizocilpina na edem**. Inflamacija u šapi pacova izazvana karageninom je uobičajeno korišćeni akutni lokalni inflamatorni model za procenu doprinosa medijatora inflamacije koji su uključeni u vaskularne promene i infiltraciju neutrofilima (Morris, 2003). Naši rezultati su pokazali da magnezijum-sulfat i dizocilpin smanjuju edem šape izazvan karageninom. Saznanje da oni poseduju antiinflamatorno dejstvo može biti korisno u onim situacijama kada primena NSAID-ova ili kortikosteroida nije poželjna zbog neželjenih dejstva.

U našim eksperimentima porast volumena šape izazvan karageninom počinje od 1 h, a maksimum dostiže u 4 h, što je u skladu sa literaturnim podacima (Odabasoglu i sar., 2011).

Antiedematozni efekt magnezijum-sulfat ostvaruje nakon sistemske i lokalne periferne primene. Efekt nije dozno-zavisan. Magnezijum-sulfat primenjen sistemski pre nastanka zapaljenja (profilaktički) smanjuje edem šape nastao usled zapaljenja samo u dozi od 5 mg/kg za oko 30% i samo u vreme maksimalno razvijenog edema tj. u 4,5 satu. Sa druge strane, magnezijum-sulfat primenjen sistemski u vreme maksimalno razvijenog edema usled zapaljenja smanjuje edem samo u najvećoj testiranoj dozi od 30 mg/kg. Antiedematozni efekt traje tri sata nakon primene, tj. u 3,5, 4,5 i 5,5 satu i iznosi oko 51, 47 i 37%, respektivno. Antiedematozni efekt lokalno periferno primenjenog magnezijum-sulfata počinje u 3,5 i prestaje u 6,5 satu nakon nastanka zapaljenja. Dakle, u našim eksperimentima maksimalni antiedematozni efekt magnezijum-sulfata nakon sistemske i lokalne primene, kao i u pretretmanu i tretmanu je registrovan u 3,5 h, tj. u vreme kasne faze karageninskog edema i u vreme maksimalno razvijenog edema.

Do sada, na osnovu naših saznanja postoji samo jedno istraživanje o dejstvu magnezijuma na eksperimentalno izazvan edem šape. Mi smo po prvi put ispitali dejstvo magnezijum-sulfata na karageninom izazvan inflamatorni edem, u modelu akutne inflamacije, kao i njegovo dejstvo u tretmanu i nakon lokalne periferne primene. Naš rezultat da magnezijum primenjen preventivno i sistemski ima antiedematozni efekt u vreme maksimalno razvijenog edema je u skladu sa istraživanjem Nagai i saradnika

(2007). Razlika je što smo mi magnezijum primenili supkutano i jednokratno, a oni *per os* i višekratno, i u tome što mi nismo, a oni jesu dobili dozno-zavisan efekt. Razlika je i u proinflamatornom sredstvu. Mi smo koristili model akutne inflamacije izazvane karageninom, a oni model hronične izazvane mikobakterijama, što ukazuje da magnezijum može imati više mehanizama antiinflamatornog dejstva. U istraživanju Nagai i saradnika (2007), magnezijum-sulfat primenjen peroralno i višekratno (42 dana maksimalno do 2 mg Mg^{2+} u 10 ml/dan), putem vode za piće, pokazao je preventivno antiedematozno dejstvo na eksperimentalno-mikobakterijama izazvanom artritisu. Dejstvo na edem šape je praćeno tokom 42 dana, u toku kojih je magnezijum administriran svakodnevno. Antiinflamatorni efekt magnezijuma u ovoj studiji rastao je, sa porastom doze (Mg^{2+} 10-200 mg/l). Maksimalni efekt magnezijum je dostigo u 14. danu nakon izazivanja inflamacije, tj. u vreme maksimalno razvijenog edema u ovom modelu. Takođe, magnezijum je u kombinaciji sa indometacinom, neselektivnim inhibitorom COX, doveo do većeg smanjenja edema šape u 14. danu nakon inflamacije, u odnosu na indometacin primenjen sam, bez magnezijuma. Osim ovog istraživanja, u literaturi se navodi da magnezijum ima antiinflamatorno i imunomodulatorno dejstvo. Međutim, takvi rezultati za sada su pokazani samo tokom suplementacije magnezijumom na pacovima i ljudima tokom hipomagnezijemije (Mazur i sar., 2007; Almoznino-Sarafian i sar., 2007). Istraživanja na pacovima su pokazala da deficit magnezijuma dovodi do oslobađanja supstance P i drugih medijatora iz nervnih završetaka. Tada dolazi do aktivacije imunih ćelija koje oslobađaju histamin i citokine, proizvodeći proinflamatorno stanje i povećanje nivoa NO-a i reaktivnih kiseoničnih slobodnih radikala. Kako je magnezijum prirodni „antagonist kalcijuma,, moguće je da tokom hipomagnezijemije dolazi do intracelularnog porasta nivoa kalcijuma što aktivira procese koji doprinose inflamaciji. Ovo su neki od mogućih, još uvek nedovoljno razjašnjenih, mehanizama antiinflamatornog dejstva magnezijuma.

U našim eksperimentima, dizocilpin je ispoljio antiedematozni efekt nakon sistemske, ali ne i nakon lokalne periferne primene. Efekt nije zavisan od doze. Maksimalni antiedematozni efekt iznosi oko 47% i postiže se u 2,5 i 3,5 satu nakon izazivanja zapaljenja, tj. u kasnoj fazi i u vreme maksimalnog razvoja edema. U literaturi postoji nekoliko podataka o dejstvu dizocilpina na edem nastao tokom inflamacije.

Antiedematozni efekt dizocilpina u našim eksperimentima je dobijen sa većom dozom dizocilpina u odnosu na prethodne studije, ova činjenica može se objasniti korišćenjem različitih eksperimentalnih uslova. Dizocilpin nakon sistemske (i.p.) i lokalne (i.pl.) primene nije uticao na edem šape pacova izazvan glutamatom, dok NBQX, ne-NMDA antagonist, pod istim uslovima ima antiedematozno dejstvo (Beirith i sar., 2002). Tokom inflamacije šape izazvane paukovim otrovom lokalno i.pl. primenjen dizocilpin smanjuje mehaničku hiperalgeziju, dok nema uticaja na edem šape (Zanchet i Cury, 2003). Literaturni podaci o dejstvu drugih različitih NMDA antagonista na edem u nekoliko eksperimentalnih modela zapaljenja su oskudni i neusaglašeni. U zavisnosti od koncentracije formalina (2 ili 5%) koja se koristi za izazivanje akutnog zapaljenja, ketamin, deksklorometorfan i memantin, tri NMDA antagonista koji se koriste u kliničkoj praksi, imaju različit efekt na edem šape. Nakon sistemske primene ova tri NMDA antagonista sa jedne strane potenciraju nastanak edema šape kada se koristi niža koncentracija formalina (2%), dok sa druge strane smanjuju edem šape kada je on izazvan visokom koncentracijom formalina (5%) (Sawynok i Reid, 2002). Nakon sistemske primene, memantin je najpotentniji, deksklorometorfan smanjuje edem samo u najvećoj testiranoj dozi, dok ketamin ima minimalan efekt. Intraplantarne primene 5% formalina dovodi do oslobađanja glutamata i periferno (Omote i sar., 1998) i centralno (Okuda i sar., 2001). Sa druge strane 2% formalin ne dovodi do oslobađanja glutamata na nivou kičmene moždine. Sistemski antiinflamatorni efekt pomenuta tri antagonista autori objašnjavaju blokadom NMDA receptora na nivou kičmene moždine (Sawynok i Reid, 2002). Blokadom NMDA može se barem delimično smanjiti sinteza NO-a koji ima vazodilatatorno dejstvo.

Jedan deo naših istraživanja odnosio se i na ispitivanje **mehanizma antiedematoznog dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpina**. Njihovo antiedematozno dejstvo ispitano je paralelno sa antihiperalgezijskim dejstvom, upotrebom istih antagonista i pod istim eksperimentalnim uslovima.

Literaturni podaci o dejstvu NMDA antagonista na razvoj edema tokom eksperimentalne inflamacije oskudni su i neusaglašeni i veći značaj pokazuju ne-NMDA

receptori. Ovi rezultati ukazuju da NMDA receptori u kičmenoj moždini mogu biti uključeni u nastanak edema na periferiji, dok ovi receptori lokalno na mestu inflamacije nemaju ulogu u razvoju edema (Sawynok i Reid, 2002; Beirith i sar., 2002; Zanchet i Cury, 2003). To potvrđuje i sistemski antiinflamatorni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina u našem istraživanju. U našem istraživanju tokom inflamacije na periferiji dizocilpin je smanjio bol i otok nakon sistemske primene, dok je nakon lokalne primene uticao samo na smanjenje bola. Sa druge strane, magnezijum-sulfat smanjio je bol i otok nakon sistemske primene, dok je nakon lokalne primene uticao samo na smanjenje otoka. Ovakvi rezultati bi mogli da se protumače da magnezijum-sulfat sistemski antiinflamatorni efekt barem delimično ostvaruje preko NMDA receptora, a lokalno antiedematozno dejstvo ostvaruje nekim drugim mehanizmom. Od značajno bi bilo ispitati mehanizam lokalnog antiinflamatornog dejstva magnezijum-sulfata.

Naša istraživanja su pokazala da **L-NAME**, neselektivni inhibitor NOS, primenjen i.p. u dozi od 3 mg/kg antagonizuje efekt magnezijum-sulfata, a u dozi od 5 mg/kg u kombinaciji sa magnezijum-sulfatom potencira antiedematozno dejstvo magnezijum-sulfata. L-arginin, prekursor NO, smanjuje dejstvo L-NAME na efekt magnezijum-sulfata i potvrđuje ulogu NO-a u antiedematoznom dejstvu magnezijum-sulfata. U odnosu na magnezijum-sulfat, neophodna je veća doza L-NAME (10 mg/kg) da se antagonizuje efekt dizocilpina. **L-NPA**, selektivni inhibitor nNOS i **SMT**, potentan i selektivan inhibitor iNOS, antagonizovali su antiedematozne efekte magnezijum-sulfata i dizocilpina. Najveći porast aktivnosti iNOS tokom razvoja edema izazvanog karageninom dešava se u 4 h (Salvemini i sar., 1996; Odabasoglu i sar., 2011), što potvrđuje naš rezultat da SMT u potpunosti (100%) antagonizuje antiedematozni efekt magnezijum-sulfata u 4,5 h. Mi smo po prvi put ispitali dejstvo ovih inhibitora u prisustvu magnezijum-sulfata i dizocilpina u inflamatornom bolu i edemu.

Pokazana je povezanost magnezijuma sa NO-om. Deficit magnezijuma kod pacova dovodi do povećanog stvaranja NO-a putem iNOS u makrofagima (Yokoyama i sar., 2003). Suplementacija sa magnezijumom pokazala se efikasnom u smanjenju prekomerne proizvodnje NO-a tokom razvoja katarakte kod pacova (Nagai i sar., 2006).

Predloženo je da tokom eksperimentalnog artritisa *per os* primenjen magnezijum sprečava prekomernu proizvodnju NO-a i na taj način ostvaruje antiedematozno dejstvo (Nagai i sar., 2007). Više puta do sada je navedeno da NO ima ulogu medijatora u inflamaciji. Pored toga, NO je vazodilatator (Gardiner i sar., 1992) čime podstiče permeabilnost mikrovaskulature što dovodi do formiranja edema (Hughes i sar., 1990; Giraldeho i sar., 1994). Magnezijum je takođe vazodilatator. Inhibitori sve tri forme NOS suzbijaju edem nastao tokom karageninske inflamacije (Handy and Moore, 1998). To nije iznenađujuće s obzirom da je NO ključni molekul uključen u regulaciju COX puta i na taj način moduliše proizvodnju eikosanoida na više nivoa (Mollace i sar., 2005). U prilog ovom mehanizmu je rezultat da magnezijum stupa u sinergističku interakciju sa indometacinom u ostvarivanju antiedematoznog dejstva (Nagai i sar., 2007).

Na osnovu naših istraživanja magnezijum-sulfat i dizocilpin dovode do porasta aktivnosti NO-a i smanjenja edema šape pacova. U našim eksperimentima, subefektivne doze korišćenih inhibitora su pokazale da nemaju uticaja ili potenciraju ili inhibiraju efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina. Kada smo primenili inhibitore NOS, antiedematozni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina je izostao. Iz ovoga sledi da magnezijum i dizocilpin povećavaju aktivnost NO-a i na taj način smanjuju edem šape. Ovi rezultati nisu u skladu sa gore navedenim podacima iz literature. Jedan od razloga za to može biti doza inhibitora NOS. Jos jednom treba istaći da je NO molekul sa kompleksnim dejstvom. I ako je NO vazodilatator, paradoksalno, inhibitori NOS mogu imati i proedematozno dejstvo. Sa druge strane moguće je da magnezijum-sulfat i dizocilpin smanjuju edem donekle različitim mehanizmom, ali da NO svakako ima modulatorno dejstvo i na inflamaciju i na efekte magnezijuma i dizocilpina. U skladu sa time je istraživanje Beirih i sar. (2002) koje je pokazalo da nakon intraplantarne injekcije glutamata (agonist NMDA receptora) bol i edem u šapi nastaju donekle sličnim mehanizmom; bol nastaje zbog aktivacije i NMDA i ne-NMDA receptora putem mehanizma koji zavisi od aktivacije L-arginin-NO puta; dok je za nastanak edema šape prvenstveno odgovorna aktivacija jonotropnih ne-NMDA receptora i oslobađanje NO-a. Njihovi rezultati su pokazali da centralno, sistemski i lokalno primenjen dizocilpin (referentni NMDA antagonist) smanjuje bol, a ne utiče na edem

šape u modelu akutne inflamacije šape izazvane glutamatom (agonistom NMDA receptora). Ne-NMDA antagonist je u istom modelu i pod istim uslovima smanjio i bol i otok šape. U istom istraživanju, L-NAME je smanjio bol i otok šape izazvan glutamatom. U našim eksperimentima analgetsko dejstvo delimično prati antiinflamatorno dejstvo. U karageninskom modelu inflamacije šape, sistemski antihiperalgezijski i antiedematozni efekt magnezijum-sulfata je inhibiran pod dejstvom selektivnih inhibitora nNOS i iNOS. Neselektivni inhibitor NOS, L-NAME, je inhibirao antihiperalgezijski efekt magnezijum-sulfata, dok je na antedematozni efekt magnezijum-sulfata imao i inhibitorno i potencirajuće dejstvo, zavisno od doze. Sistemski antihiperalgezijski i antiedematozni efekt dizocilpina je smanjen pod dejstvom L-NAME i SMT. L-NPA, inhibitor nNOS, potencira antihiperalgezijski, a inhibira antiedematozni efekt dizocilpina. Na osnovu svega navedenog, neophodna su dodatna istraživanja kako bi se razjasnili precizni mehanizmi antiinflamatornog dejstva magnezijuma-sulfata i dizocilpina.

Jedno od glavnih otkrića ove teze je i da **magnezijum-sulfat** ubrizgan u šapu pacova ima lokalno periferno **pronociceptivno dejstvo**. Do ovog otkrića došli smo pri kontrolnim merenjima, kada smo ispitivali da li magnezijum-sulfat lokalno smanjuje hiperalgeziju šape izazvanu karageninom. Supkutana injekcija magnezijum-sulfata (0,5, 1,5, 3 i 6,2 mg/šapi, i.pl.) u šapu pacova izaziva dozno-zavisnu mehaničku hiperalgeziju (Srebro i sar., 2015). U poređenju sa 0,9% NaCl, sniženje praga povlačenja šape na mehanički stimulus je statistički značajno i dozno-zavisno. Magnezijum-sulfat ima lokalno dejstvo, s obzirom da sniženje praga povlačenja šape na mehanički stimulus na kontralateralnoj šapi nije registrovano nakon najviše ispitivane doze (6,2 mg/šapi). Nepromenjen prag bola na kontralateralnoj šapi ukazuje i na odsustvo sekundarne hiperalgezije. Na mestu injekcije (lokalno) javlja se blagi eritem, bez edema. Nakon najviše ispitane doze (6,2 mg/šapi) magnezijum-sulfata koja odgovara i izotoničnom rastvoru magnezijum-sulfata (6,2% ili 250 mmol/l, toničnost 289 mOsmol) sniženje praga bola na mehanički stimulus se kreće u rasponu sniženja koje smo dobili nakon injekcije karagenina. Intenzitet i dužina hiperalgezije su slični karageninskoj, osim što se intenzitet konstantno održava. U nastavku istraživanja ispitivali smo mehanizam dejstva izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata (6,2 mg/šapi) čija je pH vrednost oko 6,0. pH

nekorigovan rastvor izotoničnog magnezijum-sulfata (oko 6,0) i rastvor izotoničnog magnezijum-sulfata korigovan do fiziološke vrednosti (7,4) proizvode mehaničku hiperalgeziju šape pacova sličnog inteziteta i trajanja.

Poznato je da intramuskularna, intravenska i supkutana injekcija magnezijum-sulfata kod ljudi (Agarwal i sar., 2004; Ushida i sar., 2009; Herroeder i sar., 2011) i intraperitonealna injekcija kod pacova (Gyires i Torma, 1984) izaziva lokalni osećaj bola. Pokazano je i da supkutano primenjen ketamin, NMDA antagonista, kod ljudi dovodi do bolnih induracija i svraba na mestu primene (Eide i sar., 1995).

U suprotnosti sa našim rezultatima, pokazano je da supkutana injekcija magnezijum-sulfata od 50 (u 0,1 ml, 337 mOsmol, 1,23 g po dozi) i 500 mmol (u 0,1 ml, 524 mOsmol, 12,3 g po dozi) u podlaktici zdravih volontera povećava prag bola na mehanički stimulus (Ushida i sar., 2009). Takođe, pokazano je i da magnezijum-sulfat ima lokalno analgetičko dejstvo nakon intraartikularne primene kod ljudi (500 mg/20 ml) (Koltka i sar., 2011) i pacova (500 µg/0,1 ml) (Lee i sar., 2009). Pretpostavlja se da ovi efekti nastaju blokadom perifernih NMDA receptora i stabilizacijom membrane nervne ćelije od strane magnezijum-sulfata (Lee i sar., 2009; Herroeder i sar., 2011). Vastani i sar. (2013) su nedavno pokazali da efekt magnezijum-sulfata na ekscitabilnost perifernih nervnih vlakana zavisi od tipa vlakna i membranskog potencijala. Prema tome, ova neslaganja mogu se objasniti razlikama u bolnim stimulusima, mestu injekcije, primenjenim dozama, kao i specijes razlikama.

U našim istraživanjima lokalno primenjen magnezijum-sulfat nije doveo do promena volumena šape pacova. Ako ovaj rezultat posmatramo sa stanovišta da je magnezijum vazodilatator, da relaksira glatke mišiće, kao i da je NMDA antagonist, onda ovaj rezultat nije u skladu sa literaturnim podacima. Lokalno periferno primenjeni keatamin, dekstrometorfan i memantin sami po sebi dovode do otoka šape pacova, koji je verovatno rezultat isticanja plazme. Njihovo proedematozno dejstvo blokiraju antagonisti 5-HT (serotoninskih) receptora (Sawynok i Reid, 2002).

Poznato je da injekcija magnezijum-sulfata može biti bolna. Prvi smo pokazali da magnezijum-sulfat ispoljava dozno-zavisno pronociceptivno dejstvo kada se ubrizga supkutano u šapu pacova. Međutim, mehanizam bola izazvanog magnezijum-sulfatom nije razjašnjen. Jedino su Gyires i Torma (1984) pokazali da prostaglandini ne učestvuju u mehanizmu nastanka abdominalnih grčeva, nakon intraperitonealne injekcije magnezijum-sulfata kod pacova. Zato je jedan od zadataka ove teze bio i ispitivanje upravo mehanizma dejstava magnezijum-sulfata koristeći antagoniste različitih receptora i jonskih kanala koji imaju ulogu u prenošenju i modulisanju bolnih signala. Uticaj magnezijum-sulfata na periferni nervni sistem utvrdili smo praćenjem efekata magnezijum-sulfata i odgovarajućih antagonista nakon lokalne periferne primene. Mogućnost ispoljavanja sistemskih efekata antagonista sa mesta primene je isključena, s obzirom nijedan ispitivani antagonist nije imao inhibitorni efekt kada se primenio u kontralateralnoj (zdravoj) šapi, u najvećoj ispitanoj dozi.

Jedan od glavnih rezultata ove teze je da lokalna (periferna) supkutana injekcija magnezijum-sulfata izaziva TRPV1-, TRPV4-, TRPA1- i ASIC-zavisnu mehničku hiperalgeziju kod pacova. Međutim, kada se pH rastvor magnezijum-sulfata koriguje sa oko 6 na 7,4 ASIC ne učestvuju u nastanku bola. Kada je pH rastvora nepodešen, ASIC receptori verovatno doprinose hiperalgeziji, koja je jačeg inteziteta i ranije nastaje preko aktivacije TRPV4 i TRPA1 receptora, respektivno. Ovi rezultati mogli bi da objasne patofiziologiju iritirajućeg bola koji nastaje posle injekcije lekova.

S obzirom na veliki broj i funkciju TRP kanala, mi smo koristili farmakološka sredstva da potvrdimo/isključimo učešće TRP kanala u razvoju lokalnog somatskog bola izazvanog magnezijum-sulfatom. Prvi smo ispitali ulogu TRPA1, TRPV1, TRPV4 i ASIC kanala u bolu izazvanom rastvorom magnezijum-sulfata i pokazali da magnezijum-sulfat aktivira ove kanale. Naši rezultati ukazuju i da antagonisti TRPA1, TRPV1 i TRPV4 receptora mogu biti potencijalno nova klasa analgetika. Njihovu kliničku primenu mogu ograničiti neželjena dejstva, npr. hipertermija (TRPV1), koja se mogu izbeći njihovom lokalnom primenom.

TRPV1 kanali su široko eksprimirani u senzornim neuronima. Vaniloidni receptor tip 1 je neselektivni katjonski kanal, koji se aktivira visokom temperaturom i kada je pH sredine manji od 6,0. Vaniloidi su neophodni za nastanak senzitivizacije na štetne stimuluse, tokom inflamacije. Objavljeno je da **kapsazepin**, selektivan TRPV1 antagonist, blokira kapsaicinom-, ali ne i kiselinom-izazvan porast efluksa Ca^{2+} i Rb^{+} u kulturi neurona dorzalnih rogova kičmene moždine, nakon aktivacije vaniloidnih receptora (Bevan i sar., 1992). Imajući u vidu ovaj nalaz, mi pretpostavljamo da su vaniloidni receptori propustljivi i za jone magnezijuma. Prema našim saznanjima, mi smo prvi pružili dokaze o povezanosti između ovih kanala i magnezijum-sulfata. Mi smo pokazali da kapsazepin inhibira magnezijum-sulfatom izazvanu mehaničku hiperalgeziju na dozno-zavisan način. Takođe smo pokazali da kapsazepin ima sličan efekt kada se primeni i pod pH nekorigovanim i pH korigovanim uslovima. Pretpostavljamo da inhibicija bola izazvana kapsazepinom u našim rezultatima je posledica specifičnog dejstva magnezijum-sulfata na receptore za kapsaicin u senzornim nervima. Dalje, naši rezultati sugerišu da je aktivacija TRPV1 kanala neosetljiva na protone. To je u skladu sa nalazom da kapsazepin ne blokira kiselinom (niskim pH)-izazvanu aktivaciju TRPV1 kanala (Bevan i sar., 1992; McIntyre i sar., 2001). Takođe, zapazili smo da kapsazepin administriran intraplantarno redukuje mehaničku hiperalgeziju samo kada se da ipsilateralno, ali ne i kada je dat kontralateralno, što sugerše njegovo lokalno periferno dejstvo. Naši rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima da lokalno primenjen kapsazepin redukuje mehaničku i termičku inflamatornu hiperalgeziju (Kwak i sar., 1992) i ponašanje u vezi sa bolom (Santos i Calixto, 1997; Sakurada i sar., 2003; Tang i sar., 2007; Potenzieri i sar., 2009). U navedenim istraživanjima korišćen je veliki raspon doza kapsazepina. Nekoliko faktora može tome doprinositi, kao što je eksperimentalni model (neuropatski ili inflamatorni bol), vrsta eksperimentalne životinje (Walker i sar., 2003), vrsta ispitivanih vlakana (percepcija termičke draži zahteva relativno visoke doze), kao i proinflamatorne supstance.

TRPV4 kanali učestvuju u regulaciji osmotskog pritiska i reaguju na mehaničko istezanje. Kao nociceptori, oni reaguju na jako kiselu sredinu, neuropatski i inflamatorni bol (Alessandri-Haber i sar., 2004; Denadai-Souza i sar., 2012). Na osnovu našeg

saznanja, ovo je prvi izveštaj o povezanosti TRPV4 kanala i magnezijum-sulfata. Mi smo koristili pH-korigovan i ne korigovan izotoničan rastvor magnezijum-sulfata da bi isključili osmotski i pH efekt na aktivaciju TRPV4. **RN-1734**, selektivni antagonist TRPV4 kanala, dat ipsilateralno intraplantarно sa magnezijum-sulfatom dovodi do smanjenja hiperalgezije u šapi pacova. Analgetički efekt RN-1734 pod pH korigovanim uslovima istraživanja, u odnosu na pH nepodešene uslove, je slabijeg inteziteta i kraćeg trajanja. Ovaj nalaz upućuje da, pored magnezijum-sulfata, i protoni (nizak pH) istovremeno izazivaju određeni stepen aktivacije TRPV4 kanala. Do sada je poznato da sistemska primena RN-1734 smanjuje mehaničku hiperageziju izazvanu TRPV4 agonistom tokom inflamacije (Bang i sar., 2012), periferne neuropatije izazvane hemoterapijom sa paklitakselom (Chen i sar., 2011), kao i nociceptivni bol tokom intestinalne inflamacije (Fichna i sar., 2012) ili cistitisa (Charrua i sar., 2015). Lokalni analgetički efekt RN-1734, u vidu smanjenja ponašanja u vezi sa bolom, je pokazan jedino nakon intrakolonične primene kod inflamatornog kolitisa (Fichna i sar., 2012).

Uloga **TRPA1** kanala u alodiniji i hiperalgeziji je podržana otkrićem da TRPA1 antagonisti smanjuju inflamacijom- ili oštećenjem nerva- izazvano smanjenje praga povlačenja šape na mehanički stimulus (Petrus i sar., 2007; Eid i sar., 2008), kao i da smanjuju mehanički izazvano okidanje akcionih potencijala u C vlaknima (Wei i sar., 2011) kod pacova. U skladu sa prethodnim nalazima da TRPA1 kanali učestvuju u mehanotransmisiji (Klafke i sar., 2012), mi smo dobili da lokalno primenjen **kamfor** redukuje mehaničku hiperalgeziju na periferiji. TRPA1 receptori su selektivno izraženi u peptidergičkim senzornim neuronima, kao što su i TRPV1 receptori, ukazujući na njihovu moguću ulogu u procesu nastanka bola (Bautista i sar., 2005). Interesanto je istaći da kamfor nije selekivan za TRPA1 receptore. On je TRPA1 antagonist, ali i TRPV1 aktivator u značajno različitim koncentracijama (EC_{50} 4,5 mM za aktivaciju TRPV1 u poređenju sa IC_{50} od 0,66 mM za blokadu TRPA1) (Xu i sar., 2005). Ovaj nalaz je podržan *in vivo* i *in vitro* istraživanjima (Klafke i sar., 2012) koja pokazuju da kamfor selektivno blokira TRPA1 kanale u dozama do 2,5 μ g/šapi (0,16 mM/šapi), koje smo mi i koristili u našim eksperimentima. Osim toga, naš nalaz da kamfor u dozi od 2,5 μ g/šapi inhibira magnezijum-sulfatom izazvanu hiperalgeziju za $49,8 \pm 6,5\%$ je u skladu sa rezultatima Montrucchio i saradnika (2013) koji su pokazali da u dozi od 3,8

μg/šapi kamfor dat periferno (i.pl.) inhibiše bol izazvanu cinamaldehydom (sastojak cimeta), selektivnim TRPA1 agonistom, za $53 \pm 8\%$. U skladu sa ovim nalazom, mi smo utvrdili da **HC-030031**, selektivni antagonist TRPA1 receptora, redukuje magnezijum-sulfatom izazvanu mehaničku hiperalgeziju u sličnom stepenu kao i kamfor. Na osnovu svega izloženog, možemo zaključiti da TRPA1 kanali maksimalno doprinose bolu 50%. Daljim ispitivanjem pokazali smo da najveća ispitana doza HC-030031 ima sličan (oko 32-33%) ali odložen antihiperalgezijski efekt u pH podešenim, u odnosu na pH nepodešene uslove eksperimenta. Verovatno da kiseli joni indukuju ranu aktivaciju TRPA1 kanala i doprinose razvoju hiperalgezije, dok magnezijum-sulfat kasnije direktno aktivira TRPA1. Ova pretpostavka je podržana nalazom da se TRPA1 kanali aktiviraju slabim kiselinama (Wang i sar., 2011). Ranije je pokazan lokalni analgetički efekt HC-030031 (100 μg) na mehaničku hiperalgeziju u inflamiranoj šapi (Lennertz i sar., 2012). Pokazano je i da HC-030031 u dozi od 1200 μg dat u ipsilateralnu, ali ne i kontralateralnu, šapu blokira mehaničku hiperalgeziju izazvanu alilizotiocijanatom (AITC) (Perin-Martins i sar., 2013). U našim eksperimentima mi smo koristili manje doze (2-50 μg) HC-030031, a razlog za to može biti intezitet inflamacije (odsustvo edema i blagi eritem smo zapazili nakon intraplantarne primene magnezijum-sulfata) ili različita potentnost TRPA1 aktivatora. Kao što je već rečeno, TRPA1 mogu aktivirati joni kalcijuma (Zurborg i sar., 2007) ili cinka (Hu, 2009), a naši rezultati sugerišu da aktivatori mogu biti i magnezijumovi i vodonikovi (kiseli) joni.

Naša istraživanja su pokazala da **amilorid**, neselektivni inhibitor **ASIC**, dat lokalno periferno je u mogućnosti da redukuje mehaničku hiperalgeziju izazvanu magnezijum-sulfatom, ali samo kada je pH rastvor magnezijum-sulfata nepodešen (pH oko 6,0). Kada je pH rastvora magnezijum-sulfata podešen na oko 7,4, amilorid ne smanjuje bol. Ovi rezultati ukazuju da se ASIC receptori aktiviraju kiselim jonima, a da ih sam magnezijum-sulfat ne aktivira. ASIC3 receptori su eksprimirani na nociceptorima, a amilorid, diuretik koji štedi kalijum, je neselektivni inhibitor ASIC kanala, posebno ASIC tip 3 kanala (Kuduk i sar., 2009). Rezultate koje smo dobili koristeći pH nekorigovan rastvor magnezijum-sulfata su u saglasnosti sa podacima iz literature koji pokazuju da lokalna periferna supkutana injekcija amilorida u šapi pacova smanjuje nociceptivni bolni odgovor koji je izazvan pH nepodešenim rastvorom serotonina,

kapsaicina i formalina (Rocha-González i sar., 2009). Takođe, supkutana injekcija amilorida kod zdravih volontera inhibiše bol izazvan jontoforezom kiseline, što upućuje na učešće ASIC receptora u nastanku bola (Jones i sar., 2004). S obzirom da amilorid ima brojne mehanizme dejstva koji ne uključuju ASIC kanale, mi na osnovu doza amilorida koje smo koristili u istraživanju (to su doze koje smanjuju kiselinom izazvan bol, Meotti i sar., 2010) i na odsustvo efekta amilorida nakon pH korekcije rastvora, pretpostavljamo da su ASIC receptori uključeni u mehanizam antinociceptivnog dejstva amilorida.

Literaturni podaci ukazuju da je hiperalgezija izazvana TRPA1 agonistima posredovana glutamatergičkom signalizacijom (Kosugi i sar., 2007; Klafke i sar., 2012). Prema rezultatima Kosugi i saradnika (2007) presinaptička aktivacija povećava frekvencu i amplitudu glutamatergičke signalizacije u kičmenoj moždini. Ovo doprinosi jačanju sinaptičke veze između primarnih aferentnih vlakana i dorzalnih neurona kičmene moždine. Aktivacija TRPA1 kanala u kičmenoj moždini pacova izaziva influks jona kalcijuma i povećano oslobađanje glutamata u sinapsama. Pokazano je da ove efekte redukuje kamfor, neselektivni TRPA1 antagonist (Klafke i sar., 2012). U okviru istog istraživanja, bihevioralnim ispitivanjem je pokazano da dizocilpin, nekompetitivni NMDA antagonist, smanjuje hiperalgeziju izazvanu cinamaldehydom, selektivnim TRPA1 agonistom (Klafke i sar., 2012). Međutim, ovaj efekt izgleda da nije rezultat direktne stimulacije glutamatergičkih (NMDA) receptora, zato što cinamaldehyd nije izazvao značajne promene u vezivanju glutamata za receptor. Ovi rezultati sugerišu da inhibitorni efekt dizocilpina zavisi od dinamičkog oslobađanja endogenog glutamata u kičmenoj moždini. U našem istraživanju, **dizocilpin**, NMDA antagonist, je statistički značajno i dozno-zavisno inhibirao magnezijum-sulfatom izazvanu mehaničku hiperalgeziju, iako obe supstance imaju sposobnost da blokiraju kanal u NMDA receptoru. Slično magnezijumu, i cink, dvovalentni jon i NMDA antagonist, izaziva bol. Cink ubrizgan u šapu miša izaziva lizanje i otresanje injektovane šape, i učešće TRPA1 receptora u transmisiji iritacije/bola (Hu i sar., 2009). Intenzivni štetni stimuli ili oštećenje tkiva uzrokuje oslobađanje glutamata iz primarnih aferentnih nerava, što dovodi do povećane aktivnosti receptora za ekscitatornu aminokiselinu u perifernom tkivu (Miller i sar., 2011). S obzirom na već opisanu povezanost između

glutamatergičke signalizacije, NMDA antagonista (kao što su dizocilpin i cink) i TRPA receptora, mi smatramo da glutamat doprinosi lokalnom pronociceptivnom dejstvu magnezijum-sulfata u našem istraživanju. Magnezijum blokira jonski kanal NMDA receptora na voltažno-zavisan način. Posle depolarizacije, blokada jonskog kanala u receptoru slabi, zbog čega kanal postaje propustan za jone kalcijuma i natrijuma (Traynelis i sar., 2010). Naše istraživanje ukazuje da magnezijum, i pored toga što centralno redukuje glutamatergičku neurotransmisiju preko NMDA receptora, lokalno primenjen verovatno izaziva oslobađanje glutamata i paradoksalnu aktivaciju NMDA receptora u perifernim neuronima (deGroot i sar., 2000).

Naši rezultati su pokazali da periferna inhibicija NOS i gvanilat ciklaze sa **L-NAME**, neselektivnim inhibitorom NOS, **ARL-17477**, selektivnim inhibitorom nNOS, **SMT**, selektivnim inhibitorom iNOS i **metilenskim plavim**, neselektivnim inhibitorom gvanilatne ciklaze, smanjuje mehaničku hiperalgeziju izazvanu magnezijum-sulfatom. NO ima dvostruko dejstvo na nocicepciju (Mense i sar., 2001). TRPA1 kanali mogu biti aktivirani/modulirani endogenim agonistima, kao što je NO (Yoshida i sar., 2006). Poznato je da aktivacija NMDA receptora povećava sintezu NO-a. Inhibicija stvaranja NO-a ispoljava antinociceptivni efekt u bolu koji je izazvan hemijskom stimulacijom perifernih nerava i u visceralnom bolu (Moore i sar., 1991). Važno je istaći da aktivacija NO-cGMP puta izaziva hiperalgeziju, pre nego antinocicepciju (Esplugues, 2002). Prema tome, naši rezultati ukazuju da lokalno, periferno proizveden NO od strane i neuralnog i inducibilnog oblika NOS ima značajnu ulogu u magnezijum-sulfatom izazvanoj mehaničkoj hiperalgeziji šape pacova, s obzirom da ARL-17477 i SMT blokiraju pronociceptivni efekt magnezijum-sulfata. NO aktivira gvanilatnu ciklazu koja je direktno odgovorna za povećanu intracelularnu proizvodnju cGMP (Esplugues, 2002). Značajno smanjenje mehaničke hiperalgije, u našim eksperimentima, sa metilenskim plavim, inhibitorom gvanilatne ciklaze, sugerise da cGMP doprinosi lokalnom perifernom pronociceptivnom efektu magnezijum-sulfata. Prema našim saznanjima, mi smo prvi ispitali učešće neuralnog i inducibilnog oblika NOS, kao i cGMP u perifernom pronociceptivnom efektu magnezijum-sulfata. Naši rezultati upućuju da na periferiji, glutamat i NO imaju važnu ulogu u nastanku lokalnog perifernog bola.

U našim eksperimentima, **diklofenak**, neselektivni inhibitor COX, lokalno periferno i na dozno-zavisan način smanjuje mehaničku hiperalgeziju izazvanu injekcijom izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata u šapu pacova. Uz hiperalgeziju prisutan je i blagi lokalni eritem, a odsutan edem šape. S obzirom na odsustvo drugih znakova inflamacije na šapi, ispitali smo da li su osim inhibicije COX mogući i drugi mehanizmi dejstva diklofenaka.

Dobro je poznato da u terapiji bola i inflamacije svi NSAIL inhibiraju COX i na taj način smanjuju proizvodnju prostaglandina. Međutim, poznato je da diklofenak ima i druga dejstva, nezavisna od inhibicije COX. COX-nezavisni mehanizmi uključuju interakciju diklofenaka sa jonskim kanalima, uključivanje u put sekundarnih glasnika, promene u ekspresiji jonskih kanala ili sinergističke/antagonističke interakcije sa drugim modulatorima jonskih kanala. Diklofenak ima modulatorno dejstvo na jonske kanale, neke aktivira, a neke blokira. On deluje na voltažno-zavisne Na^+ , Ca^{2+} ili K^+ kanale, ligand zavisne K^+ kanale, TRP kanale, kao i Cl^- kanale (Gwanyanya i sar., 2012). Analgetičko dejstvo diklofenak ostvaruje i blokadom jonskih kanala osetljivih na kiselinu (ASIC) (Jones i sar., 2004). Diklofenak lokalno periferno aktivira ATP zavisne kalijumske kanale i smanjuje formalinom izazvan bol (Ortiz i sar., 2001). Kada je u pitanju TRPV1 receptor, većina rezultata pokazuje da diklofenak nema dejstvo na ove receptore (Jones i sar., 2004), mada postoje podaci da diklofenak blokira TRPV1 receptore. Intraperitonealno primenjen diklofenak smanjuje bol u šapi izazvan kapsaicinom (Santos i sar., 1998). Pokazano je i da diklofenak aktivira TRPA1 kanale (Hu i sar., 2010). Takođe, pokazano je da prostaglandini direktnom aktivacijom TRPA1 kanala dovode do nastanka bola (Taylor-Clark i sar., 2008). Neke studije sugerišu da diklofenak preko endogenog opioidnog sistema u mozgu ostvaruje analgetičko dejstvo (Björkman, 1995). Diklofenak blokadom NMDA, ali ne i AMPA receptora i posledično smanjenom produkcijom NO-a u kičmenoj moždini smanjuje bol nakon intratekalne primene glutamata (Björkman, 1995).

U našem istraživanju u posebnim grupama pacova rađen je test nociceptivnog bolnog ponašanja, jer je za pomenute agoniste karakterističan nadražajni bol. Diklofenak

smanjuje bol u šapi izazvan sirćetnom kiselinom, AITC-om, ali ne i kapsaicinom. Međutim, kako ovi agonisti, sem sirćetne kiseline, izazivaju bol samo neposredno nakon primene, u prvih 5-10 minuta, testiranje mehaničke hiperalgezije nije moglo biti narušeno.

U posebnim eksperimentima smo pokazali da lokalno periferno diklofenak u šapi pacova smanjuje mehaničku hiperalgeziju izazvanu sirćetnom kiselinom i AITC-om, ali ne i kapsaicinom (osim u 6 h, poslednjoj tački merenja). S obzirom da se radi o selektivnim agonistima ASIC, TRPA1 i TRPV1 kanala, respektivno, iz ovoga sledi da blokadom ASIC i TRPA1 kanala, ali ne i TRPV1, na lokalnom perifernom nivou diklofenak ispoljava lokalno analgetičko dejstvo. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, kao i podacima da NSAIL ne deluju na TRPV1 receptore. Mi smo analgetički efekt diklofenaka dobili samo u 6. satu praćenja bola izazvanog kapsaicinom, a tada je najverovatnije došlo do uključivanja COX ili drugih zajedničkih mehanizama dejstva. Kako antagonisti ASIC, TRPA1 i TRPV1 receptora smanjuju mehaničku hiperalgeziju izazvanu magnezijum-sulfatom, i kako diklofenak smanjuje bolno ponašanje izazvano agonistima ASIC i TRPA1 (ali ne i TRPV1 receptora) odmah nakon njihove primene, vrlo je verovatno da diklofenak smanjuje pronociceptivno dejstvo magnezijum-sulfata direktnom inhibicijom ASIC i TRPA1, ali ne i TRPV1 receptora.

Za sada ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je COX uključena u pronociceptivni efekt magnezijum-sulfata. U prilog tome ide i naš rezultat da sem blage hiperemije na mestu injekcije magnezijum-sulfata, nije bilo drugih znakova zapaljenja. U sledećim eksperimentima trebalo bi ispitati da li u šapi pacova nakon supkutane injekcije izotoničnog rastvora magnezijum-sulfata dolazi i do promena u ekspresiji i aktivnosti COX.

6. ZAKLJUČCI

1. Magnezijum-sulfat i dizocilpin smanjuju mehaničku hiperalgeziju u modelu somatskog inflamatornog bola kod pacova. Efekt magnezijum-sulfata nastaje nakon sistemske, ali ne i nakon lokalne periferne primene. Efekt nije dozno-zavisan; u manjoj dozi (5 mg/kg) magnezijum-sulfat izaziva veći analgetički efekt nego u većoj dozi (15 i 30 mg/kg). Analgetički efekt dizocilpina je dozno-zavisan i javlja se i nakon sistemske primene kada je veći (40-80%) i nakon lokalne periferne primene kada je manji (20-35%). Sistemski primenjen magnezijum-sulfat ima i preventivno (primenjen u pretretmanu) i terapijsko (primenjen u tretmanu) dejstvo. Somatski inflamatorni bol magnezijum-sulfatom smanjen je za oko 25-75% u pretretmanu i za oko 25-50% u tretmanu.
2. Magnezijum-sulfat i dizocilpin smanjuju edem koji nastaje usled zapaljenja. Antiedematozni efekt dizocilpina nastaje samo nakon sistemske primene, dok isti efekt magnezijum-sulfata nastaje i nakon sistemske i nakon lokalne periferne primene. Efekt magnezijum-sulfata nije, dok dizocilpina jeste dozno-zavisan. U manjoj dozi (5 mg/kg) magnezijum-sulfat ima profilaktičko dejstvo na inflamatorni edem, a u većoj dozi (30 mg/kg) postiže terapijsko dejstvo. Sistemski antiedematozni efekt je izraženiji kada se magnezijum-sulfat primeni u vreme maksimalno razvijenog zapaljenja (30-55%), nego kada se primeni pre nastanka zapaljenja (oko 30%). Sistemski antiedematozni efekt dizocilpina iznosi oko 45%.
3. Selektivni inhibitori NOS na dozno-zavisan način menjaju sistemski analgetički i antiedematozni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina tokom somatske inflamacije, što ukazuje da NO ima modulatorno dejstvo na efekte magnezijum-sulfata i dizocilpina. Njihovo dejstvo preko NO-a zavisi od količine i uslova pod kojima je NO sintetisan.
4. Magnezijum-sulfat i dizocilpin ispoljavaju antinociceptivno dejstvo u visceralnom inflamatornom bolu u dozama koje ne izazivaju poremećaj motorne koordinacije pacova. Analgetički efekt magnezijum-sulfata u visceralnom bolu nije dozno-zavisan; u manjim dozama (1-15 mg/kg) smanjuje bol za 50-80%, a u većim dozama ne deluje na bol. Efekt dizocilpina je zavisan od doze i iznosi oko 30-80%. U

analgetičkom dejstvu magnezijum-sulfata i dizocilpina u visceralnom bolu ne učestvuje NO sistem. Međutim, cGMP i ATP-senzitivni K⁺ kanali čija aktivacija nije zavisna od NO-a učestvuju u mehanizmu analgetičkog dejstva dizocilpina, ali ne i magnezijum-sulfata.

5. Dok supkutana injekcija dizocilpina u zdravo tkivo ne izaziva bol, injekcija magnezijum-sulfata izaziva mehaničku hiperalgezu koja traje nekoliko sati i praćena je blagim eritemom, bez pojave edema. Pronociceptivni efekt magnezijum-sulfata je dozno-zavisan, lokalne prirode i bez prisustva sekundarne hiperalgezije.
6. U našim istraživanjima prvi put ispitana je uloga TRPA1, TRPV1, TRPV4 i ASIC kanala u bolu izazvanom rastvorom magnezijum-sulfata. Pokazano je da u mehanizmu pronociceptivnog dejstva izotoničnog pH nepodešenog rastvora (pH~6) magnezijum-sulfata učestvuju TRPA1, TRPV1, TRPV4 i ASIC kanali. Međutim, izotonični pH neutralni rastvor magnezijum-sulfata dovodi do lokalne mehaničke hiperalgezije u kojoj učestvuju TRPA1, TRPV1 i TRPV4 kanali, ali ne i ASIC kanali. TRPV1 kanali se isto aktiviraju, TRPV4 kanali se aktiviraju slabije, a TRPA1 kanali se aktiviraju kasnije u odnosu na pH nepodešene uslove.
7. Magnezijum-sulfat lokalno izaziva bol preko oslobađanja glutamata, aktivacije perifernih NMDA receptora i stvaranja NO-a i cGMP-a.
8. Lokalni somatski bol izazvan magnezijum-sulfatom smanjuje diklofenak, neselektivni inhibitor COX, što bi moglo da sugeriše da ovaj bol nastaje i zbog inflamacije i stvaranja prostaglandina. Međutim, kako lokalno na mestu primene magnezijum-sulfata nema drugih znakova zapaljenja i kako smo pokazali da diklofenak redukuje bol izazvan selektivnim TRPA1 i ASIC agonistima neposredno nakon njihove primene, moguć je da diklofenak, osim inhibicije COX, ispoljava i COX-nezavisni mehanizam dejstva blokadom TRPA1 i ASIC kanala.

7. LITERATURA

1. Abacioğlu N, Tunçtan B, Akbulut E, Cakici I. Participation of the components of L-arginine/nitric oxide/cGMP cascade by chemically-induced abdominal constriction in the mouse. *Life Sci.* 2000;67(10):1127-37.
2. Agarwal A, Dhiraj S, Raza M, Pandey R, Pandey CK, Singh PK, Singh U, Gupta D. Vein pretreatment with magnesium sulfate to prevent pain on injection of propofol is not justified. *Can J Anaesth.* 2004;51(2):130-3.
3. Alessandri-Haber N, Dina OA, Yeh JJ, Parada CA, Reichling DB, Levine JD. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *J Neurosci.* 2004;24(18):4444-52. Erratum in: *J Neurosci.* 2004;24(23):5457.
4. Alfaro Martinez JJ, Botella Romero F, Lamas Oliveira C, Hernández López A. Severe hypocalcemia secondary to hypomagnesaemia, successfully treated by self-administered subcutaneous magnesium. *Nutrición Hospitalaria* 2009;24:354-356.
5. Al-Mamun Mst, Hajera khatun Md, Rafikul Islam, Laizuman Nahar K, M Shams-ud-doha, Farhana Alam Ripa. Evaluation of CNS depressant and analgesic activities of methanol extract of *Piper longum* Linn. Leaves. *IJPSR* 2011;2(11):2874-9.
6. Almozni-Sarafian D, Berman S, Mor A, Shteinshnaider M, Gorelik O, Tzur I, Alon I, Modai D, Cohen N. Magnesium and C-reactive protein in heart failure: an anti-inflammatory effect of magnesium administration? *Eur J Nutr.* 2007;46(4):230-7.
7. Alves D, Duarte I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. *Eur J Pharmacol.* 2002;444(1-2):47-52.
8. Amr YM. Multi-day low dose ketamine infusion as adjuvant to oral gabapentin in spinal cord injury related chronic pain: a prospective, randomized, double blind trial. *Pain Physician.* 2010;13(3):245-9.
9. Andreasen JT, Bach A, Gynther M, Nasser A, Mogensen J, Strømgaard K, Pickering DS. UCCB01-125, a dimeric inhibitor of PSD-95, reduces

- inflammatory pain without disrupting cognitive or motor performance: comparison with the NMDA receptor antagonist dizocilpine. *Neuropharmacology*. 2013;67:193-200.
10. Asghar AU, Hasan SS, King AE. Actions of the anticonvulsant remacemide metabolite AR-R12495AA on afferent-evoked spinal synaptic transmission in vitro and on models of acute and chronic inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(3):876-83.
 11. Assi AA. The influence of divalent cations on the analgesic effect of opioid and non-opioid drugs. *Pharmacol Res*. 2001;43(6):521-9.
 12. Azari P, Lindsay DR, Briones D, Clarke C, Buchheit T, Pyati S. Efficacy and safety of ketamine in patients with complex regional pain syndrome: a systematic review. *CNS Drugs*. 2012;26(3):215-28.
 13. Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Hwang SW. Nociceptive and pro-inflammatory effects of dimethylallyl pyrophosphate via TRPV4 activation. *Br J Pharmacol*. 2012;166(4):1433-43.
 14. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(34):12248-52.
 15. Begon S, Pickering G, Eschalier A, Dubray C. Magnesium and MK-801 have a similar effect in two experimental models of neuropathic pain. *Brain Res*. 2000;887(2):436-9.
 16. Begon S, Pickering G, Eschalier A, Dubray C. Magnesium increases morphine analgesic effect in different experimental models of pain. *Anesthesiology*. 2002b;96(3):627-32.
 17. Beirith A, Santos AR, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res*. 2002;924(2):219-28.
 18. Bell RF, Dahl JB, Moore RA, Kalso EA. Perioperative ketamine for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;7:CD004603.
 19. Bennett GJ. Animal models of pain. In: Kruger L, ed. *Methods in Pain Research*. Boca Raton: CRC Press, 2001, 67–91.

20. Berrino L, Oliva P, Massimo F, Aurilio C, Maione S, Grella A, Rossi F. Antinociceptive effect in mice of intraperitoneal N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in the formalin test. *Eur J Pain*. 2003;7(2):131-7.
21. Berry PH, Convington EC, Dahl JL, Katz JA, Miaskowski C. Pain: Current understanding of assessment management and treatments. Glenview: American Pain Society, 2006.
22. Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, Yeats JC. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol*. 1992;107(2):544-52.
23. Bigal ME, Bordini CA, Tepper SJ, Speciali JG. Intravenous magnesium sulphate in the acute treatment of migraine without aura and migraine with aura. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Cephalalgia*. 2002;22(5):345-53.
24. Björkman R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1995;103:1-44.
25. Blackshaw LA. Transient receptor potential cation channels in visceral sensory pathways. *Br J Pharmacol*. 2014;171(10):2528-36.
26. Boettger MK, Uceyler N, Zelenka M, Schmitt A, Reif A, Chen Y, Sommer C. Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice. *Eur J Pain*. 2007;11(7):810-8.
27. Borazan H, Kececioglu A, Okesli S, Otelcioglu, S.. Oral magnesium lozenge reduces postoperative sore throat: a randomized, prospective, placebo-controlled study. *Anesthesiology* 2012; 117:512-8.
28. Boron, Walter F.; Boulpaep, Emile L., editors. Medical physiology: a cellular and molecular approach. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2009.
29. Boultsadakis A, Pitsikas N. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on recognition and spatial memory deficits produced by different NMDA receptor antagonists in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(12):2357-66.
30. Boyce S, Wyatt A, Webb JK, O'Donnell R, Mason G, Rigby M, Sirinathsinghji D, Hill RG, Rupniak NM. Selective NMDA NR2B antagonists induce

- antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology*. 1999;38(5):611-23.
31. Bredlau AL, Thakur R, Korones DN, Dworkin RH. Ketamine for pain in adults and children with cancer: a systematic review and synthesis of the literature. *PainMed*. 2013;14(10):1505-17.
 32. Bulutcu F, Dogrul A, Güç MO. The involvement of nitric oxide in the analgesic effects of ketamine. *Life Sci*. 2002;71(7):841-53.
 33. Burns GA, Stephens KE, Benson JA. Expression of mRNA for the N-methyl-D aspartate (NMDAR1) receptor by the enteric neurons of the rat. *Neurosci Lett*. 1994;170(1):87-90.
 34. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(10):766-75.
 35. Carey RJ, Dai H, Gui J. Effects of MK-801 (dizocilpine) on motor activity and memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998;137(3):241-6.
 36. Carlsson KC, Hoem NO, Moberg ER, Mathisen LC. Analgesic effect of dextromethorphan in neuropathic pain. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004;48(3):328-36.
 37. Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neurosci Lett* 1995; 197: 25-8.
 38. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-24.
 39. Cavalcante AL, Siqueira RM, Araujo JC, Gondim DV, Ribeiro RA, Quetz JS, Havt A, Lima AA, Vale ML. Role of NMDA receptors in the trigeminal pathway, and the modulatory effect of magnesium in a model of rat temporomandibular joint arthritis. *Eur J Oral Sci*. 2013;121(6):573-83.
 40. Cervero F. Visceral nociception: peripheral and central aspects of visceral nociceptive systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985;308(1136):325-37.

41. Chang JJ, Mack WJ, Saver JL, Sanossian N. Magnesium: potential roles in neurovascular disease. *Front Neurol.* 2014;5:52.
42. Charrua A, Cruz CD, Cruz F, Avelino A. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 is essential for the generation of noxious bladder input and bladder overactivity in cystitis. *J Urol.* 2007;177(4):1537-41.
43. Charrua A, Cruz CD, Jansen D, Rozenberg B, Heesakkers J, Cruz F. Co-administration of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and TRPV1 antagonists potentiate the effect of each drug in a rat model of cystitis. *BJU Int.* 2015;115(3):452-60.
44. Chattopadhyay M, Velazquez CA, Pruski A, Nia KV, Abdellatif KR, Keefer LK, Kashfi K. Comparison between 3-Nitrooxyphenyl acetylsalicylate (NO-ASA) and O2-(acetylsalicyloxymethyl)-1-(pyrrolidin-1-yl)diazene-1-ium-1,2-diolate (NONO-ASA) as safe anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, antioxidant prodrugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;335(2):443-50.
45. Chen Y, Yang C, Wang ZJ. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience.* 2011;193:440-51.
46. Chen Z, Muscoli C, Doyle T, Bryant L, Cuzzocrea S, Mollace V, Mastroianni R, Masini E, Salvemini D. NMDA-receptor activation and nitroxidative regulation of the glutamatergic pathway during nociceptive processing. *Pain.* 2010;149(1):100-6.
47. Chéramy A, Desce JM, Godeheu G, Glowinski J. Presynaptic control of dopamine synthesis and release by excitatory amino acids in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int.* 1994;25(2):145-54.
48. Chizh BA, Reissmüller E, Schlütz H, Scheede M, Haase G, Englberger W. Supraspinal vs spinal sites of the antinociceptive action of the subtype-selective NMDA antagonist ifenprodil. *Neuropharmacology.* 2001;40(2):212-20.
49. Chi XX, Jiang X, Nicol GD. ATP-sensitive potassium currents reduce the PGE2-mediated enhancement of excitability in adult rat sensory neurons. *Brain Res.* 2007;1145:28-40.

50. Chu YC, Guan Y, Skinner J, Raja SN, Johns RA, Tao YX. Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. *Pain*. 2005;119(1-3):113-23.
51. Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J Pharmacol Chemother*. 1968;32(2):295-310.
52. Cruikshank DP, Varner MW, Pitkin RM. Breast milk magnesium and calcium concentrations following magnesium sulfate treatment. *Am J Obstet Gynecol*. 1982;143(6):685-8.
53. da Costa DS, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain*. 2010;148(3):431-7.
54. de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease. *Clin Kidney J*. 2012 Feb;5(Suppl1):i15-i24.
55. Dasgupta A, Sarma D, Saikia UK. Hypomagnesemia in type 2 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(6):1000-3.
56. Davidson EM, Coggeshall RE, Carlton SM. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport*. 1997;8(4):941-6.
57. Davies SN, Martin D, Millar JD, Aram JA, Church J, Lodge D. Differences in results from in vivo and in vitro studies on the use-dependency of N - methylaspartate antagonism by MK-801 and other phencyclidine receptor ligands. *Eur J Pharmacol*. 1988;145(2):141-51.
58. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 2000;405(6783):183-7.
59. Daw NW, Stein PS, Fox K. The role of NMDA receptors in information processing. *Annu Rev Neurosci*. 1993;16:207-22.

60. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(14):6368-71.
61. De Alba J, Clayton NM, Collins SD, Colthup P, Chessell I, Knowles RG. GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. 2006;120(1-2):170-81.
62. Decollogne S, Tomas A, Lecerf C, Adamowicz E, Seman M. NMDA receptor complex blockade by oral administration of magnesium: comparison with MK-801. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997;58(1):261-8.
63. deGroot J, Zhou S, Carlton SM. Peripheral glutamate release in the hindpaw following low and high intensity sciatic stimulation. *Neuroreport*. 2000;11(3):497-502.
64. Denadai-Souza A, Martin L, de Paula MA, de Avellar MC, Muscará MN, Vergnolle N, Cenac N. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation. *Arthritis Rheum* 2012; 64:1848–1858.
65. Denadai-Souza A, Martin L, de Paula MA, de Avellar MC, Muscará MN, Vergnolle N, Cenac N. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1848-58.
66. Deraedt R, Jouquey S, Delevallée F, Flahaut M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *Eur J Pharmacol*. 1980;61(1):17-24.
67. Deval E, Noël J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V, Jodar M, Lazdunski M, Lingueglia E. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J*. 2008;27(22):3047-55.
68. Dhir A, Kulkarni SK. Possible involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant-like effect of MK-801 (dizocilpine), a NMDA receptor antagonist in mouse forced swim test. *Indian J Exp Biol*. 2008;46(3):164-70.
69. Dolan S, Field LC, Nolan AM. The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation. *Pain*. 2000;86(3):311-20.

70. Dravid SM, Erreger K, Yuan H, Nicholson K, Le P, Lyuboslavsky P, Almonte A, Murray E, Mosely C, Barber J, French A, Balster R, Murray TF, Traynelis SF. Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *J Physiol.* 2007;581(Pt 1):107-28.
71. Drugs.com
72. Du J, Zhou S, Coggeshall RE, Carlton SM. N-methyl-D-aspartate-induced excitation and sensitization of normal and inflamed nociceptors. *Neuroscience.* 2003;118(2):547-62.
73. Duarte ID, Ferreira SH. L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. *Mediators Inflamm.* 2000;9(1):25-30.
74. Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, Henze DA, Kane SA, Urban MO. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain* 2008; 4:48.
75. Eide K, Stubhaug A, Oye I, Breivik H. Continuous subcutaneous administration of the N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonist ketamine in the treatment of post-herpetic neuralgia. *Pain.* 1995;61(2):221-8.
76. Engel MA, Leffler A, Niedermirtl F, Babes A, Zimmermann K, Filipović MR, Izydorczyk I, Eberhardt M, Kichko TI, Mueller-Tribbensee SM, Khalil M, Siklosi N, Nau C, Ivanović-Burmazović I, Neuhuber WL, Becker C, Neurath MF, Reeh PW. TRPA1 and substance P mediate colitis in mice. *Gastroenterology.* 2011;141(4):1346-58.
77. Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol.* 2002;135(5):1079-95.
78. Fawcett WJ, Haxby EJ, Male DA. Magnesium: physiology and pharmacology. *Br J Anaesth* 1999; 83:302-20.
79. Fichna J, Mokrowiecka A, Cygankiewicz AI, Zakrzewski PK, Małecka-Panas E, Janecka A, Krajewska WM, Storr MA. Transient receptor potential vanilloid 4 blockade protects against experimental colitis in mice: a new strategy for inflammatory bowel diseases treatment? *Neurogastroenterol Motil.* 2012;24(11):e557-60.

80. Fitzgibbon EJ, Hall P, Schroder C, Seely J, Viola R. Low dose ketamine as an analgesic adjuvant in difficult pain syndromes: a strategy for conversion from parenteral to oral ketamine. *J Pain Symptom Manage*. 2002;23(2):165-70.
81. Freire MA, Guimarães JS, Leal WG, Pereira A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Front Neurosci*. 2009;3(2):175-81.
82. Freire MA. Pathophysiology of neurodegeneration following traumatic brain injury. *West Indian Med J*. 2012;61(7):751-5.
83. Galdino GS, Cortes SF, Duarte ID, Perez AC. Involvement of the nitric oxide/(C)GMP/K(ATP) pathway in antinociception induced by exercise in rats. *Life Sci*. 2010;86(13-14):505-9.
84. Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. *Eur J Pharmacol*. 1992;213(3):449-51.
85. Garrido-Suárez BB, Garrido G, Márquez L, Martínez I, Hernández I, Merino N, Luque Y, Delgado R, Bosch F. Pre-emptive anti-hyperalgesic effect of electroacupuncture in carrageenan-induced inflammation: role of nitric oxide. *Brain Res Bull*. 2009;79(6):339-44.
86. Gaul C, Diener HC, Danesch U; Migravent® Study Group. Improvement of migraine symptoms with a proprietary supplement containing riboflavin, magnesium and Q10: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter trial. *J Headache Pain*. 2015;16:516.
87. Getova DP, Doncheva ND. Effects of ketamine on memory and nociception in rats. *Folia Med (Plovdiv)*. 2011;53(1):53-9.
88. Giamberardino MA. Recent and forgotten aspects of visceral pain. *Eur J Pain* 1999; 3: 77-92.
89. Giraldelo CM, Zappellini A, Muscará MN, De Luca IM, Hyslop S, Cirino G, Zatz R, De Nucci G, Antunes E. Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation in vitro. *Eur J Pharmacol*. 1994;257(1-2):87-93.
90. Gong N, Gao ZY, Wang YC, Li XY, Huang JL, Hashimoto K, Wang YX. A series of D-amino acid oxidase inhibitors specifically prevents and reverses formalin-induced tonic pain in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;336(1):282-93.

91. Grace MS, Baxter M, Dubuis E, Birrell MA, Belvisi MG. Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. *Br J Pharmacol*. 2014;171(10):2593-607.
92. Granados-Soto V, Rufino MO, Gomes Lopes LD, Ferreira SH. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol*. 1997;340(2-3):177-80.
93. Gröber U, Schmidt J, Kisters K. Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients*. 2015;7(9):8199-226.
94. Guo BL, Lin Y, Hu W, Zhen CX, Bao-Cheng Z, Wu HH, Kaye AD, Duan JH, Qu Y. Effects of Systemic Magnesium on Post-operative Analgesia: Is the Current Evidence Strong Enough? *Pain Physician*. 2015;18(5):405-17.
95. Gwanyanya A, Macianskiene R, Mubagwa K. Insights into the effects of diclofenac and other non-steroidal anti-inflammatory agents on ion channels. *J Pharm Pharmacol*. 2012;64(10):1359-75.
96. Gyires K, Torma Z. The use of the writhing test in mice for screening different types of analgesics. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1984;267(1):131-40.
97. Haley JE. Gases as neurotransmitters. *Essays Biochem*. 1998;33:79-91.
98. Hama A, Woon Lee J, Sagen J. Differential efficacy of intrathecal NMDA receptor antagonists on inflammatory mechanical and thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 2003;459(1):49-58.
99. Hamza M, Wang XM, Wu T, Brahim JS, Rowan JS, Dionne RA. Nitric oxide is negatively correlated to pain during acute inflammation. *Mol Pain*. 2010;6:55.
100. Handy RL, Moore PK. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. *Br J Pharmacol*. 1998;123(6):1119-26.
101. Hao JX, Xu XJ. Treatment of a chronic allodynia-like response in spinally injured rats: effects of systemically administered nitric oxide synthase inhibitors. *Pain*. 1996;66(2-3):313-9.
102. Herroeder S, Schönherr ME, De Hert SG, Hollmann MW. Magnesium--essentials for anesthesiologists. *Anesthesiology* 2011; 114: 971-93.

103. Holtman JR Jr, Crooks PA, Johnson-Hardy J, Wala EP. Interaction between morphine and norketamine enantiomers in rodent models of nociception. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2008; 90: 769-77.
104. Horning MS, Trombley PQ. Zinc and copper influence excitability of rat olfactory bulb neurons by multiple mechanisms. *J Neurophysiol.* 2001;86(4):1652-60.
105. Hu H, Bandell M, Petrus MJ, Zhu MX, Patapoutian A. Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol.* 2009;5(3):183-90.
106. Hu H, Tian J, Zhu Y, Wang C, Xiao R, Herz JM, Wood JD, Zhu MX. Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pflugers Arch.* 2010;459(4):579-92.
107. Hugel V, Lauchart M, Magerl W, Schelling G, Beyer A, Thieme D, Azad SC. Effects of low-dose intranasal (S)-ketamine in patients with neuropathic pain. *Eur J Pain.* 2010;14(4):387-94.
108. Hughes SR, Williams TJ, Brain SD. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. *Eur J Pharmacol.* 1990;191(3):481-4.
109. Im DS, Jeon JW, Lee JS, Won SJ, Cho SI, Lee YB, Gwag BJ. Role of the NMDA receptor and iron on free radical production and brain damage following transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 2012;1455:114-23.
110. Infante C, Díaz M, Hernández A, Constandil L, Pelissier T. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the dorsal horn of monoarthritic rats: effects of competitive and uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonists. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(3):R53.
111. Iseri LT, French JH. Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. *Am Heart J.* 1984;108(1):188-93.
112. Ishizaki K, Sasaki M, Karasawa S, Obata H, Nara T, Goto F. The effect of intrathecal magnesium sulphate on nociception in rat acute pain models. *Anaesthesia* 1999;54(3):241-6.
113. Jackson DL, Graff CB, Richardson JD, Hargreaves KM. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.* 1995;284(3):321-5.

114. Jahangiri L, Kesmati M, Najafzadeh H. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory effect of nanoparticles of magnesium oxide in mice with and without ketamine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(20):2706-10.
115. Jahnen-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *Clin Kidney J*. 2012; 5(Suppl 1):i3-i14.
116. Jellish WS, Zhang X, Langen KE, Spector MS, Scalfani MT. Intrathecal magnesium sulphate administration at the time of experimental ischemia improves neurological functioning by reducing acute and delayed loss of motor neurons in the spinal cord. *Anesthesiology* 2008; 108:78-86.
117. Jeong S, Lee SH, Kim YO, Yoon MH. Antinociceptive effects of amiloride and benamil in neuropathic pain model rats. *J Korean Med Sci* 2013; 28:1238-1243.
118. Jesse CR, Savegnago L, Nogueira CW. Role of nitric oxide/cyclic GMP/K(+) channel pathways in the antinociceptive effect caused by 2,3-bis(mesitylseleno)propenol. *Life Sci*. 2007;81(25-26):1694-702.
119. Jones NG, Slater R, Cadiou H, McNaughton P, McMahon SB. Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci*. 2004;24(48):10974-9.
120. Karaaslan D, Arslan G. The role of nitric oxide on the potentiating effect of magnesium on morphine analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005;49(1):129.
121. Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(4):1273-8.
122. Kawabata A, Manabe S, Manabe Y, Takagi H. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. *Br J Pharmacol*. 1994;112(2):547-50.
123. Kawamata T, Omote K, Sonoda H, Kawamata M, Namiki A. Analgesic mechanisms of ketamine in the presence and absence of peripheral inflammation. *Anesthesiology*. 2000;93(2):520-8.
124. Kawamata T, Omote K. Activation of spinal N-methyl-D-aspartate receptors stimulates a nitric oxide/cyclic guanosine 3,5-monophosphate/glutamate release cascade in nociceptive signaling. *Anesthesiology* 1999; 91(5):1415-24.

- 125.Kisters, K. What is the correct magnesium supplement? *Magnes. Res.* 2013, 26, 41–42.
- 126.Klafke JZ, da Silva MA, Trevisan G, Rossato MF, da Silva CR, Guerra GP, Villarinho JG, Rigo FK, Dalmolin GD, Gomez MV, Rubin MA, Ferreira J. Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. *Neuroscience.* 2012;222:136-46.
- 127.Koeberle A, Rossi A, Bauer J, Dehm F, Verotta L, Northoff H, Sautebin L, Werz O. Hyperforin, an Anti-Inflammatory Constituent from St. John's Wort, Inhibits Microsomal Prostaglandin E(2) Synthase-1 and Suppresses Prostaglandin E(2) Formation in vivo. *Front Pharmacol.* 2011;2:7.
- 128.Koltka K, Koknel-Talu G, Asik M, Ozyalcin S. Comparison of efficacy of intraarticular application of magnesium, levobupivacaine and lornoxicam with placebo in arthroscopic surgery. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(11):1884-9.
- 129.Koster R, Anderson M, De Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc.* 1958; 18:412–17.
- 130.Kosugi M, Nakatsuka T, Fujita T, Kuroda Y, Kumamoto E. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 2007;27(16):4443-51.
- 131.Kuduk SD, Di Marco CN, Chang RK, Dipardo RM, Cook SP, Cato MJ, Jovanovska A, Urban MO, Leidl M, Spencer RH, Kane SA, Bilodeau MT, Hartman GD, Bock MG. Amiloride derived inhibitors of acid-sensing ion channel-3 (ASIC3). *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19(9):2514-8.
- 132.Kumar R, Clermont G, Vodovotz Y, Chow CC. The dynamics of acute inflammation. *J Theor Biol.* 2004;230(2):145-55.
- 133.Kwak JY, Jung JY, Hwang SW, Lee WT, Oh U. A capsaicin-receptor antagonist, capsazepine, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance. *Neuroscience.* 1998;86(2):619-26.
- 134.Lai CC, Kuo TI, Lin HH. The role of protein kinase A in acute ethanol-induced neurobehavioral actions in rats. *Anesth Analg.* 2007;105(1):89-96.

- 135.Larson AA, Kovacs KJ, Cooper JC, Kitto KF. Transient changes in the synthesis of nitric oxide result in long-term as well as short-term changes in acetic acid-induced writhing in mice. *Pain*. 2000;86(1-2):103-11.
- 136.Lawand NB, McNearney T, Westlund KN. Amino acid release into the knee joint: key role in nociception and inflammation. *Pain*. 2000;86(1-2):69-74.
- 137.Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V. Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K(+) channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol*. 2001;426(1-2):39-44.
- 138.Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*. 2001;53(4):597-652.
- 139.Lee CH, Wen ZH, Chang YC, Huang SY, Tang CC, Chen WF, Hsieh SP, Hsieh CS, Jean YH. Intra-articular magnesium sulfate (MgSO₄) reduces experimental osteoarthritis and nociception: association with attenuation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 1 phosphorylation and apoptosis in rat chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(11):1485-93.
- 140.Lennertz RC, Kossyrev EA, Smith AK, Stucky CL. TRPA1 mediates mechanical sensitization in nociceptors during inflammation. *PLoS One*. 2012;7(8):e43597.
- 141.Li J, McRoberts JA, Nie J, Ennes HS, Mayer EA. Electrophysiological characterization of N-methyl-D-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia neurons. *Pain*. 2004;109(3):443-52.
- 142.Lieben L, Carmeliet G. The Involvement of TRP Channels in Bone Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:99.
- 143.Lin JY, Chung SY, Lin MC, Cheng FC. Effects of magnesium sulfate on energy metabolites and glutamate in the cortex during focal cerebral ischemia and reperfusion in the gerbil monitored by a dual-probe microdialysis technique. *Life Sci*. 2002;71(7):803-11.
- 144.Long S, Romani AM. Role of Cellular Magnesium in Human Diseases. *Austin J Nutr Food Sci*. 2014;2(10). pii: 1051.
- 145.Ludbrook GL, James MF, Upton RN. The effect of magnesium sulfate on cerebral blood flow velocity, cardiovascular variables, and arterial carbon dioxide tension in awake sheep. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1999;11(2):96-101.

146. Lysakowski C, Dumont L, Czarnetzki C, Tramèr MR. Magnesium as an adjuvant to postoperative analgesia: a systematic review of randomized trials. *Anesth Analg* 2007; 104:1532-9.
147. Mamet J, Baron A, Lazdunski M, Voilley N. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J Neurosci.* 2002;22(24):10662-70.
148. Marchand S. Applied Pain Neurophysiology. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson AH, eds. *Pharmacology of Pain*. Seattle: IASP Press, 2010: 3-27.
149. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Chain B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. *Eur J Immunol.* 1995;25(4):947-51.
150. Martínez-Riquelme A, Rawlings J, Morley S, Kendall J, Hosking D, Allison S. Self-administered subcutaneous fluid infusion at home in the management of fluid depletion and hypomagnesaemia in gastro-intestinal disease. *Clin Nutr.* 2005;24(1):158-63.
151. Mauskop A, Altura BM. Role of magnesium in the pathogenesis and treatment of migraines. *Clin Neurosci.* 1998;5(1):24-7.
152. Mazur A, Maier JA, Rock E, Gueux E, Nowacki W, Rayssiguier Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Arch Biochem Biophys.* 2007;458(1):48-56.
153. McIntyre P, McLatchie LM, Chambers A, Phillips E, Clarke M, Savidge J, Toms C, M, Shah K, Winter J, Weerasakera N, Webb M, Rang HP, Bevan S, James IF. Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br J Pharmacol.* 2001;132(5):1084-94.
154. McRoberts JA, Coutinho SV, Marvizón JC, Grady EF, Tognetto M, Sengupta JN, Ennes HS, Chaban VV, Amadesi S, Creminon C, Lanthorn T, Geppetti P, Bunnett NW, Mayer EA. Role of peripheral N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in visceral nociception in rats. *Gastroenterology.* 2001;120(7):1737-48.
155. Mense S, Hoheisel U. [A lack of NO in the spinal cord as a possible factor for the occurrence of spontaneous pain]. *Schmerz.* 2001;15(1):19-25.

- 156.Meotti FC, Coelho Idos S, Santos AR. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. *J Pain* 2010; 11:570–578.
- 157.Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol.* 1998;54(4):369-415.
- 158.Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002; 66: 355-474.
- 159.Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999; 57: 1-164.
- 160.Miller KE, Hoffman EM, Sutharshan M, Schechter R. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. *Pharmacol Ther.* 2011;130(3):283-309.
- 161.Milovanovic M, Vuckovic S, Prostran M, Jezdimirovic M, Cupic M. The effects of flunixin meglumine and L-NAME on the carrageenan-induced hyperalgesia in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009;105:62.
- 162.Mogil JS, Kest B, Sadowski B, Belknap JK. Differential genetic mediation of sensitivity to morphine in genetic models of opiate antinociception: influence of nociceptive assay. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;276(2):532-44.
- 163.Mohammad FK, Al-Baggou BKh, Naser AS. Antinociception by metoclopramide, ketamine and their combinations in mice. *Pharmacol Rep.* 2012;64(2):299-304.
- 164.Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev.* 2005;57(2):217-52.
- 165.Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.
- 166.Monteilh-Zoller MK., Hermosura MC., Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* 2003; 121:49-60.
- 167.Montrucchio DP, Córdova MM, Santos AR. Plant derived aporphinic alkaloid S-(+)-dicentrine induces antinociceptive effect in both acute and chronic

- inflammatory pain models: evidence for a role of TRPA1 channels. *PLoS One*. 2013;8(7):e67730.
168. Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol*. 1991;102(1):198-202.
 169. More AS, Kumari RR, Gupta G, Lingaraju MC, Balaganur V, Pathak NN, Kumar D, Kumar D, Sharma AK, Tandan SK. Effect of iNOS inhibitor S-methylisothiurea in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain: implication for osteoarthritis therapy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013;103(4):764-72.
 170. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol*. 2003;225:115-21.
 171. Mueller RA, Hunt R. Antagonism of ketamine-induced anesthesia by an inhibitor of nitric oxide synthesis: a pharmacokinetic explanation. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998;60(1):15-22.
 172. Na HS, Ryu JH, Do SH. The role of magnesium in pain. In: Vink R and Nechifor M (eds). *Magnesium in the central nervous system*. University of Adelaide Press, Adelaide, South Australia, 2011; pp 157-165.
 173. Nagai N, Fukuhata T, Ito Y, Tai H, Hataguchi Y, Nakagawa K. Preventive effect of water containing magnesium ion on paw edema in adjuvant-induced arthritis rat. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(10):1934-7.
 174. Nagai N, Ito Y, Tai H, Hataguchi Y, Nakagawa K. Effects of magnesium content in the feed on cataract development in Shumiya cataract rat. *J Oleo Sci*. 2006;56(1):29-33.
 175. National Institutes of Health: Office of Dietary Supplements. Office of Dietary Supplements; *Magnesium: Fact Sheet for Health Professionals*.
 176. Nechifor M. Magnesium involvement in pain. *Magnesium Research* 2011; 24:220-2.
 177. Nedeljković I. S, Kanjuh, Vukotić M. *Kardiologija, Medicinski fakultet Beograd - Beograd*, 1994.
 178. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*. 2011;12(3):218.

- 179.Ogden KK, Traynelis SF. New advances in NMDA receptor pharmacology. Trends Pharmacol Sci. 2011;32(12):726-33.
- 180.Okuda K, Sakurada C, Takahashi M, Yamada T, Sakurada T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. Pain. 2001;92(1-2):107-15.
- 181.Olney JW, Labruyere J, Price MT. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. Science. 1989;244(4910):1360-2.
- 182.O'Mahony D, Kendall MJ. Nitric oxide in acute ischaemic stroke: a target for neuroprotection. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1999;67(1):1-3.
- 183.Okano K, Kuraishi Y, Satoh M. Involvement of spinal substance P and excitatory amino acids in inflammatory hyperalgesia in rats. Jpn J Pharmacol. 1998;76(1):15-22.
- 184.Omote K, Hazama K, Kawamata T, Kawamata M, Nakayaka Y, Toriyabe M, Namiki A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. Brain Res. 2001;912(2):171-5.
- 185.Omote K, Kawamata T, Kawamata M, Namiki A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. Brain Res. 1998;787(1):161-4.
- 186.Odabasoglu F, Halici Z, Aygun H, Halici M, Atalay F, Cakir A, Cadirci E, Bayir Y, Suleyman H. α -Lipoic acid has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced acute and cotton pellet-induced chronic inflammations. Br J Nutr. 2011;105(1):31-43.
- 187.Ortiz MI, Castañeda-Hernández G, Rosas R, Vidal-Cantú GC, Granados-Soto V. Evidence for a new mechanism of action of diclofenac: activation of K⁺ channels. Proc West Pharmacol Soc. 2001;44:19-21.
- 188.Ortiz MI, Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G. The NO-cGMP-K⁺ channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. Pharmacol Biochem Behav. 2003;76(1):187-95.
- 189.Ortiz MI, Medina-Tato DA, Sarmiento-Heredia D, Palma-Martínez J, Granados-Soto V. Possible activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺

- channels pathway by gabapentin on the formalin test. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;83(3):420-7.
- 190.Ossipov MH. The perception and endogenous modulation of pain. *Scientifica* 2012; Article ID 561761.
 - 191.Parnas I, Parnas H. Control of neurotransmitter release: From Ca²⁺ to voltage dependent G-protein coupled receptors. *Pflugers Arch.* 2010;460(6):975-90.
 - 192.Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(1):55-68.
 - 193.Pathak D, Lopicic S, Stanojevic M, Nedeljkov A, Pavlovic D, Cemerikic D, Nedeljkov V. Ethanol and magnesium suppress nickel-induced bursting activity in leech Retzius nerve cells. *Gen Physiol Biophys* 2009;28:9–17.
 - 194.Payne JE Payne JE, Bonnefous C, Symons KT, Nguyen PM, Sablad M, Rozenkrants N, Zhang Y, Wang L, Yazdani N, Shiau AK, Noble SA, Rix P, Rao TS, Hassig CA, Smith ND. Discovery of dual inducible/neuronal nitric oxide synthase (iNOS/nNOS) inhibitor development candidate 4-((2-cyclobutyl-1H-imidazo[4,5-b]pyrazin-1-yl)methyl)-7,8-difluoroquinolin-2(1H)-one (KD7332) part 2: identification of a novel, potent, and selective series of benzimidazole-quinolinone iNOS/nNOS dimerization inhibitors that are orally active in pain models. *J Med Chem.* 2010;53(21):7739-55.
 - 195.Pereira LM, Lima-Júnior RC, Bem AX, Teixeira CG, Grassi LS, Medeiros RP, Marques-Neto RD, Callado RB, Aragão KS, Wong DV, Vale ML, Brito GA, Ribeiro RA. Blockade of TRPA1 with HC-030031 attenuates visceral nociception by a mechanism independent of inflammatory resident cells, nitric oxide and the opioid system. *Eur J Pain.* 2013;17(2):223-33.
 - 196.Perin-Martins A, Teixeira JM, Tambeli CH, Parada CA, Fischer L. Mechanisms underlying transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-mediated hyperalgesia and edema. *J Peripher Nerv Syst.* 2013;18(1):62-74.
 - 197.Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg.* 2003;97(4):1108-16.

198. Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain*. 2007;3:40.
199. Potenziere C, Brink TS, Simone DA. Excitation of cutaneous C nociceptors by intraplantar administration of anandamide. *Brain Res*. 2009;1268:38-47.
200. Prado WA, Schiavon VF, Cunha FQ. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002;441(1-2):57-65.
201. Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydr Polym*. 2014;105:97-112.
202. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia AS, McNamara J, and Williams M, editors. *Neuroscience*, 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Part III. Movement and Its Central Control. Chapter 16. Lower Motor Neuron Circuits and Motor Control.
203. Ranade VV, Somberg JC. Bioavailability and pharmacokinetics of magnesium after administration of magnesium salts to humans. *Am J Ther*. 2001;8(5):345-57.
204. Ren J, Han EJ, Chung SH. In vivo and in vitro anti-inflammatory activities of alpha-linolenic acid isolated from *Actinidia polygama* fruits. *Arch Pharm Res*. 2007;30(6):708-14.
205. Ren K, Hylden JL, Williams GM, Ruda MA, Dubner R. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain* 1992b;50:331-44.
206. Ren K, Williams GM, Hylden JL, Ruda MA, Dubner R. The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 1992a;219(2):235-43.
207. Roach, Benson. *Metabolism and Nutrition: Second Edition*. London, UK: Elsevier Health Sciences; 2003.

- 208.Rocha-González HI, Herrejon-Abreu EB, López-Santillán FJ, García-López BE, Murbartíán J, Granados-Soto V. Acid increases inflammatory pain in rats: effect of local peripheral ASICs inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2009; 603:56-61.
- 209.Rogers M, Rasheed A, Moradimehr A, Baumrucker SJ. Memantine (Namenda) for neuropathic pain. *Am J Hosp Palliat Care*. 2009;26(1):57-9.
- 210.Romani, A. Magnesium in Health and Disease. Springer Science and Business Media Dordrecht; 2014.
- 211.Romero TR, Galdino GS, Silva GC, Resende LC, Perez AC, Côrtes SF, Duarte ID. Ketamine activates the L-arginine/Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Anesth Analg*. 2011; 113(5):1254-9.
- 212.Rondón LJ, Privat AM, Daulhac L, Davin N, Mazur A, Fialip J, Eschalier A, Courteix C. Magnesium attenuates chronic hypersensitivity and spinal cord NMDA receptor phosphorylation in a rat model of diabetic neuropathic pain. *The Journal of Physiology* 2010; 588: 4205-15.
- 213.Ruan H, Prasad JA, Lemaire S. Non-opioid antinociceptive effects of supraspinal histogranin and related peptides: possible involvement of central dopamine D(2) receptor. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;67(1):83-91.
- 214.Sachs D, Cunha FQ, Ferreira SH. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(10):3680-5.
- 215.Sakurada T, Matsumura T, Moriyama T, Sakurada C, Ueno S, Sakurada S. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003;75(1):115-21.
- 216.Salińska E, Lazarewicz JW. Modulation of NMDA receptor-mediated release of [3H]arachidonate in hippocampal slices of immature rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 1995;55(1):11-21.
- 217.Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol*. 1996;118:829–838.

- 218.Sang CN, Booher S, Gilron I, Parada S, Max MB. Dextromethorphan and memantine in painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: efficacy and dose-response trials. *Anesthesiology*. 2002;96(5):1053-61.
- 219.Santos AR, Calixto JB. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci Lett*. 1997;235(1-2):73-6.
- 220.Santos AR, Vedana EM, De Freitas GA. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflamm Res*. 1998;47(7):302-7.
- 221.Sarantopoulos C, McCallum B, Sapunar D, Kwok WM, Hogan Q. ATP-sensitive potassium channels in rat primary afferent neurons: the effect of neuropathic injury and gabapentin. *Neurosci Lett*. 2003;343(3):185-9.
- 222.Satyanarayana PS, Jain NK, Singh A, Kulkarni SK. Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 641-9.
- 223.Sautebin L, Ialenti A, Ianaro A, Di Rosa M. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. *Br J Pharmacol*. 1995;114(2):323-8.
- 224.Sawynok J, Reid A. Modulation of formalin-induced behaviors and edema by local and systemic administration of dextromethorphan, memantine and ketamine. *Eur J Pharmacol*. 2002;450(2):153-62.
- 225.Scotton B. The NMDA receptor complex. *Fundam Clin Pharmacol*.1993;7(8):389-400.
- 226.Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 177: 3-28.
- 227.Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsun L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* 2002; 31:166-170.
- 228.Schmidtke A, Tegeder I, Geisslinger G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci*. 2009;32(6):339-46.

229. Shahrami A, Assarzagdegan F, Hatamabadi HR, Asgarzadeh M, Sarehbandi B, Asgarzadeh S. Comparison of therapeutic effects of magnesium sulfate vs. dexamethasone/metoclopramide on alleviating acute migraine headache. *J Emerg Med.* 2015;48(1):69-76.
230. Shibuta S, Mashimo T, Zhang P, Ohara A, Yoshiya I. A new nitric oxide donor, NOC-18, exhibits a nociceptive effect in the rat formalin model. *J Neurol Sci.* 1996;141(1-2):1-5.
231. Shimosawa T, Takano K, Ando K, Fujita T. Magnesium inhibits norepinephrine release by blocking N-type calcium channels at peripheral sympathetic nerve endings. *Hypertension.* 2004;44(6):897-902.
232. Sidhapuriwala J, Li L, Sparatore A, Bhatia M, Moore PK. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative, on carrageenan-induced hindpaw oedema formation in the rat. *Eur J Pharmacol.* 2007;569(1-2):149-54.
233. Soave PM, Conti G, Costa R, Arcangeli A. Magnesium and anaesthesia. *Current Drug Targets* 2009; 10:734-43.
234. Sotgiu ML, Biella G, Formaglio F, Marchettini P. Central effect of ketorolac involving NMDA receptors activity. *Brain Res.* 1998;813(1):223-6.
235. Sousa-Valente J, Andreou AP, Urban L, Nagy I. Transient receptor potential ion channels in primary sensory neurons as targets for novel analgesics. *Br J Pharmacol.* 2014;171(10):2508-27.
236. Srebro DP, Vucković SM, Savić Vujović KR, Prostran MS. Nitric oxide synthase modulates the antihyperalgesic effect of the NMDA receptor antagonist MK-801 on Carrageenan-induced inflammatory pain in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2014b;234(4):287-93.
237. Srebro DP, Vučković S, Vujović KS, Prostran M. Anti-hyperalgesic effect of systemic magnesium sulfate in carrageenan-induced inflammatory pain in rats: influence of the nitric oxide pathway. *Magnes Res.* 2014a;27(2):77-85.
238. Srebro DP, Vučković SM, Savić Vujović KR, Prostran MŠ. TRPA1, NMDA receptors and nitric oxide mediate mechanical hyperalgesia induced by local injection of magnesium sulfate into the rat hind paw. *Physiol Behav.* 2015;139:267-73.

239. Standley CA, Batia L, Yueh G. Magnesium sulfate effectively reduces blood pressure in an animal model of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2006;19(3):171-6.
240. Standley CA, Batia L, Yueh G. Magnesium sulfate effectively reduces blood pressure in an animal model of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2006;19(3):171-6.
241. Strigo IA, Duncan GH, Bushnell MC, Boivin M, Wainer I, Rodriguez Rosas ME, Persson J. The effects of racemic ketamine on painful stimulation of skin and viscera in human subjects. *Pain.* 2005;113(3):255-64.
242. Suardíaz M, Estivill-Torrús G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodríguez de Fonseca F. Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain.* 2007;133(1-3):99-110.
243. Suetake-Koga S, Shimazaki T, Takamori K, Chaki S, Kanuma K, Sekiguchi Y, Suzuki T, Kikuchi T, Matsui Y, Honda T. In vitro and antinociceptive profile of HON0001, an orally active NMDA receptor NR2B subunit antagonist. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;84(1):134-41.
244. Takano Y, Kuno Y, Sato E, Takano M, Sato I. The enhancement of formalin induced agitation behavior by intrathecal administration of prostaglandin E1. *Masui.* 1999;48(8):841-6.
245. Takano Y, Sato E, Kaneko T, Sato I. Antihyperalgesic effects of intrathecally administered magnesium sulfate in rats. *Pain.* 2000; 84:175–9.
246. Tanabe M, Nagatani Y, Saitoh K, Takasu K, Ono H. Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology.* 2009;56(3):702-8.
247. Tang Q, Svensson CI, Fitzsimmons B, Webb M, Yaksh TL, Hua XY. Inhibition of spinal constitutive NOS-2 by 1400W attenuates tissue injury and inflammation-induced hyperalgesia and spinal p38 activation. *Eur J Neurosci.* 2007;25(10):2964-72.
248. Tao F, Tao YX, Zhao C, Doré S, Liaw WJ, Raja SN, Johns RA. Differential roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. *Neuroscience.* 2004;128(2):421-30.

249. Taylor-Clark TE, Undem BJ, Macglashan DW Jr, Ghatta S, Carr MJ, McAlexander MA. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol*. 2008;73(2):274-81.
250. Thienhaus O, Cole BE. Classification of pain. In: Weiner R. *Pain management: a practical guide for clinicians*. Boca Raton: CRC Press; 2002. p. 28.
251. Thisted RA, Klaff L, Schwartz SL, Wymer JP, Culligan NW, Gerard G, Pope LE, Berg JE. Dextromethorphan and quinidine in adult patients with uncontrolled painful diabetic peripheral neuropathy: a 29-day, multicenter, open-label, dose-escalation study. *Clin Ther*. 2006;28(10):1607-18.
252. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5-17.
253. Tobin JR, Martin LD, Breslow MJ, Traystman RJ. Selective anesthetic inhibition of brain nitric oxide synthase. *Anesthesiology*. 1994;81(5):1264-9.
254. Togashi H, Sasaki M, Frohman E, Taira E, Ratan RR, Dawson TM, Dawson VL. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(6):2676-80.
255. Tong CK, Kaftan EJ, Macdermott AB. Functional identification of NR2 subunits contributing to NMDA receptors on substance P receptor-expressing dorsal horn neurons. *Mol Pain*. 2008;4:44.
256. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):405-96.
257. Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol*. 1992;38(4):397-421.
258. Tunctan B, Ozveren E, Korkmaz B, Buharalioglu CK, Tamer L, Degirmenci U, Atik U. Nitric oxide reverses endotoxin-induced inflammatory hyperalgesia via inhibition of prostacyclin production in mice. *Pharmacol Res*. 2006;53(2):177-92.

- 259.Uchytlova E, Spicarova D, Palecek J. TRPV1 antagonist attenuates postoperative hypersensitivity by central and peripheral mechanisms. *Mol Pain* 2014; 10:67.
- 260.Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Nishigaki M, Shibata Y, Shimada S. Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest* 2002; 110:1185-1190.
- 261.Ushida T, Iwatsu O, Shimo K, Tetsunaga T, Ikeuchi M, Ikemoto T, Arai YC, Suetomi K, Nishihara M. Intradermal administration of magnesium sulphate and magnesium chloride produces hypesthesia to mechanical but hyperalgesia to heat stimuli in humans. *J Neuroinflammation*. 2009;6:25.
- 262.Vaccarino AL, Marek P, Kest B, Weber E, Keana JF, Liebeskind JC. NMDA receptor antagonists, MK-801 and ACEA-1011, prevent the development of tonic pain following subcutaneous formalin. *Brain Res*. 1993;615(2):331-4.
- 263.Varga G, Erces D, Fazekas B, Fülöp M, Kovács T, Kaszaki J, Fülöp F, Vécsei L, Boros M. N-Methyl-D-aspartate receptor antagonism decreases motility and inflammatory activation in the early phase of acute experimental colitis in the rat. *Neurogastroenterol Motil*. 2010;22(2):217-25, e68.
- 264.Vastani N, Seifert B, Spahn DR, Maurer K. Sensitivities of rat primary sensory afferent nerves to magnesium: implications for differential nerve blocks. *Eur J Anaesthesiol* 2013; 30(1):21-8.
- 265.Vezzani A, Serafini R, Stasi MA, Caccia S, Conti I, Tridico RV, Samanin R. Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;249(1):278-83.
- 266.Volpe SL. Magnesium. In: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 10th ed. Ames, Iowa; John Wiley & Sons, 2012:459-74.
- 267.Vormann J, Worlitschek M, Goedecke T, Silver B. Supplementation with alkaline minerals reduces symptoms in patients with chronic low back pain. *J Trace Elem Med Biol*. 2001;15(2-3):179-83.
- 268.Vuckovic S, Srebro D, Savic Vujovic K, Prostran M. The antinociceptive effects of magnesium sulfate and MK-801 in visceral inflammatory pain model: The role of NO/cGMP/K(+)ATP pathway. *Pharm Biol*. 2015;53(11):1621-7.

269. Vučković S. Farmakoterapija bola. U: Prostran M. urednik. Klinička farmakologija. Beograd: Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu, 2012; 103-124.
270. Vuckovic S, Tomic M, Stepanovic-Petrovic R, Ugresic N, Prostran M, Boskovic B. Peripheral antinociception by carbamazepine in an inflammatory mechanical hyperalgesia model in the rat: a new target for carbamazepine? *J Pharmacol Sci.* 2006;100(4):310-4.
271. Walker AF, Marakis G, Christie S, Byng M. Mg citrate found more bioavailable than other Mg preparations in a randomised, double-blind study. *Magnes Res.* 2003;16(3):183-91.
272. Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304(1):56-62.
273. Wang X, Li WG, Yu Y, Xiao X, Cheng J, Zeng WZ, Peng Z, Xi Zhu M, Xu TL. Serotonin facilitates peripheral pain sensitivity in a manner that depends on the nonproton ligand sensing domain of ASIC3 channel. *J Neurosci.* 2013;33(10):4265-79.
274. Wang YY, Chang RB, Allgood SD, Silver WL, Liman ER. A TRPA1-dependent mechanism for the pungent sensation of weak acids. *J Gen Physiol.* 2011;137(6):493-505.
275. Wei H, Koivisto A, Saarnilehto M, Chapman H, Kuokkanen K, Hao B, Huang JL, Wang YX, Pertovaara A. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel contributes to central pain hypersensitivity in various pathophysiological conditions in the rat. *Pain.* 2011;152(3):582-91.
276. Wei H, Pertovaara A. MK-801, an NMDA receptor antagonist, in the rostroventromedial medulla attenuates development of neuropathic symptoms in the rat. *Neuroreport.* 1999;10(14):2933-7.
277. Willert RP, Woolf CJ, Hobson AR, Delaney C, Thompson DG, Aziz Q. The development and maintenance of human visceral pain hypersensitivity is dependent on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Gastroenterology.* 2004;126(3):683-92.

278. Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci.* 1991;48(6):469-98.
279. Witkowski M, Hubert J, Mazur A. Methods of assessment of magnesium status in humans: a systematic review. *Magnes Res.* 2011;24(4):163-80.
280. Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treede RD. A new definition of neuropathic pain. *Pain.* 2011;152(10):2204-5.
281. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1993;177(6):1779-84.
282. Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci.* 2005;25(39):8924-37.
283. Xu L, Mabuchi T, Katano T, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Sakimura K, Mishina M, Ito S. Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. *Nitric Oxide.* 2007;17(1):18-24.
284. Yaksh TL, Hua XY, Kalcheva I, Nozaki-Taguchi N, Marsala M. The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(14):7680-6.
285. Yamada K, Inagaki N. Neuroprotection by KATP channels. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38(6):945-9.
286. Yamamoto T, Sakashita Y. COX-2 inhibitor prevents the development of hyperalgesia induced by intrathecal NMDA or AMPA. *Neuroreport.* 1998;9(17):3869-73.
287. Yamamoto T, Yaksh TL. Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. *Anesthesiology.* 1992;77(4):757-63.
288. Yamanaka M, Taniguchi W, Nishio N, Hashizume H, Yamada H, Yoshida M, Nakatsuka T. In vivo patch-clamp analysis of the antinociceptive actions of TRPA1 activation in the spinal dorsal horn. *Mol Pain.* 2015;11:20.

289. Yokoyama T, Oono H, Miyamoto A, Ishiguro S, Nishio A. Magnesium-deficient medium enhances NO production in alveolar macrophages isolated from rats. *Life Sci.* 2003;72(11):1247-57.
290. Yonehara N, Amano K, Kamisaki Y. Involvement of the NMDA-nitric oxide pathway in the development of hypersensitivity to tactile stimulation in dental injured rats. *Jpn J Pharmacol.* 2002;90(2):145-55.
291. Yonehara N, Takemura M, Yoshimura M, Iwase K, Seo HG, Taniguchi N, Shigenaga Y. Nitric oxide in the rat spinal cord in Freund's adjuvant-induced hyperalgesia. *Jpn J Pharmacol.* 1997;75(4):327-35.
292. Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol.* 2006;2(11):596-607.
293. Yousef AA, Al-Deeb AE. A double-blinded randomised controlled study of the value of sequential intravenous and oral magnesium therapy in patients with chronic low back pain with a neuropathic component. *Anaesthesia* 2013; 68:260-6.
294. Zanchet EM, Cury Y. Peripheral tachykinin and excitatory amino acid receptors mediate hyperalgesia induced by Phoneutria nigriventer venom. *Eur J Pharmacol.* 2003;467(1-3):111-8.
295. Zhang GH, Yoon YW, Lee KS, Min SS, Hong SK, Park JY, Han HC. The glutamatergic N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors in the joint contribute to the induction, but not maintenance, of arthritic pain in rats. *Neurosci Lett.* 2003;351(3):177-80.
296. Zhang XC, Zhang YQ, Zhao ZQ. Different roles of two nitric oxide activated pathways in spinal long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials. *Neuropharmacology.* 2006;50(6):748-54.
297. Zhou HY, Chen SR, Pan HL. Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2011;4(3):379-88.
298. Zhou S, Bonasera L, Carlton SM. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. *Neuroreport.* 1996;7(4):895-900.
299. Zhuo M, Meller ST, Gebhart GF. Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain.* 1993;54(1):71-8.

300.Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca^{2+} . *Nat Neurosci.* 2007;10(3):277-9.

SPISAK SKRAĆENICA

%AA – analgetička aktivnost

%AE - antiedematozno dejstvo

[d(g)] - razlika pritiska koji izaziva podizanje šape pacova pre i posle injekcije

[d(v)] - razlika u volumenu šape izmerena posle i pre injekcije

5-HT – 5 hidroksitriptamin

ADP – adenzin-difosfat

AITC - alil izotiocijanat (ulje senfa),

AMPA – alfa-amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazola

ARL-174777 - ARL dihydrochloride N-[4-[2-[[[3-Chlorophenyl) methyl]amino]ethyl]phenyl]-2- thiophenecarboxamide dihydrochloride

ASIC - kanali osetljivi na nizak pH

ATP – adenzin-trifosfat

cGMP – ciklični gvanozin monofosfat

CGRP - peptid poreklom od gena za kalcitonin

CNQX – 6-ciano-7-nitrokvinoxalin-2,3-dion

CNS – centralni nervni sistem

COX – ciklooksigenaza

Dizocilpin - MK-801

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

ED₅₀ – srednja efektivna doza

eNOS - endotelni oblik NOS

GABA – gama aminobuterna kiselina

GluN1, GluN2, GluN3 – glutamatne subjedinice NMDA receptora

HC-030031-(2-(1,3-Dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4 isopropylphenyl) acetamide

i.p.- intraperitonealno

i.pl. - intraplantarno

IASP – Internacionalno udrženje za proučavanje bola

iNOS - inducibilni oblik NOS

K⁺ATP kanali – ATP zavisni kalijumski kanali

KAI – kainatna kiselina

Kapsazepin - (N-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-2H-2-benzazepine-2-carbothioamide

L-NAME - N-nitro-L-arginine metil ester hidrohlorid

L-NPA - N-ω-Propil-L-arginin hidrohloride

NMDA - N-metil-D-aspartat

nNOS - neuralni oblik NOS

NO - azotni oksid

NOS – sintaza NO-a

NSAIL - nesteroidni antiinflamatorni lekovi

one way ANOVA - jednosmerne analize varijanse

PCP - fenciklidin

PGE2 - prostaglandina E2

PWT - prag povlačenja šape ili *eng.* „paw withdrawal threshold,,

RN-1734 - 2,4-Dichloro-N-isopropyl-N-(2-isopropylaminoethyl) benzene-sulfonamide

RNK – ribonukleinska kiselina

s.c. – supkutano

SMT - S-metlizotiourea

TRP - kanali za prolazne receptorske potencijale

TRPA - ankirinski tip kanala

TRPC – kanonski tip TRP kanala

TRPM – melastatinski tip TRP kanala

TRPML – mukolipinski tip TRP kanala

TRPP – policistični tip TRP kanala

TRPV – vaniloidni tip TRP kanala

LISTA PUBLIKOVANIH RADOVA IZ DOKTORATA

1. **Srebro DP**, Vučković SM, Savić Vujović KR, Prostran MŠ. TRPA1, NMDA receptors and nitric oxide mediate mechanical hyperalgesia induced by local injection of magnesium sulfate into the rat hind paw. *Physiol Behav.* 2015; 139:267-73. **M21; IF=3,19**
2. Vučković S, **Srebro D**, Savić Vujović K, Prostran M. The antinociceptive effects of magnesium sulfate and MK-801 in visceral inflammatory pain model: The role of NO/cGMP/K(+)ATP pathway. *Pharm Biol.* 2015; 53(11):1621-7. **M23; IF=1,24**
3. **Srebro DP**, Vučković SM, Savić Vujović KR, Prostran MS. Nitric oxide synthase modulates the antihyperalgesic effect of the NMDA receptor antagonist MK-801 on Carrageenan-induced inflammatory pain in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2014; 234(4):287-93. **M22; IF=1,43**
4. **Srebro DP**, Vučković S, Vujović KS, Prostran M. Anti-hyperalgesic effect of systemic magnesium sulfate in carrageenan-induced inflammatory pain in rats: influence of the nitric oxide pathway. *Magnes Res.* 2014; 27(2):77-85. **M23; IF=1,57**

Biografija

Dragana Srebro je rođena 24.01.1986. godine u Beogradu. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je 2005. godine, a završila 2011. godine kao prvi student u generaciji i sa prosečnom ocenom 9,00. Tokom studija bila je demonstrator na Katedri za Mikrobiologiju, pisala je studentske radove i bila istraživač u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za uzročnike mikoza na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Doktorske akademske studije iz Medicinske farmakologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu upisala je 2011. godine. Specijalističke akademske studije iz Kliničke farmakologije završila je 2015. godine, odbranivši temu „Farmakološka modulacija kontraktilnosti skeletnog mišića“. Zdravstvenu specijalizaciju iz Kliničke farmakologije upisala je 2014. godine. Radi na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Na ovom Institutu zaposlena je od 2011. godine, prvo kao istraživač, a sada u zvanju saradnika u nastavi. Autor je i ko-autor u više poglavlja knjiga, 49 stručnih radova i publikacija, od kojih je devet radova in extenso u časopisima indeksiranim u CC/SCI bazi.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Dragana Srebro

broj upisa MF-06/11

Izjavljujem

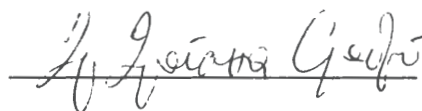
da je doktorska disertacija pod naslovom

**Farmakodinamska ispitivanja magnezijum-sulfata i dizocilpina u modelima
somatskog i visceralnog bola kod pacova**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 14.01.2016.



Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora: **Dragana Srebro**

Broj upisa: **MF-06/11**

Studijski program: **Doktorske akademske studje iz Medicinske farmakologije**

Naslov rada: **Farmakodinamska ispitivanja magnezijum-sulfata i dizocilpina
u modelima somatskog i visceralnog bola kod pacova**

Mentor: **Prof. dr Sonja Vučković**

Potpisani DRAGANA SREBRO

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 14.01.2016.

Dragana Srebro

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Farmakodinamska ispitivanja magnezijum-sulfata i dizocilpina u modelima somatskog i visceralnog bola kod pacova

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

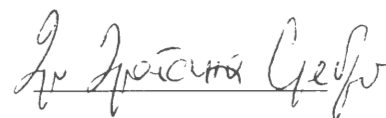
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- ☒ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerađe
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerađe
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 14.01.2016.



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.