

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Marija M. Milić

**UTICAJ SUPSTANCI SELEKTIVNIH ZA
POJEDINE PODTIPOVE
BENZODIAZEPINSKOG MESTA
VEZIVANJA GABA_A RECEPTORA NA
PONAŠANJE PACOVA U MORISOVOM
VODENOM LAVIRINTU**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Marija M. Milić

**THE INFLUENCE OF LIGANDS
SELECTIVE FOR THE DISTINCT
SUBTYPES OF BENZODIAZEPINE
BINDING SITE OF GABA_A RECEPTORS
ON RATS' BEHAVIOR IN THE MORRIS
WATER MAZE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor

Dr Miroslav Savić, vanredni profesor
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije

Dr Nenad Ugrešić, redovni profesor
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Dubravko Bokonjić, redovni profesor
Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije,
Univerzitet odbrane u Beogradu

U Beogradu, _____

SKRAĆENICE I AKRONIMI

GABA – γ -amino buterna kiselina

CNS- centralni nervni sistem

TBPS – t-butil-biciklofosforotioat

MVL – Morisov vodeni lavirint

LTP – dugotrajna potencijacija (eng. *long term potentiation*)

SI – severoistok

ANOVA – analiza varijanse (eng. *analysis of variance*)

DZP – diazepam

SOL – rastvarač (eng. *solvent*)

MDZ – midazolam

ZOL – zolpidem

NMDA – N-metil D-aspartat

SLA – sponatana lokomotorna aktivnost

DMTP – *delayed matching to position* (eng.)

TSPO – translokator protein

Uticaj supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora na ponašanje pacova u Morisovom vodenom lavirintu

Rezime

Klasični benzodiazepini deluju kao neselektivni pozitivni modulatori GABA_A receptora koji sadrže α_1 , α_2 , α_3 i α_5 podjedinicu, i u uslovima kliničke primene dovode do razvoja anterogradne amnezije. Nasuprot tome, negativna modulacija na nivou ovih receptora dovodi se u vezu sa poboljšanjem određenih tipova memorije kod ljudi i životinja. Uprkos brojnim istraživanjima, precizna uloga različitih podjedinica GABA_A receptora u memorijskim efektima benzodiazepina nije u potpunosti rasvetljena. Tome doprinosi činjenica da uticaj diazepama u memorijskim testovima kod *knock in* i *knock out* miševa nije ispitan u potpunosti, ali i nedostatak selektivnih liganada i odgovarajućih farmakoloških istraživanja.

Ekvivalent pamćenju kod ljudi jeste specifičan oblik promene ponašanja eksperimentalnih životinja koji se kroz brojne parametre može kvalitativno i kvantitativno opisivati. Morisov vodeni lavirint (MVL) je jedan od najčešće korišćenih laboratorijskih testova u bihevioralnim neuronaukama uopšte, a primenjuje se za proučavanje neurobiologije i neurofarmakologije prostornog učenja i memorije kod oglednih pacova. U okviru ove disertacije, primenom Morisovog vodenog lavirinta ispitan je uticaj supstanci koje deluju preko benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora na učenje i pamćenje kod pacova Wistar soja. Cilj je bio da se uz pomoć supstanci koje imaju različite kombinacije afiniteta i efikasnosti na ovim veznim mestima utvrdi relativni doprinos svake od podjedinica GABA_A receptora u memorijskim efektima koji se zapažaju u korišćenom testu, kao i stadijum memorijskog procesa (akvizicija, konsolidacija ili pozivanje memorije) koji je podložan uticaju pozitivnih neselektivnih modulatora.

U istraživanju je pokazano da neselektivni pozitivni modulatori (diazepam i midazolam) na dozno-zavisan način dovode do oštećenja učenja i pamćenja u MVL-u. S obzirom na doze koje su pokazale aktivnost, ne može se isključiti i doprinos nekih nekognitivnih efekata u ukupnoj inkapacitaciji životinja koja se vidi u MVL-u. Efekti benzodiazepina u MVL-u uglavnom su ograničeni na fazu akvizicije memorije, s time što je pokazano da midazolam može da dovede i do oštećenja pozivanja. Uticaj

diazepama u MVL-u u potpunosti se može antagonizovati primenom α_1 -selektivnog neutralnog modulatora, β CCt-a. Zolpidem, kao α_1 -selektivni pozitivni modulator, takođe dovodi do oštećenja u MVL-u, i njegovi efekti su slični efektima neselektivnih modulatora (diazepama i midazolama). Supstance koje imaju smanjenu aktivnost na α_1 -podtipu GABA_A receptora (JY-X-He-053, SH-053-2'N, SH-053-S-CH3-2'F i SH-053-R-CH3-2'F) nisu ispoljile uticaj na ponašanje pacova u MVL-u. Efekti diazepama na učenje i pamćenje pacova u MVL-u mogu se u potpunosti antagonizovati i primenom α_5 -selektivnog neutralnog modulatora XLi093, što je u skladu sa rezultatima dobijenim i pri primeni diazepama i XLi093 na majmunima, u odgovarajućim memorijskim testovima. α_5 -selektivni pozitivni modulator, XLi356, doveo je do oštećenja pamćenja, što je prvi rezultat ovakve vrste i u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima. PWZ-029, α_5 -selektivni negativni modulator koji je u prethodnim istraživanjima pokazao prokognitivna svojstva, nije doveo do poboljšanja učenja i pamćenja u različitim eksperimentalnim protokolima u MVL-u, dok je neselektivni negativni modulator DMCM doveo do oštećenja.

Ukupno gledano, prikazani rezultati ukazuju da su za bihevioralnu aktivnost benzodiazepinskih liganada u Morisovom vodenom lavirintu od ključnog značaja α_1 i α_5 populacije GABA_A receptora. Poređenjem naših i rezultata drugih studija, može se zaključiti da promnezijski efekat inverznih agonista nije robustan nalaz, koji bi bio karakterističan za jednu supstancu ili grupu hemijski srodnih jedinjenja, kao što je to slučaj sa amnezijskim efektom benzodiazepina. Takođe, ovi rezultati ukazuju i na moguća odstupanja između *in vitro* i *in vivo* profila, što je naročito izraženo kod tzv. „anksioselektivnih anksiolitika“ i „prokognitivnih lekova“. Stoga, neophodno je koristiti što veći broj animalnih modela, vrsta i eksperimentalnih protokola kako bi se povećala prediktivna vrednost pretkliničkih istraživanja novih lekova.

Ključne reči: GABA_A receptori, benzodiazepinsko mesto vezivanja, anterogradna amnezija, Morisov vodeni lavirint

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

UDK broj: 615.015: 615.214 (043.3)

616-092.9: 616.89-008.464 (043.3)

The influence of ligands selective for distinct subtypes of the benzodiazepine binding site of GABA_A receptors on rats' behavior in the Morris water maze

Abstract

Classical benzodiazepines act as nonselective positive modulators at GABA_A receptors containing α_1 , α_2 , α_3 or α_5 subunit, and in clinical practice cause anterograde amnesia. On the opposite, negative modulation at these receptor subtypes is linked to an improvement in certain types of memory, both in humans and animals. Despite numerous studies, precise role of different subtypes of GABA_A receptors in memory effects of benzodiazepines are not fully elucidated. The possible reason could be the fact that memory effects of diazepam were not comprehensively tested in *knock in* and *knock out* mice, as well as the lack of subtype selective ligands and related pharmacological studies.

An animal equivalent to human memory is a specific change in behavior that could be described and quantified using an array of motor parameters. Morris water maze (MWM) is one of the most frequently used laboratory tools in behavioral neuroscience. It is widely used for studying neurobiology and neuropharmacology of spatial learning and memory in laboratory rats. In the present study, we used the Morris water maze to examine the influence of ligands which act through the benzodiazepine binding site of GABA_A receptors on learning and memory in Wistar rats. More specifically, we used ligands with different combinations of affinity and efficacy for this binding site, in order to investigate the relative contribution of distinct subtypes of GABA_A receptors in memory effects in the Morris water maze. Furthermore, we investigated which of the three memory stages (acquisition, consolidation and retrieval) is sensitive to pharmacological effects of nonselective positive modulators.

Our experiments showed that nonselective positive modulators (diazepam and midazolam) dose-dependently impaired learning and memory in MWM. With regard to the doses that were pharmacologically active, we could not have excluded the influence of some non-cognitive effects on general incapacitation that was seen in animals in MWM. Benzodiazepine effects in MWM are generally limited to memory acquisition, with the exception of midazolam impairing also memory retrieval. The effects of diazepam in MWM could be completely antagonized by an α_1 -selective neutral

modulator, β CCt. Zolpidem, an α_1 -selective positive modulator, also impaired performance in MWM, in a manner similar to non-selective modulators (diazepam and midazolam). Ligands with mild to partial agonistic efficacy at GABA_A receptors containing the α_1 subunit (JY-X-He-053, SH-053-2'N, SH-053-S-CH3-2'F i SH-053-R-CH3-2'F) were devoid of any effects in MWM. The influence of diazepam on learning and memory in MWM could be also completely antagonized by an α_5 -selective neutral modulator, XLi093, which corroborates the results obtained in memory tests in monkeys using these two ligands. An α_5 -selective positive modulator, XLi356, impaired performance in MWM, which is the first result of its kind in both preclinical and clinical studies. PWZ-029, an α_5 -selective negative modulator, which in previous studies showed procognitive effects, did not improve learning and memory across different experimental protocols in MWM. Nonselective negative modulator, DMCM, impaired performance in MWM.

The overall results indicate that behavioral activity of benzodiazepines in MWM is largely dependent on the modulation of α_1 - and α_5 GABA_A receptor populations. When comparing our results with those obtained in other studies, it can be concluded that, unlike the amnesic action of benzodiazepines, the promnesic action of inverse agonists is not a robust finding that would be regarded as typical for one ligand or a group of congener compounds. These results also point towards discrepancies between *in vitro* and *in vivo* profiles, which is especially prominent in case of “anxiolytics” and “procognitive drugs“. For these reasons, it would be advisable to use a variety of animal models, species and experimental protocols in order to improve predictive value of the preclinical studies of new drugs.

Key words: GABA_A receptors, benzodiazepine binding site, anterograde amnesia, Morris water maze

Academic expertise: Pharmacy

Major in: Pharmacology

UDC N°: 615.015 : 615.214 (043.3)
616-092.9 : 616.89-008.464 (043.3)

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Benzodiazepinsko mesto vezivanja na GABA _A receptoru.....	2
1.2.	Povezivanje strukture i funkcije GABA _A receptora.....	3
1.3.	Uticaj supstanci selektivnih za benzodiazepinsko mesto vezivanja GABA _A receptora na učenje i pamćenje.....	6
1.3.1.	Uticaj supstanci selektivnih za α_1 -podtip GABA _A receptora.....	8
1.3.2.	Supstance selektivne za $\alpha_{2/3}$ GABA _A receptore.....	9
1.3.3.	Supstance selektivne za α_5 GABA _A receptore.....	10
1.4.	Ispitivanje uticaja lekova na učenje i pamćenje kod ogleđnih životinja.....	11
1.4.1.	Koncept farmakološkog poboljšanja memorije kod zdravih životinja... 13	
1.5.	Morisov vodeni lavirint.....	14
1.5.1.	Parametri kojima se opisuje ponašanje u MVL-u.....	17
1.5.2.	Primena MVL u ispitivanju učenja i pamćenja kod glodara.....	19
1.6.	Perspektiva bihevioralne karakterizacije supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA _A receptora u MVL-u.....	21
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	24
3.	MATERIJAL I METODE.....	25
3.1.	Životinje.....	25
3.2.	Supstance.....	25
3.3.	Morisov vodeni lavirint.....	26
3.4.	Eksperimenti.....	28
3.4.1.	Ispitivanje uticaja neselektivnih modulatora na ponašanje pacova u MVL-u.....	28
3.4.2.	Ispitivanje uticaja supstanci selektivnih za α_1 -podtip GABA _A receptora na ponašanje pacova u MVL-u.....	30
3.4.3.	Ispitivanje uticaja supstanci sa smanjenom aktivnošću na α_1 -podtipu GABA _A receptora na ponašanje pacova u MVL-u.....	30
3.4.4.	Ispitivanje uticaja supstanci selektivnih za α_5 -podtip GABA _A receptora na ponašanje pacova u MVL-u.....	31
3.4.5.	Parametri kojima je opisano ponašanje pacova u MVL.....	32
3.5.	Statistička obrada podataka.....	32
4.	REZULTATI.....	34
4.1.	Neselektivni modulatori benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA _A receptora.....	34
4.2.	Supstance selektivne za α_1 -podtip GABA _A receptora.....	53
4.3.	Supstance sa smanjenom aktivnošću na α_1 -podtipu GABA _A receptora.....	66
4.4.	Supstance selektivne za α_5 -podtip GABA _A receptora.....	69
5.	DISKUSIJA.....	81
5.1.	Neselektivni modulatori benzodiazepinskog mesta vezivanja.....	81
5.1.1.	Uticaj diazepama na ponašanje pacova u MVL-u.....	82
5.1.2.	Uticaj midazolama na akviziciju, konsolidaciju i pozivanje memorije..	85
5.1.3.	Uticaj negativnog neselektivnog modulatora, DMCM-a.....	89
5.2.	Supstance selektivne za α_1 -podtip GABA _A receptora.....	91
5.3.	Supstance sa smanjenim afinitetom/aktivnošću na α_1 -podtipu GABA _A receptora.....	93
5.4.	Supstance selektivne za α_5 -podtip GABA _A receptora.....	95

5.4.1.	α_5 -selektivni neutralni modulator XLi093.....	97
5.4.2.	α_5 -selektivni pozitivni modulator XLi356.....	98
5.4.3.	α_5 -selektivni negativni modulator PWZ-029.....	100
6.	ZAKLJUČCI	103
7.	LITERATURA	105

1. UVOD

Kao primarni inhibitorni neurotransmiter centralnog nervnog sistema (CNS), zastupljen u visokim koncentracijama i u mozgu i u kičmenoj moždini, γ -aminobuterna kiselina (GABA) igra glavnu ulogu u modulaciji većine, ako ne i svih, njegovih funkcija. Lekovi koji utiču na GABA-ergičku aktivnost ispoljavaju širok spektar farmakoloških efekata, od anksiolitičkog, hipnotičkog, sedativnog i miorelaksantnog dejstva do antikonvulzivne aktivnosti, i primenjuju se u terapiji velikog broja neuroloških i psihijatrijskih oboljenja (Shader i Greenblatt, 1981; Stevens i Pollack, 2005).

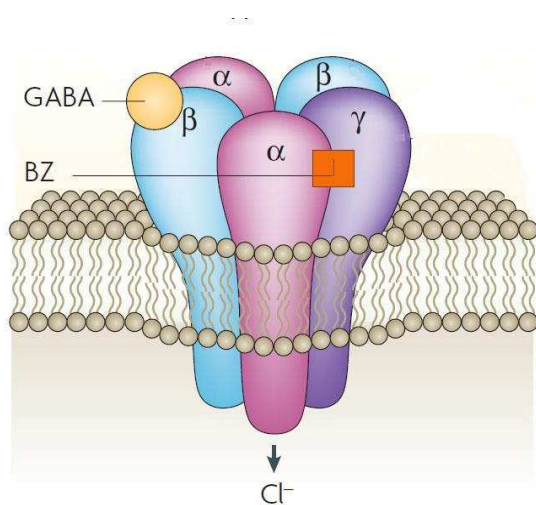
U CNS-u postoje dva tipa receptora za GABA-u, jonotropni GABA_A i metabotropni GABA_B receptori. Većinu svojih efekata GABA ispoljava preko GABA_A receptora, ligand-zavisnih jonskih kanala, koji su po svojoj strukturi pentameri izgrađeni od podjedinica koje pripadaju različitim klasama. Do sada je identifikovano 19 različitih podjedinica, grupisanih u osam klasa (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ i ρ_{1-3}), što teoretski, s obzirom na pentamernu strukturu receptora, daje mogućnost postojanja hiljada različitih podtipova GABA_A receptora (Sieghart, 1995). Ipak, kako samo određene kombinacije podjedinica pokazuju odgovor na stimulaciju GABA-om, procenjuje se da je broj različitih podtipova GABA_A receptora u CNS-u sisara verovatno manji od 100, a moguće je i da iznosi tek nekoliko desetina (Olsen i Sieghart, 2009).

Trenutno dostupne tehnike ne pružaju mogućnost nedvosmislenog određivanja sastava i strukture nativnih GABA_A receptora, ali imunocitohemijske studije pokazuju da je većina GABA_A receptora prisutnih u mozgu izgrađena od 2α , 2β i γ podjedinice (Olsen i Sieghart, 2009). Ispitivanje zastupljenosti različitih podtipova GABA_A receptora, uz pomoć antitela specifičnih za određene podjedinice, pokazala su najveću rasprostranjenost receptora koji sadrže $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ podjedinice, dok $\alpha_2\beta\gamma_2$, $\alpha_3\beta\gamma_2$, $\alpha_4\beta\gamma_2$, $\alpha_5\beta\gamma_2$, $\alpha_6\beta\gamma_2$, $\alpha_4\beta\delta$ i $\alpha_6\beta\delta$ kombinacije podjedinica imaju relativno nižu zastupljenost (Sieghart i Sperk, 2002). Glavni faktor koji doprinosi heterogenosti GABA_A receptora jeste postojanje šest različitih α podjedinica. Vrsta podjedinica koje ulaze u sastav GABA_A receptora, njihov relativni raspored i stehiometrija, od ključnog su značaja za ispoljavanje farmakoloških efekata lekova i eksperimentalnih supstanci koje deluju preko ovih receptora (Olsen i Sieghart, 2008).

1.1. Benzodiazepinsko mesto vezivanja na GABA_A receptoru

Veliki broj supstanci različite hemijske strukture stupa u interakciju sa GABA_A receptorima i aktivira, blokira ili moduliše njihovu aktivnost, ali ukupan broj vezivnih mesta na GABA_A receptoru nije poznat. Za sada se, pored vezivnog mesta za GABA-u, koje se nalazi na međupovršini α i β podjedinica (**Slika 1**), još samo dva posebna vezivna mesta na GABA_A receptoru mogu direktno ispitivati vezivanjem odgovarajućih radioobeleženih liganada: benzodiazepinsko mesto vezivanja i t-butil-biciklofosforotriat (TBPS)/pikrotoksinsko vezivno mesto (Sieghart, 1995). Interakcije svih ostalih supstanci sa GABA_A receptorima za sada se mogu ispitivati jedino elektrofiziološki, a njihova potencijalna mesta vezivanja istražuju se uvođenjem sternih smetnji (zamenom odgovarajućih aminokiselina) na transmembranski domen GABA_A receptora (Sieghart i sar., 2012).

Benzodiazepinsko mesto vezivanja na GABA_A receptoru nalazi se na međupovršini α i γ podjedinice (**Slika 1**), što ukazuje da izoforme ovih podjedinica igraju ključnu ulogu u ispoljavanju farmakoloških efekata benzodiazepina. Klasični benzodiazepini (poput diazepam i midazolama) dominantno se vezuju za receptore koji sadrže $\alpha_1\beta\gamma_2$, $\alpha_2\beta\gamma_2$, $\alpha_3\beta\gamma_2$, ili $\alpha_5\beta\gamma_2$ podjedinice, ne ispoljavaju aktivnost na $\alpha_4\beta\gamma_2$ i $\alpha_6\beta\gamma_2$ receptorima i imaju smanjenu ili neznatnu aktivnost na receptorima koje sadrže γ_1 ili γ_3 podjedinicu (Puia i sar., 1991; Sieghart, 1995; Hevers i Luddens, 1998).



Slika 1. Šematski prikaz pentamerne strukture GABA_A receptora sa hloridnim kanalom (Cl⁻) i vezivnim mestima za GABA-u i benzodiazepine (BZ) (Jacob i sar., 2008).

Pored benzodiazepina, veliki broj strukturno različitih klasa supstanci vezuje se za benzodiazepinsko mesto na GABA_A receptorima (Sieghart, 1995; Teuber i sar., 1999; Huang i sar., 2000; Korpi i sar., 2002; Atack, 2005). Ove supstance mogu samo da modulišu već pokrenutu GABA-ergičku aktivnost, povećavajući ili smanjujući frekvenciju otvaranja GABA-zavisnog hloridnog kanala, dok u odsustvu GABA-e, sami po sebi ne mogu da pokrenu protok hloridnih jona (Study i Barker, 1981; Macdonald i Olsen, 1994). Supstance poput klasičnih benzodiazepina, koje su pozitivni modulatori GABA-ergičke aktivnosti, alosterno povećavaju frekvenciju otvaranja hloridnih kanala i kolokvijalno se nazivaju „agonisti“. Supstance koje alosterno smanjuju GABA-zavisni protok hloridnih jona jesu negativni modulatori GABA-ergičke aktivnosti, a nazivaju se „inverzni agonisti“. Sa farmakološkog aspekta, negativna modulacija GABA_A receptora izaziva efekte suprotne pozitivnim modulatorima: anksioznost, prokonvulzivnu ili konvulzivnu aktivnost, poboljšanje pažnje, učenja i pamćenja. Treća klasa supstanci koje se vezuju za benzodiazepinsko mesto vezivanja stabilizuje konformaciono stanje koje direktno ne utiče na GABA-zavisni protok hloridnih jona. S obzirom na to da same po sebi ne ispoljavaju bihevioralne efekte, ali mogu da spreče alosterne efekte „agonista“ i „inverznih agonista“ na GABA_A receptorima, ove supstance se nazivaju neutralni modulatori ili „antagonisti“ (Sieghart, 1995).

Za neke od ovih supstanci opisana su, pored benzodiazepinskog, i dodatna mesta vezivanja na GABA_A receptoru, za koja se u većini slučajeva vezuju niskim afinitetom, i njihov klinički značaj za sada nije utvrđen (Hauser i sar., 1997; Walters i sar., 2000; Hancher i sar., 2006; Baur i sar., 2008; Sieghart i sar., 2012).

1.2. Povezivanje strukture i funkcije GABA_A receptora

Otkriće da se farmakološki efekti benzodiazepina ostvaruju preko četiri različita podtipa GABA_A receptora, koji uz to imaju i karakterističnu neuroanatomsku lokalizaciju (Pirker i sar., 2000), pokrenulo je pitanje uloge pojedinačnih podtipova receptora u farmakološkim efektima neselektivnih modulatora. Povezivanju strukture i funkcije različitih podtipova GABA_A receptora u velikoj meri doprineli su eksperimenti na genetski modifikovanim miševima, kao i sinteza novih liganada sa selektivnim

afinitetom i/ili efikasnošću na različitim podtipovima GABA_A receptora (pregled u Möhler, 2011).

Genetski pristup podrazumevao je generisanje mutiranih *knock in* miševa, pri čemu je iskorišćena osobina benzodiazepina da se vezuju za α -podjedinice koje na odgovarajućoj poziciji imaju histidin (α_1 -H101, α_2 -H101, α_3 -H126 i α_5 -H105), a ne vezuju za α podjedinice koje sadrže arginin (α_4 -R99 i α_6 -R100). Kada je histidinski ostatak na α_1 , α_2 , α_3 ili α_5 podjedinici zamenjen argininom, nastali su rekombinantni receptori neosetljivi na diazepam (Wieland i sar., 1992; Benson i sar., 1998). Mutirani receptori su imali normalnu osetljivost na GABA-u, normalan nivo ekspresije i nepromenjenu regionalnu i celularnu distribuciju (sa izuzetkom α_5 (H105R) podjedinice). Sve četiri rekombinantne linije miševa podvrgnute su ispitivanjima pod uticajem diazepama i upoređene sa kontrolnim, divljim tipom miševa, a izostanak pojedinih efekata tada je pripisan odgovarajućem podtipu receptora. Drugi vid genetske mutacije podrazumevao je ablaciju odgovarajućih podjedinica GABA_A receptora (α_1 i α_5), i nastanak *knock out* miševa, kod kojih su, međutim, zapažene značajne razvojne kompenzatorne promene u ekspresiji ostalih podtipova GABA_A receptora i značajne promene fenotipa, što je u mnogome otežalo tumačenje kasnije dobijenih rezultata iz farmakoloških eksperimenata (Rudolph i Möhler, 2004).

Receptori koji sadrže α_1 podjedinicu čine dominantnu populaciju GABA_A receptora (oko 60%), i široko su rasprostranjeni u skoro svim strukturama mozga (Pirker i sar., 2000). Pri primeni diazepama kod α_1 -mutiranih miševa pokazano je odsustvo sedacije (test spontane lokomotorne aktivnosti), izostanak anterogradne amnezije (test pasivnog izbegavanja), očuvanje motorne koordinacije (rotarod) i mišićnog tonusa (test horizontalne žice i test povlačenja lanca). Takođe, zapaženo je da je za razliku od miševa divljeg tipa, α_1 -mutirani miševi pri primeni diazepama imaju samo parcijalnu zaštitu od toničnih konvulzivnih napada izazvanih pentilentetrazolom, kao i nepotpun hipnotički efekat (Rudolph i sar., 1999).

Receptori koji sadrže α_2 podjedinicu dominantno su eksprimirani u limbičkom sistemu, u regionima koji su uključeni u obradu emocionalnih stimulusa (amigdala i hipokampus), i čine oko 15-20% ukupne populacije GABA_A receptora (Pirker i sar., 2000). Pri primeni diazepama kod α_2 -mutiranih miševa zabeležen je izostanak anksiolitičkog dejstva u uzdignutom plus lavirintu i testu izbora između svetla i tame

(engl. *light-dark choice test*) (Löw i sar., 2000), kao i značajno odsustvo miorelaksacije u testu horizontalne žice (Crestani i sar., 2001). Sedacija i antikonvulzivna aktivnost bile su očuvane (Löw i sar., 2000).

Receptori koji sadrže α_3 podjedinicu učestvuju sa oko 10-15% u ukupnom broju GABA_A receptora, a značajnija ekspresija nađena je na monoaminergičkim i serotonergičkim neuronima moždanog stabla i holineričkim neuronima bazalnog proencefalona (Pirker i sar., 2000). U uzdignutom plus lavirintu i testu izbora između svetlosti i tame, kod α_3 (H126R) miševa, diazepam je ispoljio anksiolitičku aktivnost, što ukazuje da ovaj podtip receptora nije od dominantnog značaja za ovaj efekat. Sedativno i antikonvulzivno dejstvo diazepama takođe je bilo nepromenjeno (Löw i sar., 2000), ali je zapaženo umereno smanjenje miorelaksacije, što ukazuje na ulogu ovih receptora u njenom ispoljavanju (Crestani i sar., 2001).

GABA_A receptori koji sadrže α_5 podjedinicu čine samo 5% ukupne populacije GABA_A receptora, sa pretežnom distribucijom u hipokampusu (Pirker i sar., 2000). Kod α_5 (H105R) miševa, diazepam je ispoljio sedativno, antikonvulzivno i anksiolitičko dejstvo, ali je zabeleženo smanjenje miorelaksacije u odnosu na efekat ispoljen kod divljih miševa. Dodatno, kod α_5 (H105R) miševa zabeležena je smanjena ekspresija mutiranih α_5 podjedinica u hipokampalnim piramidalnim ćelijama za oko 30% (Crestani i sar., 2002). U testu uslovljavanja strahom, pri ponovljenom izlaganju uslovnom signalu, ovi miševi su pokazali veći procenat *freezing*-a u odnosu na divlje miševе, što je navelo na zaključak da ekstrasinaptički hipokampalni α_5 GABA_A receptori imaju značajnu ulogu u vremenskom povezivanju dva signala u ovom testu (Crestani i sar., 2002). Kod α_5 -*knock out* miševa zabeležena je značajno veća efikasnost nalaska platforme u Morisovom vodenom lavirintu (MVL), dok su u testu dvosmernog aktivnog izbegavanja mutirani miševi bili na nivou kontrolne grupe (Collinson i sar., 2002).

Farmakološke studije su mahom potvrdile, a u nekim slučajevima i dopunile rezultate dobijene u genetskim studijama. Tako je u studiji na α_3 -*knock in* miševima zaključeno da ova podjedinica ne učestvuje u anksiolitičkom dejstvu diazepama, ali je primena α_3 -selektivnog inverznog agoniste dovela do povećanja anksioznosti kod pacova u uzdignutom plus lavirintu (Collins i sar., 2002). Supstance sa povećanim afinitetom i/ili efikasnošću za $\alpha_2\beta\gamma_2$ i/ili $\alpha_3\beta\gamma_2$ podtip GABA_A receptora ispoljile su anksiolitičku aktivnost (Atack, 2005; Dias i sar., 2005), a za supstance relativno

selektivne za α_1 -podtip GABA_A receptora potvrđeno je da ispoljavaju sedativna i antikonvulzivna dejstva (Sanger i sar., 1996; Zanin i sar., 2013). Međutim, bilo je i neočekivanih nalaza. Na primer, Savić i sar. (2008b) su ukazali na moguću ulogu α_5 receptora u ispoljavanju sedativnog dejstva diazepama, dok su Lipka i sar. (2005) pokazali anksioselektivni profil liganda selektivnog za α_1 -podtip GABA_A receptora.

1.3. Uticaj supstanci selektivnih za benzodiazepinsko mesto vezivanja GABA_A receptora na učenje i pamćenje

Ubrzo nakon uvođenja benzodiazepina u kliničku praksu, početkom 60-ih godina XX veka, anesteziolozi su opisali anterogradnu amneziju pri primeni ovih lekova u prehirurškoj ili predijagnostičkoj medikaciji (Brandt i Oakes, 1965; Haslett i Dundee, 1968). U tim uslovima, anterogradna amnezija se može smatrati poželjnim sporednim dejstvom, ali je u svim ostalim indikacijama neželjeni efekat koji doprinosi značajnom smanjenju kvaliteta života pacijenata. Za veliki broj psihijatrijskih oboljenja, stalna ili povremena primena benzodiazepina predstavlja neizbežan dodatni korak u kontroli simptoma, a anterogradna amnezija ne samo da može otežati prateće psihološke intervencije (Curran, 1994), već i dovesti do pogoršanja postojećih kognitivnih disfunkcija povezanih sa primarnim oboljenjima (Deckersbach i sar., 2011). Memorijski efekti benzodiazepina kod ljudi nezavisni su od istovremeno ispoljene sedacije ili pospanosti, i u uslovima produžene primene, na njih se ne razvija tolerancija (Ghoneim i sar., 1981). Težina i dužina trajanja amnezije zavise od toga koji je benzodiazepin upotrebljen, od njegove doze i načina primene (Ghoneim i sar., 1984; Curran, 1991).

Memorija se može klasifikovati prema više kriterijuma, prema dužini (dugotrajna i kratkotrajna memorija), sadržaju (deklarativna i proceduralna) ili stadijumima formiranja (sticanje, konsolidacija, pozivanje) (Beracochea, 2006). Lister (1985) je pokazao da je na uticaj benzodiazepina osetljivija dugotrajna memorija. U kontekstu podele memorije na deklarativnu (eksplicitnu) i nedeklarativnu (implicitnu), gde prva podrazumeva mogućnost svesnog pozivanja činjenica, znanja i doživljenih događaja, a druga automatsko izvođenje prethodno savladanih motornih i kognitivnih veština (Squire i Zola, 1996), benzodiazepini dokazano oštećuju deklarativnu, i to prevashodno epizodičnu memoriju, dok na semantičku i nedeklarativnu memoriju

nemaju znatnijeg uticaja (Beracochea, 2006). Veoma čest zaključak kliničkih studija je i da benzodiazepini ne utiču značajno na pozivanje memorije (Ghoneim i Mewaldt, 1975; Lister, 1985). Ipak, u jednoj studiji kod mladih zdravih dobrovoljaca zabeleženo je oštećenje pozivanja memorije (Block i Berchou, 1984), a u više drugih studija i facilitacija (Hinrichs i sar., 1984; File i sar., 1999; Fillmore i sar., 2001). Hipoteza prema kojoj bi ovaj fenomen facilitacije bio izazvan smanjenom interferencijom činjenica prezentovanih nakon primene leka (Hinrichs i sar., 1984), odbačena je sa studijom u kojoj je lorazepam poboljšao proces pozivanja događaja koji su se zbili pre primene benzodiazepina, i to u odsustvu amnezije za događaje nakon primene (File i sar., 1999).

I u studijama na životinjama, za benzodiazepine je uglavnom pokazano da oštećuju akviziciju u testovima učenja i pamćenja (pregled u Beracochea, 2006), a da, izuzetno retko, primena benzodiazepina neposredno nakon faze akvizicije može da ošteti pozivanje memorije u testu kao što je pasivno izbegavanje (Jensen i sar., 1979). Kada su u pitanju retrogradni amnezijски efekti, rezultati većine pretkliničkih studija isključuju uticaj benzodiazepina na pozivanje u različitim testovima učenja i pamćenja (Venault i sar., 1986; McNamara i Skelton, 1991). U testovima koji po svojoj prirodi uključuju i značajnu emocionalnu komponentu, nekoliko studija ukazuje na inhibitorni (Cole i Michaleski, 1984; Cole, 1986), ali i facilitatorni (Savić i sar., 2003; Obradović i sar., 2004) uticaj benzodiazepina na pozivanje memorije. Prema *Yerkes-Dodson*-ovoj hipotezi (1908), odnos između pobuđenosti i/ili anksioznosti je takav, da zavisno od težine zadatka, umereni nivo anksioznosti može olakšati izvođenje memorijskog testa (Eysenck, 1985). Retrogradna oštećenja nađena su i u testovima prostorne memorije, ali uglavnom u eksperimentalnim procedurama u kojima su benzodiazepini primenjivani neposredno nakon faze akvizicije (Chrobak i Napier, 1992; Stackman i Walsh, 1992). U tom smislu, retrogradni uticaji proističu primarno iz oštećenja procesa konsolidacije, odnosno nesposobnosti da se skladište novi događaji tokom određenog vremenskog prozora dejstva supstance, upućujući na taj način ipak na anterogradne, pre nego na retrogradne, memorijske deficite.

Nasuprot amnezijском dejstvu pozitivnih modulatora, istraživanja sprovedena tokom osamdesetih godina XX veka otkrila su da negativna modulacija na tzv. „benzodiazepinskim receptorima“ dovodi od poboljšanja određenih tipova memorije

kod životinja (Venault i sar., 1986; Jensen i sar., 1987) i ljudi (Duka i sar., 1988). Međutim, primena prvih, neselektivnih inverznih agonista bila je praćena pojavom prokonvulzivnih/konvulzivnih i anksiogenih efekata (Dorow i sar., 1983; Petersen, 1983), pa je koncept daljeg razvoja prokognitivnih lekova bio privremeno napušten.

1.3.1. Uticaj supstanci selektivnih za α_1 -podtip GABA_A receptora

Ligandi selektivni za α_1 -podtip GABA_A receptora mogli bi da izazivaju manje kognitivnih oštećenja od klasičnih (neselektivnih) benzodiazepina, s obzirom da pokazuju manji afinitet prema α_5 -podtipu GABA_A receptora, koji su dominantno eksprimirani u hipokampusu, strukturi mozga koja je od ključnog značaja za učenje i pamćenje (Moreslli, 1990; Izqueirido i Medina, 1997).

Zolpidem je prototip α_1 selektivnog pozitivnog modulatora, i prvi selektivni ligand u kliničkoj primeni, koji se karakteriše oko 5-14 puta većim afinitetom za α_1 - u odnosu na α_2 - i α_3 -podtip GABA_A receptora, kao i veoma niskim afinitetom za α_5 GABA_A receptore (Benavides i sar., 1988; Biggio i sar., 1989). Iz kliničkih studija se može zaključiti da zolpidem oštećuje memoriju u manjoj ili jednakoj meri kao neselektivni benzodiazepini (pregled u Holm i Goa, 2000). U pretkliničkim ispitivanjima je pokazano da zolpidem otežava učenje u različitim testovima, u testu uslovljavanja strahom (Huang i sar., 2010), aktivnom izbegavanju (Savić i sar. 2005a), pasivnom izbegavanju (Tang i sar., 1995; Edgar i sar., 1997; Savić i sar., 2005b), radijalnom lavirintu (Herzog i sar., 2000) i uzdignutom plus lavirintu (Zanin i sar., 2013). Zaleplon je drugi α_1 GABA_A selektivni agonist iz grupe tzv. z-hipnotika, koji u odnosu na zolpidem ima dva puta manji afinitet za α_1 GABA_A receptore, a za razliku od zolpidema pokazuje određeni afinitet za α_5 GABA_A receptore (Sanna i sar., 2002). U kliničkim studijama su prijavljivani i izostanak memorijskih efekata i oštećenje memorije, zabeleženo uglavnom pri primeni doza dvostruko većih od uobičajenih (pregled u Dooley i Plosker, 2000). U testu pasivnog izbegavanja kod pacova, zaleplon je izazvao skraćenje latencije u odnosu na kontrolnu grupu, ali su ovi efekti bili izraženi tek pri dozama koje su više od 11 puta veće od srednje efektivne doze za sedaciju (Beer i sar., 1997). Sličan nalaz je dobijen i u Morisovom vodenom lavirintu, gde je zaleplon tek pri visokoj dozi ošteti akviziciju (Noguchi i sar., 2002).

Eksperimentalne supstance koje deluju kao pozitivni modulatori i ispoljavaju selektivni afinitet i/ili efikasnost na α_1 -podtipu GABA_A receptora nisu ekstenzivno ispitivane u memorijskim testovima. McNamara i Skelton (1991) su pokazali da α_1 -selektivni ligand CL 218,872 oštećuje memoriju u Morisovom vodenom lavirintu poput diazepama. Supstance ocinaplone i DOV51892 (α_1 -selektivni „super agonista“), nisu ispitivane u memorijskim testovima (Atack, 2010). β CCt, neutralni modulator na GABA_A receptorima, koji ima najveću selektivnost vezivanja od svih dostupnih α_1 -selektivnih liganada (June i sar., 2003), nije uspeo da antagonizuje inhibitorne efekte hlordiazepoksida na sticanje memorije u dva različita testa, testu pasivnog izbegavanja i radijalnom lavirintu kod miševa (Belzung i sar., 2000). Sličan rezultat dobijen je na pacovima, u testu pasivnog izbegavanja, gde β CCt nije uspeo da antagonizuje efekte midazolama (Savić i sar., 2005b).

1.3.2. Supstance selektivne za $\alpha_{2/3}$ GABA_A receptore

O kognitivnim efektima supstanci koje se karakterišu selektivnim afinitetom/efikasnošću na α_2 - i α_3 -podtipu GABA_A receptora, i u pretkliničkim uslovima ispoljavaju anksiolitičko dejstvo, mogu se naći samo sporadični izveštaji. Naime, iako su supstance poput L-838417, TP023 (MK-0777), TPA023B i MRK-409 (MK-0343) i SL65.1498 i kod glodara i kod primata iscrpno testirane na prisustvo sedacije, ataksije i miorelaksantnog dejstva, a neke od njih prošle i u klinička ispitivanja, one u pretkliničkoj fazi nisu rutinski ispitivane i u memorijskim testovima (McKernan i sar., 2000; Griebel i sar., 2001; Atack i sar., 2006a; Rowlett i sar., 2005; Atack i sar., 2011a; Atack 2011b). Jedina publikovana studija koja je ispitivala memorijske efekte L-838417 na pacovima, pokazala je oštećenje u MVL-u i testu kontekstualnog uslovljavanja strahom, koje je bilo uporedivo sa efektima diazepama (Hoffman i sar., 2012). Za TPA023, TP023B i SL65.1498 pokazano je da u kliničkim uslovima, na zdravim dobrovoljcima, ne dovode do kognitivnih oštećenja, a izvesni memorijski efekti, značajno slabiji od onih izazvanih neselektivnim lekovima, zapaženi su pri primeni MRK-409 (de Haas i sar., 2008, 2009; Atack i sar., 2011b).

Činjenica je da, za razliku od liganada koji se karakterišu 10–20 puta većom selektivnošću za α_1 - (CL 218,872 i zolpidem) ili oko 50 puta većom selektivnošću za

α_5 -podtip $GABA_A$ receptora (L-655708, RY-80), do sada nisu opisane supstance sličnog afiniteta za α_2 i/ili α_3 receptore (Dawson i sar., 2005). Ako se pri tom ima u vidu da memorijski testovi na α_2 - i α_3 - *knock in* miševima nisu sprovedeni (Low i sar., 2000), stiče se utisak da uloga ovih podtipova $GABA_A$ receptora u kontekstu oštećenja memorije nije dovoljno poznata. $GABA_A$ receptori koji sadrže α_2 i α_3 podjedinicu najčešće se pominju u kontekstu povezanosti anksioznosti i pamćenja, dva procesa za koja se može reći da se integrišu u zajedničkim strukturama (amigdala, hipokampus, kora velikog mozga) (Millan, 2003). Postoji tendencija da se emocionalno pobuđujuća iskustva lakše pamte (McGauh, 2002; Yates, 2013), pa je tako i u eksperimentima na životinjama zapaženo da je za izvođenje određenih memorijskih testova, poput pasivnog izbegavanja, neophodan izvestan, „optimalan“ nivo anksioznosti (uporediti u Ribeiro i sar., 1999). U tom kontekstu, suzbijanje anksioznosti, koje se očekuje pri primeni neselektivnih pozitivnih modulatora (npr. midazolama), moglo bi da ošteti usvajanje informacija i izvođenje odgovarajućih testova (Savić i sar., 2005b).

1.3.3. Supstance selektivne za α_5GABA_A receptore

Za savremena farmakološka istraživanja i dizajn novih lekova, α_5 podjedinica $GABA_A$ receptora interesantna je pre svega sa aspekta razvoja novih prokognitivnih lekova. Naime, rezultati studija sa genetski modifikovanim miševima pokazali su da smanjena ekspresija α_5 podjedinice deluje facilitatorno na izvođenje nekih memorijskih testova, pa je tokom narednih godina sintetisan veći broj inverznih agonista sa selektivnim afinitetom ili efikasnošću na α_5GABA_A receptorima (Liu i sar., 1996; Quirk i sar., 1996; Sternfeld i sar., 2004; Savić i sar., 2008a).

U pretkliničkim studijama, za većinu ovih supstanci dobijeni su afirmativni rezultati, pri čemu, za razliku od neselektivnih inverznih agonista, nije zabeležen prokonvulzivni efekat. L-655,708, parcijalni inverzni agonista na sva četiri podtipa $GABA_A$ receptora, sa većom funkcionalnom selektivnošću na α_5GABA_A receptorima, poboljšao je učenje pacova u Morisovom vodenom lavirintu (Atack i sar., 2006b). α_5IA-II je supstanca sličnog profila, koja je u dva eksperimenta, u protokolu radne memorije u MVL-u, takođe pokazala promnastičku aktivnost, kao i selektivni uticaj na fazu akvizicije i pozivanja memorije (Collinson i sar., 2006; Dawson i sar., 2006).

RO4938581 je inverzni agonista sa selektivnim afinitetom i efikasnošću na α_5 GABA_A receptorima, koji je uspešno antagonizovao oštećujuće efekte skopolamina i diazepama na učenje pacova u MVL-u. RO4938581 je takođe poboljšao pamćenje u testu prepoznavanja objekta kod majmuna (Ballard i sar., 2009). U kliničkim ispitivanjima, kod zdravih dobrovoljaca, prethodna primena α_5 selektivnog inverznog agoniste značajno je smanjila amnezijski efekat izazvan unosom alkohola, potvrđujući validnost koncepta o značaju α_5 GABA_A receptora u memorijskim procesima zavisnim od hipokampusa (Nutt i sar., 2007).

Međutim, može se reći da precizna uloga α_5 podjedinice u memorijskim efektima benzodiazepina nije u potpunosti rasvetljena. Tome doprinosi činjenica da uticaj diazepama u memorijskim testovima kod *knock in* i *knock out* miševa nije ispitan, kao i nedostatak α_5 -selektivnih pozitivnih modulatora i odgovarajućih farmakoloških istraživanja. Za sada je pokazano da povećana aktivnost na α_5 -podtipu GABA_A receptora može da dovede do oštećenja učenja i pamćenja, što je utvrđeno kod supstance NS-11394, u MVL-u i u testu kontekstualnog uslovljavanja strahom kod pacova (Mirza i sar., 2008; Hofmann i sar., 2012). Međutim, sve veći broj dokaza iz prekliničkih i kliničkih istraživanja upućuje da bi pozitivni modulatori, selektivni za α_5 -podtip GABA_A receptora, mogli imati primenu u poboljšanju kognitivnih disfunkcija povezanih sa starenjem (Koh i sar., 2013).

1.4. Ispitivanje uticaja lekova na učenje i pamćenje kod oglednih životinja

Učenje se najprostije može definisati kao proces usvajanja novih informacija, a pamćenje kao sposobnost očuvanja i pozivanja naučenog. U rasvetljavanju fizioloških procesa koji su u osnovi sticanja, skladištenja i pozivanja memorije, kao i uslova pod kojim dolazi do njihovog oštećenja, ključnu ulogu imaju laboratorijske životinje i životinjski modeli kao surrogati kognitivnih poremećaja kod ljudi (Floresco i sar., 2005).

U eksperimentima sa laboratorijskim životinjama, o naučenom se zaključuje posredno, na osnovu vidljivih bihevioralnih promena, vodeći računa o eventualnom uticaju farmakološke ili neke druge intervencije na senzorne, motorne ili motivacione procese, koji bi mogli ometati pokazivanje naučenog (Cahill i McGaugh 1998; McGaugh i Izquierdo, 2000). Pamćenje se ne dešava u „vakuumu“ i ne postoji trenutno

ni jedna supstanca koja bi uticala samo na pamćenje. Mnoge od njih u izvesnoj meri utiču na pažnju, nivo pobuđenosti ili izvršne funkcije, tako da promene u izvođenju „memorijskog testa“ mogu istovremeno odražavati promenu u bilo kojoj od ovih funkcija (Curran i Mintzer, 2006). Ovo podrazumeva pažljivo dizajniranje eksperimenta, kao i analizu memorijskih i ne-memorijskih komponenti u procesu izvođenja nekog zadatka. U tom koraku od ključnog je značaja izbor odgovarajućeg memorijskog testa (ili više njih), čiji bi se rezultati, uzevši u obzir razlike u kompleksnosti kognitivnih procesa kod glodara i ljudi, mogli sa određenom pouzdanošću ekstrapolirati i na uslove kliničke primene (Lynch, 2011).

Uzimajući u obzir činjenicu da je uglavnom eksplicitna memorija podložna oštećenju (Warrington i Weiskrantz, 1974), i da ona podrazumeva mogućnost svesnog pozivanja sadržaja (što se u kliničkim uslovima pokazuje uglavnom verbalno), postavlja se pitanje koliko se zapravo ova vrsta memorije može pratiti kod neke životinjske vrste (Morris, 2001; Squire, 2004). Međutim, ukoliko se pođe od originalne Tulving-ove (1972) definicije da epizodična memorija (kao podvrsta eksplicitne memorije) podrazumeva informacije o tome „šta, gde i kada“ se desilo, onda se simultano pozivanje i integracija informacija o jednom događaju, uz pomoć ove tri odrednice, može bihevioralno demonstrirati i kod životinja, bez upotrebe jezika (Clayton i sar., 2001). Testovi koji se danas koriste za izučavanje učenja i pamćenja kod laboratorijskih životinja mogu se prema tome okvirno grupisati u dve osnovne kategorije, u zavisnosti od toga da li se njima ispituje deklarativna ili proceduralna memorija. U testove koji su specifični za deklarativnu memoriju spadaju različite varijante lavirinata (Morisov, Barnsov i T - lavirint), test prepoznavanja novog objekta, kontekstualno uslovljavanje strahom i dr., dok se za praćenje proceduralne memorije najčešće biraju klasično i operantno uslovljavanje, test preneraženja ili neki od testova za procenu motornih veština (rotarod) (Squire and Zola, 1996; Paul i sar., 2009). U radovima se često sreće i klasifikacija testova prema regionu mozga koji dominantno reguliše učenje i/ili izvođenje bihevioralnog zadatka. Tako se na primer Morisov, Barnsov i radijalni lavirint smatraju hipokampus-zavisnim testovima (Paul i sar., 2009), testovi bazirani na prepoznavanju novog objekta u velikoj su meri zavisni od integriteta peririnalnog korteksa (Buffalo i sar., 1998), dok je amigdala ključna struktura za testove uslovljavanja strahom (Phelps i LeDoux, 2005).

Memorijski test predstavlja bihevioralnu proceduru kojoj je životinja ponovljeno izložena (najčešće dva, ali i više puta). Prvo izlaganje je učenje (akvizicija), a u nekoj narednoj sesiji, testira se pozivanje naučenog. S obzirom da se farmakološki tretmani mogu primeniti i eliminisati iz organizma za relativno kratko vreme, oni su pogodno eksperimentalno oruđe za izučavanje različitih stadijuma memorije: akvizicije, konsolidacije i pozivanja. U navedenim situacijama, tretmani bi se primenjivali, redom: kratko pre sesije učenja, neposredno nakon sesije učenja ili pre sesije pozivanja. Ipak, eksperimentalno izolovanje različitih stadijuma memorije može biti veoma teško, jer eksperimentalne tehnike mogu da obuhvate ili da utiču na dva ili više stadijuma, zavisno od eksperimentalne procedure i vremena primene tretmana (Abel i Lattal, 2001).

1.4.1. Koncept farmakološkog poboljšanja memorije kod zdravih životinja

Jedno od glavnih pitanja koje se pokreće prilikom ispitivanja potencijalnih prokognitivnih efekata, jeste kako ovi lekovi mogu uticati na kogniciju zdravih subjekata, a kako kod onih sa prirodnim ili eksperimentalno izazvanim oštećenjem kognitivnih funkcija (Floresco i sar., 2005). Brojni su primeri gde je primena različitih supstanci poboljšala određene tipove memorije kod normalnih životinja. S druge strane, postoje i primeri kada su prokognitivni efekti nekih lekova uočeni samo kod životinja koje imaju loše bazalne performanse ili eksperimentalno indukovane deficite, dok kod zdravih životinja nije zapažen nikakav merljiv bihevioralni efekt. Na primer, neki antipsihotici (sulpirid, klozapin), ublažavaju oštećenja pažnje ili memorije koja nastaju nakon remećenja prefrontalnih kortikalnih funkcija, ali isti ovi lekovi oštećuju memoriju kada se primene zdravim subjektima (pregled u Floresco i Jentsch, 2011). Drugi klasičan primer dolazi iz studija sa lekovima koji potenciraju mezokortikalnu dopaminergičku transmisiju. Stimulacija D₁ receptora može imati bifazne efekte na funkcije poput radne memorije, poboljšavajući izvođenje kod životinja kod kojih je bazalna performansa loša, ali oštećujući ponašanje kada je bazalna performansa dobra (Granon i sar, 2000; Chudasama i Robbins, 2004). U tom smislu, ispitivanje prokognitivnih lekova na zdravim životinjama može biti koristan početni skrining, a izostanak efekta nužno ne znači da se oni neće ispoljiti ni kod poremećenih sistema.

U prilog upotrebi normalnih subjekata u procesu otkrivanja prokognitivnih lekova ide i činjenica da patofiziologija, koja bi bila od značaja za pravljenje animalnog modela bolesti, često nije dovoljno poznata, a i kada jeste, obično je teško postići zadovoljavajući stepen analogije u animalnom modelu. Dodatni razlog je i to što u *in vivo* eksperimentima „normalno“ nije isto što i optimalno, u tom smislu što prirodna varijabilnost u funkcionisanju mozga kod normalnih životinja obično predstavlja kontinuum od visokih do niskih sposobnosti, a „bolest“ se može smatrati najnižom tačkom ovog kontinuuma. Konačno, normalne životinje obično ispoljavaju karakteristične odgovore kvalitativno identične onima koje bi ispoljile životinje sa određenim oboljenjem (Floresco i Jentsch, 2011).

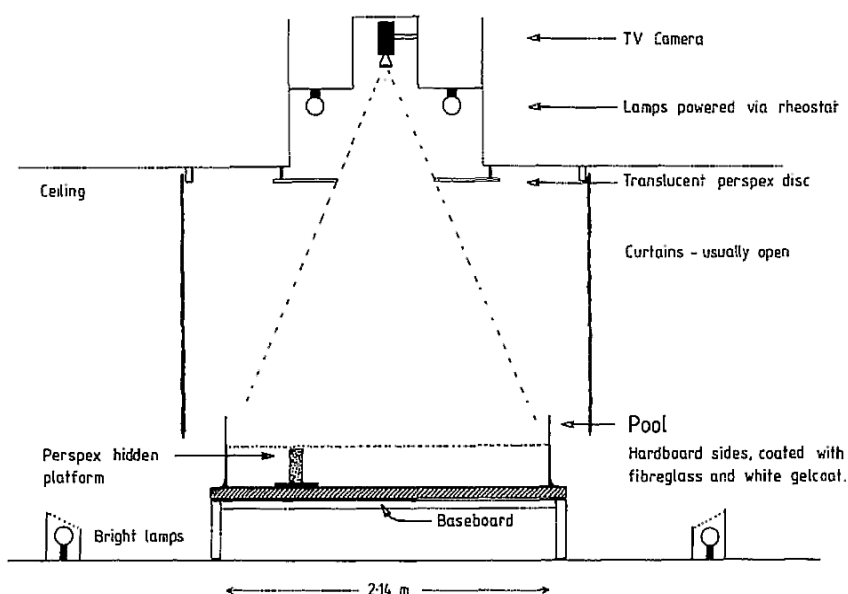
Korišćenje normalnih životinja u ispitivanju lekova namenjenih lečenju subjekata sa kognitivnim oštećenjem ima i određene nedostatke. Dešava se da detektovanje mogućeg poboljšanja bude otežano usled pojave tzv. „efekta plafona“ (eng. *ceiling effect*), koji je povezan sa malom interindividualnom varijabilnošću srednje vrednosti i standardne devijacije praćenog parametra u izabranoj grupi zdravih životinja. Dodatno, patofiziološki procesi inherentni mentalnim oboljenjima mogu značajno umanjiti sposobnost životinje da ispolji farmakološko poboljšanje koje je inače vidljivo kod normalnih subjekata (Floresco i Jentsch, 2011).

1.5. Morisov vodeni lavirint

Morisov vodeni lavirint je jedan od najčešće korišćenih laboratorijskih testova u bihevioralnim neuronaukama, a primenjuje se za proučavanje neurobiologije i neurofarmakologije prostornog učenja i pamćenja kod oglednih pacova i miševa. Prostorna memorija se definiše kao sposobnost učenja orijentacije u novoj sredini (Craver i Darden, 2001). Od svog uvođenja 1984. godine (Morris, 1984) pa do danas, preko 60,000 radova koristi ili citira primenu MVL-a, i danas skoro da ne postoji psihoaktivna supstanca koja nije u njemu testirana.

MVL nije lavirint u uobičajenom smislu – osnovnu aparaturu čine kružni bazen prečnika 1,5-2 m, napunjen vodom sobne temperature, i platforma koja sa nalazi u jednom delu (kvadrantu) bazena, potopljena oko 1,5 cm ispod površine vode (**Slika 2**). Tokom niza pokušaja (treninga) životinje uče da se nakon spuštanja u bazen što brže i

efikasnije orijentišu i nađu put do platforme koja je ujedno i izlaz iz njima neuobičajene vodene sredine. Skraćenje vremena i dužine puta do nalaska platforme (latencije) tokom treninga ukazuje na uspešno savladavanje zadatka. Preporuke su da se koristi 4-6 plivanja dnevno, tokom 5-10 dana, ili dok latencija nalaska platforme ne dostigne asimptotski nivo (Paul i sar., 2009). Vremenom, kako je rasla popularnost i primena MVL-a, razvijen je i veći broj metodoloških varijacija, od kojih su neke i proširile oblast njegove primene (Vorhees i Williams, 2006).



Slika 2. Originalna skica vodenog lavirinta i prateće opreme koju je predložio Morris (1984).

U osnovnoj verziji protokola, „prostornom učenju“ (eng. *spatial acquisition*), platforma je fiksirana tokom celokupnog treninga u jednom kvadrantu bazena (1/4 bazena), a pacovi se puštaju u vodu sa različitih, unapred utvrđenih pozicija, čiji se redosled svakodnevno menja. Nakon završenog treninga, obično 24 h nakon poslednjeg plivanja, platforma se uklanja i izvodi test pozivanja memorije u kojem se procenjuje referentna memorija – sklonost pacova da se kreću ka mestu i oko mesta gde se prethodno nalazila platforma (Morris, 1984). U protokolu „reverznog prostornog učenja“ (eng. *spatial reversal*), nakon završetka klasičnog treninga, platforma se premešta u naspramni kvadrant i pacovi treniraju još nekoliko dana. Ovim protokolom se otkriva koliko brzo životinja, koja je naučila lokaciju platforme, napušta svoju

prvobitnu strategiju plivanja i usmerava pretragu ka novom kvadrantu bazena. Jedan od često korišćenih protokola, naročito pri ispitivanju potencijalnih prokognitivnih lekova, jeste „prostorna radna memorija“ (eng. *spatial working memory*). U ovom protokolu pozicija platforme se menja svakoga dana, a životinja uči da putem pokušaja i pogrešaka svakodnevno preusmerava svoju potragu ka novim delovima bazena. S obzirom na to da je pozicija platforme u toku jednog dana fiksna, indikator učenja je skraćenje latencije nalaska platforme između prvog i drugog plivanja (eng. *saving time*) u toku jednog dana (Vorhees i Williams, 2006).

Osnovna prednost MVL-a, u odnosu na druge testove koji se koriste za proučavanje neurohemijskih osnova učenja i memorije, jeste njegoja jednostavnost i sposobnost razdvajanja deficita u formiranju memorije od deficita u senzornim, motornim i motivacionim procesima, kao i mogućnost primene na različitim vrstama (pacovi, miševi, virtuelni vodeni lavirint kod ljudi) (McNamara i Skelton, 1993a). Sâmo potapanje eksperimentalne životinje u vodu može biti neprijatno, i izazvati određeni nivo stresa, ali su zato izbegnute neke averzivnije procedure, poput uskraćivanja hrane ili izlaganje elektro-šoku (Terry, 2009). MVL ne zahteva prethodni trening, a testiranje se može sprovesti u toku nekoliko dana sa relativno malim brojem životinja. Zdravi, odrasli pacovi mogu savladati najčešće korišćenu verziju testa za 1-5 dana, dostižući asimptotski nivo izvođenja u 10-20 plivanja. Zbog vodene sredine, izbegnut je uticaj olfaktornih tragova, a primenom verzije testa sa vidljivom platformom mogu se identifikovati potencijalna vizuelna oštećenja, koja bi mogla interferirati sa izvođenjem u MVL-u. Promenom lokacije platforme, nakon završenog eksperimenta, može se izvesti eksperiment ponovnog učenja, i na taj način nekoliko doza ispitivane supstance može biti testirano na istoj grupi životinja. Oštećenje memorije u MVL-u izazvano primenom nekog tretmana nezavisno je od lokomotornih efekata, budući da smanjenje ili povećanje lokomocije eventualno utvrđeno „na suvom“ ne utiče nužno i na brzinu plivanja (Fitzgerald i sar., 1989). Pošto uspešnost u nalasku platforme ne zavisi od ukupne aktivnosti ili telesne mase životinje, ovaj test je pogodan za veliki broj modela bolesti u kojima postoji kognitivno oštećenje (Vorhees i Williams, 2006).

Iako je inicijalno razvijen za testiranje pacova, MVL se danas uspešno koristi i za testiranje miševa, a u mnogo manjoj meri i za druge vrste familije *Muridae* (D'Hooge i De Deyn, 2001). U MVL-u, miševi i pacovi pokazuju izvesne razlike u obrascu

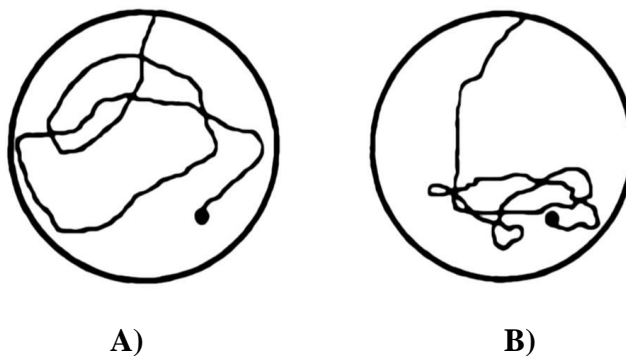
ponašanja, kao i različite strategije nalaženja skrivene platforme. Za razliku od testova „na suvom”, gde miševi i pacovi pokazuju komparabilan nivo izvođenja, Whishaw i Tomie (1996) su pokazali da su u MVL-u pacovi “superiorni” u odnosu na miševе. Ta superiornost se ogleda u bržem učenju pacova, kao i činjenici da miševi generalno provode manje vremena u koridoru koji povezuje startnu poziciju i skrivenu platformu. Miševi se u mnogo manjoj meri oslanjaju na prostornu (*spatial*) strategiju pri traženju platforme, i tokom treninga pokazuju dosta nespecifičnog motornog ponašanja, tigmotaksu, spiralno kretanje i plutanje, što se kasnije odražava i na parametre u testu pozivanja memorije (Frick i sar., 2000). Razlike mogu da postoje i među sojevima jedne iste vrste, ali se one više pripisuju različitoj osetljivosti na stres i manipulaciju nego stvarnim kognitivnim razlikama (pregled literature u D’Hooge i De Deyn, 2001).

1.5.1. Parametri kojima se opisuje ponašanje u MVL-u

Programi koji se koriste za automatsko praćenje ponašanja u MVL-u (ANY-maze i Noldus kao uobičajeni) izračunavaju preko 100 standardnih parametara kojima se kvantifikuje ponašanje životinja u MVL-u, što istovremeno daje mogućnost da se njihovim kombinovanjem izvede veliki broj novih, specifičnijih varijabli. Svi ovi parametri su, u manjoj ili većoj meri, povezani sa ponašanjem usmerenim ka pronalaženju cilja, odnosno, prostornim učenjem i memorijom (Vorhees i Williams, 2006).

Za opisivanje ponašanja pacova u MVL-u tokom treninga, dok životinje kroz niz uzastopnih pokušaja uče da što brže i efikasnije pronađu put do platforme, prvobitno su uvedena tri parametra: latencija nalaska platforme (s), ukupni pređeni put (m) i usmerenost ka cilju (Morris, 1984). Međutim, kako dve životinje mogu imati iste dužine puta i iste ili približne latencije nalaska platforme, a drugačiju strategiju plivanja (**Slika 3**), nametnula se potreba za uvođenjem novih parametara koji bi na potpuniji i precizniji način opisali kompleksno ponašanje životinja u MVL-u i razdvojili kognitivne od nekognitivnih efekata (Gallagher, 1993). Sa razvojem softvera za automatsko praćenje i analizu bihevioralnih eksperimenata, u analizu su uvedeni dodatni parametri poput efikasnosti puta (odnos najkraćeg i realno pređenog puta do platforme), kumulativne udaljenosti od zone platforme (udaljenost između životinje koja pliva i platforme,

izmerena nekoliko puta u sekundi) (Dalm i sar., 2000), indeks učenja (Gallagher i sar., 1993), a za kvantifikaciju tigmotaksičnog ponašanja, procenat vremena i procenat puta pređenog u perifernom delu bazena (Cimadevilla i sar., 2005).

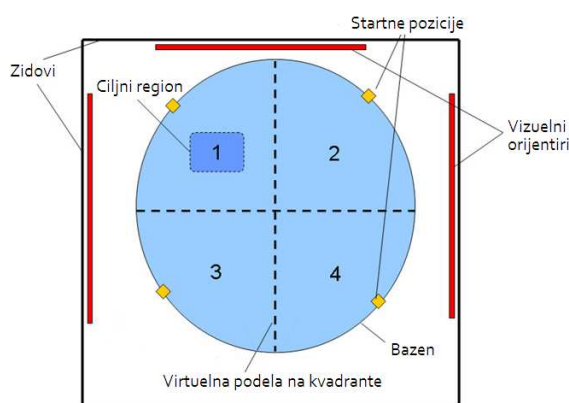


Slika 3. Dve životinje (A i B) imaju približne iste dužine puta (5,73 i 5,90 m), ali je kumulativna udaljenost od zone platforme u prvom slučaju 18,3 m a u drugom slučaju 7,81 m (Gallagher i sar., 1993).

Brzina plivanja (m/s) se obično prati radi utvrđivanja prisustva eventualnih senzomotornih smetnji, izazvanih nekom farmakološkom ili hirurškom intervencijom, a koje bi mogle da ometaju trening, odnosno učenje u MVL-u. Pored brzine plivanja, dobri pokazatelji senzomotornih smetnji su i neuobičajena ponašanja vezana za sâm nalazak platforme, poput preplivavanja, skakanja sa ili odbijanja od platforme, kao i prenaplašena tigmotaksa (Vorhees i Williams, 2006). Smatra se da pacovi koji pronađu platformu, ali se ne popenju i ne ostanu na njoj, nisu stekli neophodnu asocijaciju između platforme i izlaza iz vodene sredine. Neke od ovih pojava mogu se, u blažem stepenu, videti i kod kontrolnih životinja na samom početku treninga, ali obično vrlo brzo iščezavaju. Njihovo duže prisustvo u eksperimentalnoj grupi može znatno otežati tumačenje rezultata iz takvog eksperimenta. Cain (1997) i Whishaw (2004) su pokazali da se odgovarajućim pre-treningom (sa vidljivom ili promenljivom pozicijom platforme) mogu odvojiti kognitivni od nekognitivnih elemenata u ponašanju životinje. Koristi od pretreninga bi mogle da imaju akutne farmakološke studije, kako bi se osiguralo da nekognitivni efekti ne interferiraju sa izvođenjem testa, dok kod studija sa produženom primenom ova dodatna procedura najčešće nije potrebna (Vorhees i Williams, 2006).

Za analizu ponašanja pacova u testu pozivanja memorije biraju se parametri kojima je moguće pokazati postojanje sklonosti ka širem ili užem regionu u kome se

nalazila platforma. Preko 50% istraživača koristi parametre vezane za kvadrant u kome se tokom treninga nalazila platforma (Maei i sar., 2009). Parametri koji se tiču same zone platforme, poput broja ulazaka, vremena ili pređenog puta, nisu pouzdani pokazatelji memorije, jer imaju nisku učestalost ili veliku varijabilnost, posebno u situaciji kada je površina platforme relativno mala, a prečnik bazena veliki (Vorhees i Williams, 2006). Umesto zone platforme, u analizi se mnogo češće koriste pređeni put i vreme provedeno u ciljnom regionu koji se nalazi neposredno oko same platforme i čini do 10% ukupne površine bazena (**Slika 4**).



Slika 4. Prikaz podele bazena na kvadrante i ciljni region (Paul i sar., 2009)

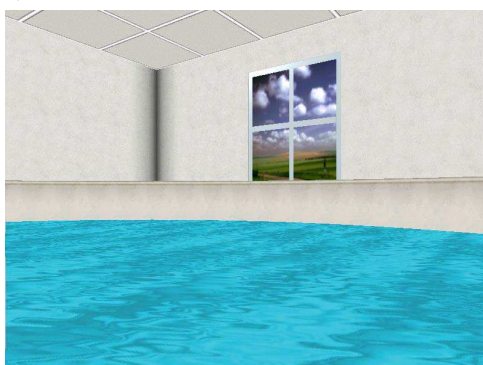
Osim veličine regionâ bazena koji su uzeti u razmatranje, za vrednosti parametara iz testa pozivanja memorije od velikog je značaja i vremenski interval u kojem se prati ponašanje životinje, kao i intenzitet prethodnog treninga. U standardnom petodnevnom protokolu za praćenje prostorne memorije (Vorhees i Williams, 2006), latencija nalaska platforme na kraju petog dana učenja iznosi oko 10 sekundi. Zbog toga se narednog dana, u testu pozivanja memorije, sklonost ka ciljnom kvadrantu/ciljnom regionu najlakše detektuje tokom prvih 30 s testa, nakon čega značajno slabi, da bi se posle 60 s potpuno izgubila (Blokland, 2004).

1.5.2. Primena MVL u ispitivanju učenja i pamćenja kod glodara

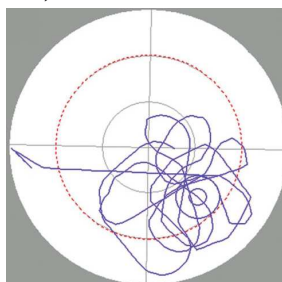
Inicijalno razvijen za ispitivanje neurobiologije i neurofarmakologije prostornog učenja i pamćenja kod pacova, MVL je tokom tri decenije postojanja našao primenu u

ispitivanju uticaja različitih faktora (stres, ishrana, starost, infekcija, trauma) na učenje i pamćenje normalnih životinja, u bihevioralnoj karakterizaciji genetski mutiranih miševa, kao i u validaciji animalnih modela neuroloških i psihijatrijskih oboljenja u kojima postoje značajna kognitivna oštećenja (D’Hooge i De Deyn, 2001). Prostorna orijentacija, navigacija, učenje i pozivanje, procesi koji su neophodni za normalno izvođenje u MVL-u, zavise od koordinirane aktivnosti različitih regiona mozga i neurotransmiterskih sistema koji zajednički čine funkcionalno povezanu neuronsku mrežu. Naročit značaj za normalno izvođenje bihevioralnog zadatka u MVL-u ima funkcionalni integritet hipokampusa, i MVL se pokazao kao pouzdan i robusan test za ispitivanje hipokampus-zavisnog učenja (Vorhees i Williams, 2006). Hipokampus-zavisni kognitivni procesi uključuju dugotrajne promene u sinaptičkoj transmisiji, kao što je indukcija dugotrajne potencijacije (eng. *long-term potentiation*, LTP), a za brojne farmakološke tretmane pokazano je da mogu da menjaju (pospešuju ili inhibiraju) LTP (del Cero i sar., 1992; Seabrook i sar., 1997). Velikoj popularnosti MVL-a doprinela je i činjenica da je virtuelni vodeni lavirint koji se primenjuje kod ljudi (**Slika 5**) takođe visoko osetljiv na hipokampalnu disfunkciju. U klasičnom protokolu sa skrivenom platformom, u virtuelnom trodimenzionalnom vodenom lavirintu, pacijenti sa unilateralnom resekcijom hipokampusa pokazali su značajno lošije rezultate u odnosu na zdrave vršnjake iz kontrolne grupe, i pacijente istih godina koji su bili podvrgnuti ekstrahipokampalnim resekcijama (Goodrich-Hunsaker, 2010).

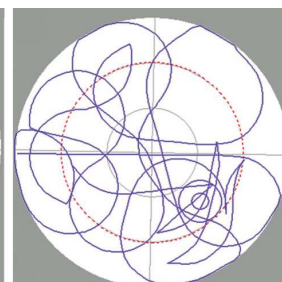
a)



b)



c)



Slika 5. Humani vodeni lavirint: a) virtuelni vodeni lavirint, kako ga vide pacijenti na ekranu; b) putanja zdravih pacijenata u testu pozivanja memorije; c) putanja pacijenata sa oštećenjem hipokampusa (Click, 2005; Goodrich-Hunsaker i Hopkins, 2010).

Hipokampalna formacija podleže značajnoj degeneraciji tokom starosti, i obično je atrofirana kod pacijenata sa Alchajmerovom i Parkinsonovom bolešću, kod šizofrenije, i u uslovima dugotrajne izloženosti visokom nivou stresa (posttraumatski stres sindrom, depresija) (Cole i sar., 2011; Prestia i sar., 2011). S obzirom na to da animalni modeli ovih oboljenja u MVL-u detektuju značajno oštećenje u odnosu na zdrave kontrolne životinje (Logue i sar., 1997; Riedel i sar., 1999; Chen i sar., 2000; Amann i sar., 2010; Rose i Rowe, 2012), MVL je danas nezaobilazan test u skriningu potencijalnih prokognitivnih lekova koji bi našli primenu u navedenim oboljenjima. Veliku primenu MVL ima i u rutinskom ispitivanju neželjenih kognitivnih efekata lekova i rasvetljavanju mehanizma njihovog nastanka, što doprinosi ciljanom dizajnu i razvoju novih supstanci unapređenog farmakološkog i bezbednosnog profila.

1.6. Perspektiva bihevioralne karakterizacije supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora u MVL-u

Ciljana sinteza liganada selektivnih za određene podtipove GABA_A receptora do sada je išla u dva smera: ka pozitivnim modulatorima sa povećanim afinitetom i/ili efikasnošću na α_2 - i α_3 -podtipu GABA_A receptora (anksioselektivni anksiolitici), i ka razvoju novih prokognitivnih lekova, supstanci koje ispoljavaju selektivni inverzni agonizam na nivou α_5 GABA_A receptora (Rudolph i Möhler, 2006). Ovakva postavka uglavnom je bila diktirana rezultatima studija sa genetski modifikovanim miševima. Međutim, genetska ispitivanja nisu u potpunosti rasvetlila uloge određenih podjedinica u bihevioralnim efektima benzodiazepina, niti relativni doprinos svake od njih u onim slučajevima gde je u ispoljavanju uključeno više od jednog podtipa GABA_A receptora, što je slučaj i sa memorijskim efektima. Pregledom dosadašnjih studija može se utvrditi da je uticaj novih liganada na učenje i pamćenje, s izuzetkom inverznih agonista, ispitivan sporadično, i u malom broju memorijskih testova. U samom MVL-u, za benzodiazepine je pokazano da dovode do oštećenja učenja i pamćenja, ali uloga pojedinih podtipova GABA_A receptora u ovim efektima nije sistematski ispitivana. Ispitivanje u MVL-u novih liganada, sa različitim kombinacijama afiniteta vezivanja i efikasnosti na pojedinim podtipovima GABA_A receptora, može doprineti rasvetljavanju receptorskog supstrata anterogradne amnezije pri primeni benzodiazepina, kao i boljem razumevanju

korelacije *in vitro* profila i *in vivo* efekata nakon primene nekog liganda. Krajnji cilj je usmeravanje sinteze novih supstanci ka dobijanju optimalnog farmakološkog profila.

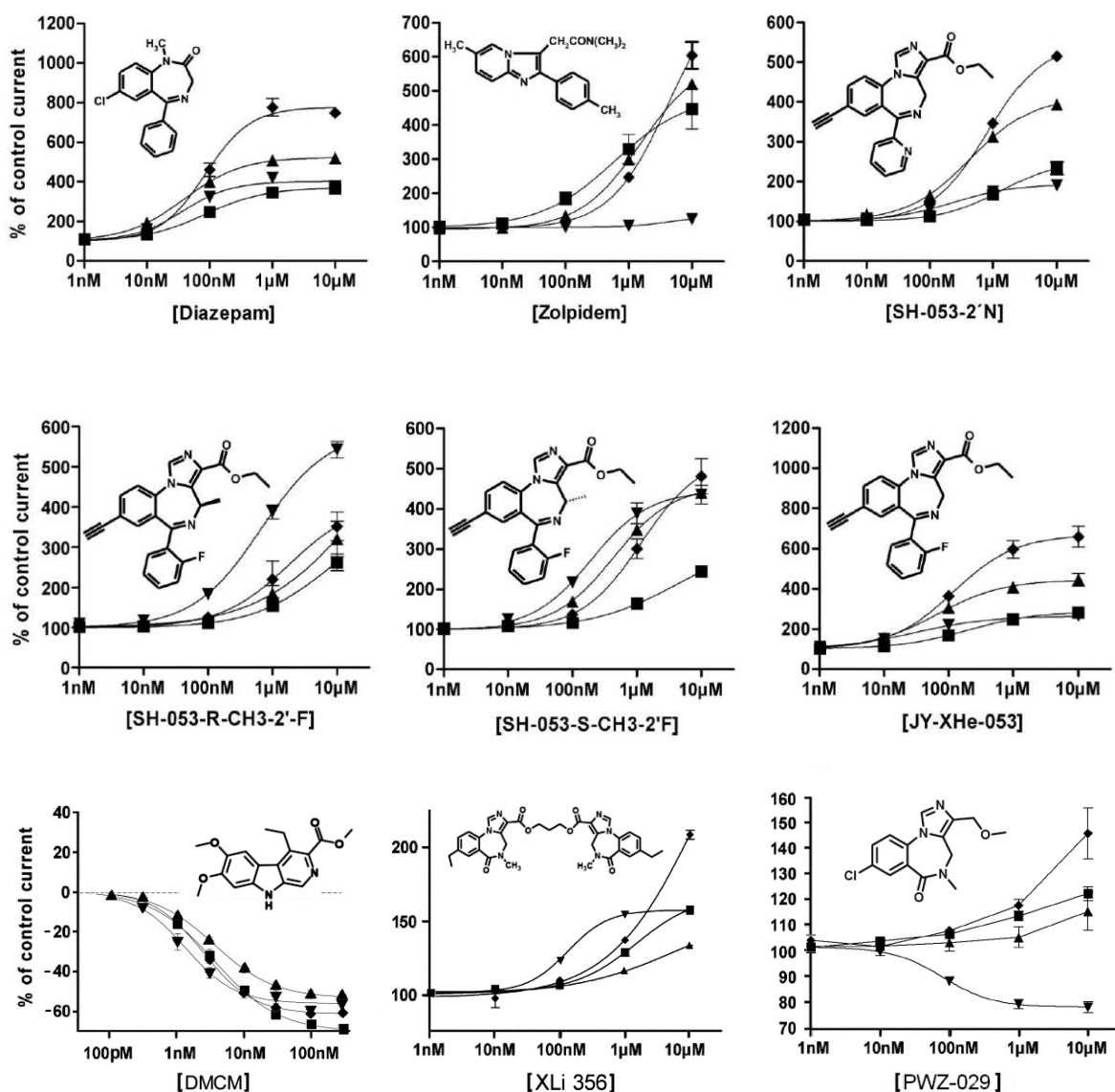
U **Tabeli 1** prikazani su afiniteti, a na **Slici 6** efikasnosti odabranih neselektivnih i selektivnih liganada, koji su planirani da se koriste tokom ovog istraživanja.

Tabela 1. Afiniteti vezivanja (K_i (nM)) dobijeni na rekombinantnim humanim i/ili pacovskim GABA_A receptorima koji sadrže α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_5 ili α_6 podjedinicu (Costa i Guidotti, 1996; Huang i sar., 2000; Platt i sar., 2002; Sanna i sar., 2002, Savić i sar., 2010).

Supstanca	α_1	α_2	α_3	α_4	α_5	α_6
diazepam	14	7,8	13,9	ND*	13,4	ND*
midazolam	1,8	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
zolpidem	26,7	156	383	ND*	>10000	ND*
JY-XHe-053	22	12,3	34,9	ND*	0,7	ND*
SH-053-2'N	300	160	527	ND*	82	5000
SH-053-2'N	118	148	365	5000	77	5000
SH-053-2'F-R-CH ₃	759,1	948,2	768,8	ND*	95,17	ND*
SH-053-2'F-S-CH ₃	468,2	33,27	291,5	ND*	19,2	5000
XLi356	1851,5	4202,5	8545	ND*	100,5	5000
PWZ-029	900	>300	>300	ND*	30	>300
β CCt	0.72	15	18.9	ND*	111	ND*
XLi093	1000	1000	858	1550	15	2000
DMCM	5,7	8,3	4,0	ND*	1,04	ND*

*ND (eng. *not determined*, nije određeno)

Ni jedan od navedenih liganada koji pokazuju selektivnost za neki od podtipova GABA_A receptora (zolpidem, JY-XHe-053, SH-053-2'N, SH-053-2'F-R-CH₃, SH-053-2'F-S-CH₃, XLi356, PWZ-029, β CCt, XLi093) nije do sada testiran u MVL-u, a za neke od njih (npr. XLi356) nema ni publikovanih rezultata iz drugih bihejvioralnih testova. U MVL-u, nije ispitivan ni uticaj DMCM-a, negativnog neselektivnog modulatora GABA_A receptora.



Slika 6. Krive zavisnosti koncentracija-efekat za diazepam, zolpidem, SH-053-2'N, SH-053-R-CH3-2'F, SH-053-R-CH3-2'F, JY-HXe-053, DMCM, XLi356 i PWZ-029, na $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ (■), $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ (▲), $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ (◆), i $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ (▼) GABA_A receptorima, pri EC3 (za DMCM EC20) GABA koncentraciji. Tačke na grafiku su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna greška, dobijene na 2-4 oocita iz najmanje dve serije (Dawson i sar., 2006; Savić i sar., 2010).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovih istraživanja je da se primenom Morisovog vodenog lavirinta ispita uticaj supstanci koje deluju preko benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora na učenje i pamćenje kod oglednih pacova Wistar soja. Specifičnije, cilj je da se uz pomoć supstanci koje imaju različite kombinacije afiniteta i efikasnosti na ovim veznim mestima utvrdi relativni doprinos svake od podjedinica GABA_A receptora u memorijskim efektima koji se zapažaju u korišćenom testu. Istraživanje će se sprovesti kroz sledeće faze:

- 1) opisivanje uticaja diazepama, kao prototipa neselektivnog pozitivnog modulatora, na odabrane parametre ponašanja u Morisovom vodenom lavirintu;
- 2) utvrđivanje stadijuma memorijskog procesa (akvizicija, konsolidacija ili pozivanje memorije) koji je podložan uticaju pozitivnih neselektivnih modulatora, uz pomoć neselektivnog pozitivnog modulatora midazolama;
- 3) ispitivanje uloge α_1 -podtipa GABA_A receptora u ispoljavanju memorijskih efekata neselektivnih modulatora, i to kroz ispitivanje efekata primene α_1 -selektivnog pozitivnog modulatora zolpidema, kao i efekata kombinacije diazepama i α_1 -selektivnog neutralnog modulatora β CCt-a;
- 4) bihejvioralna karakterizacija supstanci koje imaju smanjenu pozitivnu modulatornu aktivnost na α_1 -podtipu GABA_A receptora, a različite kombinacije afiniteta i efikasnosti na ostalim podtipovima GABA_A receptora;
- 5) ispitivanje uloge α_5 -podtipa GABA_A receptora u ispoljavanju memorijskih efekata neselektivnih pozitivnih modulatora, i to ispitivanjem efekata primene α_5 -selektivnog pozitivnog modulatora GABA_A receptora, XLi356, i kombinacije diazepama i α_5 -selektivnog neutralnog modulatora XLi093;
- 6) utvrđivanje mogućnosti poboljšanja memorije kod zdravih pacova primenom neselektivnog (DMCM) i α_5 -selektivnog (PWZ-029) inverznog agoniste GABA_A receptora, u onim fazama učenja za koje smo prethodno našli da su podložne očekivanom oštećenju pod uticajem pozitivnih modulatora.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Životinje

Eksperimenti su izvedeni na zdravim mužjacima pacova Wistar soja, telesne mase 200-250 g, odgajanim na farmi Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Pacovi su držani u standardnim kavezima od pleksiglasa, po šest životinja u jednom kavezu, na sobnoj temperaturi i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (osvetljenje od 06.00 do 18.00 h, intenzitet svetla 120 lx). Životinje su imale pristup hrani i vodi *ad libitum*. Negovanje životinja i bihejvioralno testiranje sprovedeni su tokom svetle faze ciklusa. Sve primenjene procedure odobrene su od strane Etičke komisije Farmaceutskog fakulteta za rad sa oglednim životinjama.

3.2. Supstance

U ispitivanju su korišćeni diazepam, zolpidem i midazolam (Galenika, Beograd, Srbija), DMCM (metil 4-etil-6,7-dimetoksi-9H-pirido[5,4-b]indol-3-karboksilat) (Research Biochemicals Incorporated, Natick, SAD), kao i serija novih supstanci, sintetisanih u saradničkoj laboratoriji profesora James M. Cook-a, Department of Chemistry, University of Wisconsin-Milwaukee, SAD:

a) Supstance selektivne za α_1 -podtip GABA_A receptora:

β -CCt (t-butil- β karbolin-3-karboksilat);

b) Supstance sa smanjenom aktivnošću na α_1 -podtipu GABA_A receptora

JY-XHe-053 (8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]azulen-3-karboksilna kiselina etil estar);

SH-053-2'N (8-etinil-6-(2'-piridin)-4H-2,5,10b-triaza-benzo[e]azulen-3 karboksilna kiselina etil estar);

SH-053-S-CH₃-2'F, (S) stereoizomer (8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-2,5,10b-triazabenz[e]azulen-3-karboksilna kiselina etil estar);

SH-053-R-CH3-2'F, (R) stereoizomer (8-etinil-6-(2-fluorofenil)-4-metil-4H-2,5,10b-triazabenzofenil-3-karboksilna kiselina etil estar);

c) Supstance selektivne za α_5 -podtip GABA_A receptora

XLi356 (3-((12-etil-8-metil-9-okso-2,4,8-triazatriciklo[8.4.0.0[^]{2,6}]tetradeka-1(14),3,5,10,12-penten-5-il}karboniloksi) propil 12-etil-8-metil-9-okso-2,4,8-triazatriciklo[8.4.0.0[^]{2,6}]tetradeka-1(10),3,5,11,13-penten-5-karboksilat);

XLi093 (4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-3-karboksilna kiselina, 8-etinil-5,6-dihidro-5-metil-6-okso-,1,3-propanedil estar);

PWZ-029 (8-hloro-3-(metoksimetil)-5-metil-4H-imidazo[1,5 a][1,4] benzodiazepin-6-on).

Supstance su rastvarane/suspendovane uz pomoć ultrazvučnog kupatila, u farmakološki inertnom vehikulumu koji sadrži 85% destilovane vode, 14% propilenglikola i 1% Tween-a 80. Svi tretmani primenjivani su intraperitonealno (i.p.) u zapremini 1 ml/kg telesne mase eksperimentalne životinje. U slučaju kombinovane primene dva tretmana, životinja je primala po jednu injekciju u donji levi i donji desni kvadrant peritoneuma, u ukupnoj zapremini 2 ml/kg.

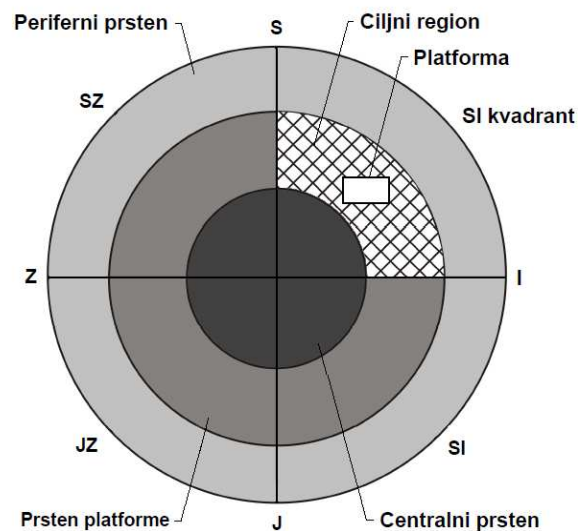
3.3. Morisov vodeni lavirint

Aparaturu čini bazen prečnika 2 m i visine 60 cm izrađen od crne plastike uniformne unutrašnje površine. Bazen je do 30 cm visine napunjen vodom temperature oko 23 °C. Platforma dimenzija 15 cm x 10 cm napravljena je od istog materijala kao i bazen i potopljena 2 cm ispod površine vode, ostajući „nevidljiva“ tokom eksperimenta. Indirektno osvetljenje u eksperimentalnoj prostoriji obezbeđeno je belim neonskim sijalicama pričvršćenim za zid u nivou ispod bazena (**Slika 7**). Tokom treninga životinje uče da se nakon spuštanja u bazen što brže i efikasnije orijentišu i nađu put do platforme koja je ujedno i izlaz iz njima neuobičajene vodene sredine. Nakon treninga, izvodi se test pozivanja memorije u kojem se procenjuje referentna memorija.



Slika 7. Morisov vodeni lavirint.

Motorička aktivnost životinja u MVL-u praćena je digitalnom kamerom povezanom sa ANY-maze softverom koji omogućava virtuelnu podelu bazena na kvadrante i ciljni region i izračunavanje odabranih parametara (**Slika 8**).



Slika 8. Shematski prikaz virtuelne podele Morisovog vodenog lavirinta.

3.4. Eksperimenti

U sklopu prikazanog istraživanja sprovedeno je ukupno 16 eksperimenata. U istraživanju je korišćen „međugrupni“ dizajn, odnosno, različiti tretmani primenjivani su različitim, nezavisnim grupama od po 6-10 životinja i upotrebljeno je 440 pacova. Tokom istraživanja korišćeni su različiti eksperimentalni protokoli MVL-a i njihove modifikacije. Eksperimenti su snimani kamerom montiranom na plafonu iznad bazena, povezanom sa ANY-maze softverom (Stoelting Co., SAD) za praćenje ponašanja i obradu digitalnog zapisa.

3.4.1. Ispitivanje uticaja neselektivnih modulatora na ponašanje pacova u MVL-u

U sklopu ispitivanja uticaja neselektivnih modulatora na ponašanje pacova u MVL-u urađeno je 5 eksperimenata, četiri sa pozitivnim neselektivnim modulatorima (diazepam i midazolam) i jedan sa negativnim neselektivnim modulatorom (DMCM).

U prvom eksperimentu ispitivan je uticaj rastućih doza diazepama na ponašanje pacova u MVL-u. Korišćen je standardni petodnevni protokol u kome su pacovi tokom 5 uzastopnih dana primali odgovarajući tretman (rastvarač, diazepam 1; 1,5; 2 i 5 mg/kg), 20 minuta pre svakog bloka plivanja. Svaki blok sastojao se od 4 plivanja od po maksimalno 2 minuta, sa pauzom od 60 s između dva uzastopna puštanja u vodu. Pri svakom pokušaju, pacovi su spuštani u vodu licem okrenuti ka zidu bazena, i to sa jedne od 4 unapred utvrđene startne pozicije. S obzirom na to da je tokom 5 dana treninga platforma bila fiksirana u severoistočnom kvadrantu (SI), četiri distalne startne pozicije su bile: jug (J), zapad (Z), severozapad (SZ) i jugoistok (JI) (**Slika 8**), i njihov redosled je menjan svakoga dana. Ako tokom 120 s plivanja nađe platformu i popenje se na nju, pacov ostaje na platformi oko 15 s nakon čega ga eksperimentator sklanja. Ukoliko pacov u predviđenom vremenu ne nađe platformu, eksperimentator ga najkraćim putem vodi do platforme i ostavlja na njoj 15 s. Šestog dana, rađen je test pozivanja memorije, u kojem su nakon uklanjanja platforme iz bazena, pacovi puštani da tokom 60 s pretražuju bazen. U testu pozivanja memorije, pacovi su puštani sa nove, od platforme najudaljenije pozicije (jugozapad, JZ) (Vorhees i Williams, 2006). Neposredno pre testa pozivanja memorije pacovi nisu primali nikakav tretman

Materijal i metode

(McNamara i Skelton, 1993a), kako bi se izbegao mogući uticaj nekognitivnih efekata diazepama na izvođenje ovog testa.

U narednom koraku urađena su tri eksperimenta u kojima je ispitivano na koje faze memorijskog procesa (akvizicija, konsolidacija i pozivanje) neselektivni pozitivni modulatori ostvaruju svoj efekat. U ovim eksperimentima korišćena su tri različita eksperimentalna protokola (**Slika 9**), a umesto diazepama korišćen je midazolam (0,5; 1 i 2 mg/kg) kao supstanca sa najbržim početkom dejstva i najkraćim delovanjem među svim benzodiazepinima. Poluvreme eliminacije midazolama kod pacova je manje od 0,5 h (Mandema i sar., 1991; Lau i sar., 1996; Ollkola i sar., 2008), što je od posebnog značaja kod primene tretmana neposredno pre i nakon sesije plivanja, zbog pripisivanja uočenih kognitivnih efekata specifičnom uticaju na akviziciju ili konsolidaciju memorije.

Faza	Akvizicija					Test pozivanja
Dani	I	II	III	IV	V	VI
Tretman	20 min pre testa					-
Plivanje (s)	2 x 120 (svakodnevno)					60
Faza	Konsolidacija					Test pozivanja
Dani	I	II	III	IV	V	VI
Tretman	odmah nakon testa					-
Plivanje (s)	2 x 120 (svakodnevno)					60
Faza	Pozivanje memorije					Test pozivanja
Dani	I	II	III	IV	V	VI
Tretman	Nema					20 min pre testa
Plivanje (s)	2 x 120 (svakodnevno)					60

Slika 9. Protokoli korišćeni za ispitivanje uticaja midazolama na različite stadijume memorijskog procesa.

U petom eksperimentu ispitivan je uticaj rastućih doza neselektivnog negativnog modulatora DMCM-a (0,2; 0,5 i 1 mg/kg) na ponašanje pacova u MVL-u. Korišćena je modifikacija standardnog petodnevnog protokola, sa dva umesto četiri plivanja dnevno, tokom svih 5 dana akvizicije, i testom pozivanja memorije šestog dana. Ovakav protokol, sa manjim brojem plivanja i sporijim učenjem kontrolnih životinja u odnosu na standardni protokol, otvara prostor za ispoljavanje potencijalnog promnesticčkog efekta negativnih modulatora GABA_A receptora (McNamara i Skelton, 1993b).

3.4.2. Ispitivanje uticaja supstanci selektivnih za α_1 -podtip GABA_A receptora na ponašanje pacova u MVL-u

U sklopu ispitivanja uloge α_1 podjedinice GABA_A receptora u ostvarivanju efekata neselektivnih pozitivnih modulatora na ponašanje pacova u MVL-u, urađena su tri eksperimenta, uz primenu jednog pozitivnog (zolpidem) i jednog neutralnog modulatora (β CCt) selektivnog za α_1 -podtip GABA_A receptora.

U prvom i drugom eksperimentu ispitivana je mogućnost antagonizovanja efekata doza od 1,5 i 2 mg/kg diazepama na ponašanje pacova u MVL-u istovremenom primenom α_1 selektivnog neutralnog modulatora β CCt-a (5 i 15 mg/kg). Doza β CCt-a izabrana je na osnovu preliminarnog pilot eksperimenta. Korišćen je standardni petodnevni protokol, sa testom pozivanja šestog dana.

U trećem eksperimentu ispitivan je uticaj rastućih doza zolpidema (0,5; 1 i 2 mg/kg) na ponašanje pacova u MVL-u. Korišćen je standardni petodnevni protokol sa primenom tretmana 20 minuta pre svakog bloka plivanja, tokom 5 uzastopnih dana. Šestog dana urađen je test pozivanja memorije, bez primene tretmana pre plivanja.

3.4.3. Ispitivanje uticaja supstanci sa smanjenom aktivnošću na α_1 -podtipu GABA_A receptora na ponašanje pacova u MVL-u

Urađena su dva eksperimenta u kojima je korišćeno više supstanci, čija je zajednička karakteristika smanjena aktivnost na α_1 -podtipu GABA_A receptora a izraženiji pozitivni modulatorni efekat na ostalim podtipovima GABA_A receptora (α_2 , α_3 i α_5). U oba eksperimenta korišćen je standardni petodnevni protokol sa testom pozivanja memorije šestog dana.

U prvom eksperimentu ispitivan je uticaj rastućih doza JY-X-He-053 (5, 20 i 40 mg/kg) na ponašanje pacova u MVL. Supstanca JY-X-He-053 ispoljava najveći afinitet za α_5 -podtip GABA_A receptora, ali je aktivnost povećana na α_2 -i α_3 -u odnosu na α_1 - i α_5 -podtip GABA_A receptora. U drugom eksperimentu ispitivan je uticaj odgovarajućih doza SH-053-2'N (30 mg/kg), SH-053-S-CH3-2'F (30 mg/kg) i SH-053-R-CH3-2'F (30 mg/kg). Doze su izabrane na osnovu preliminarnih pilot eksperimenata. SH-053-2'N ima nešto veći afinitet vezivanja za α_5 -GABA_A podtip receptora, dok je efikasnost relativno komparabilna na svim podtipovima receptora. SH-053-S-CH3-2'F ima

povećan afinitet za α_2 - i α_5 -podtip GABA_A receptora, dok je efikasnost najveća na α_2 - i α_3 -podtipovima GABA_A receptora. SH-053-R-CH3-2'F ima najveći afinitet i najveću efikasnost na α_5 -podtipu GABA_A receptora.

3.4.4. Ispitivanje uticaja supstanci selektivnih za α_5 -podtip GABA_A receptora na ponašanje pacova u MVL-u

U okviru ispitivanja uticaja supstanci selektivnih za α_5 -podtip GABA_A receptora urađeno je šest eksperimenata, u kojima su korišćeni pozitivni (XLi356), negativni (PWZ-029) i neutralni modulatori (XLi093) selektivni za α_5 -podtip GABA_A receptora.

U prvom i drugom eksperimentu ispitivana je mogućnost antagonizovanja efekata diazepama (1,5 i 2 mg/kg) istovremenom primenom selektivnog neutralnog modulatora XLi093 (10 i 20 mg/kg). Doze XLi093 izabrane su na osnovu preliminarnog pilot eksperimenta. Korišćen je standardni petodnevni protokol sa testom pozivanja memorije šestog dana. U trećem eksperimentu ispitivan je uticaj selektivnog pozitivnog modulatora XLi356 (5, 10 i 20 mg/kg) na ponašanje pacova u MVL-u. Korišćen je modifikovani jednodnevni protokol (uporedi u Kraemer i sar., 1996; Ballard i sar., 2009), u kojem su pacovi u toku jednog dana imali tri bloka plivanja od po 4 pokušaja, sa pauzama od 1 sat između svakog bloka. Svaki pokušaj trajao je 2 minuta. Drugog dana urađen je test pozivanja memorije bez platforme i bez tretmana.

U četvrtom, petom i šestom eksperimentu ispitivan je uticaj PWZ-029, α_5 -selektivnog negativnog modulatora. PWZ-029 je ispitivan u tri različita protokola: u već opisanim modifikacijama jednodavnog (5, 10 i 15 mg/kg) i standardnog petodavnog protokola (5, 15 i 30 mg/kg), kao i u protokolu radne memorije (0,2; 2, 10 i 20 mg/kg). Osnovna karakteristika protokola radne memorije je svakodnevna promena pozicije platforme tokom 4 dana treninga, tokom kojih se pacovima ne primenjuje nikakav tretman (Collinson i sar., 2006). Na dan testiranja, platforma se postavlja u novu poziciju, i pre prvog puštanja u bazen primenjuje se tretman (PWZ-029 0,2; 2, 10 i 20 mg/kg). Nakon 4 sata pauze pacovi se puštaju u bazen drugi put, i na osnovu razlike u trajanju prvog i drugog plivanja izračunava skraćenje latencije nalaska platforme.

3.4.5. Parametri kojima je opisano ponašanje pacova u MVL

U našim eksperimentima su tokom treninga praćeni osnovni parametri, koji se najčešće koriste u eksperimentima u MVL-u:

- latencija nalaska platforme (s)
- ukupni pređeni put (m)
- prosečna brzina plivanja (m/s) i
- efikasnost puta (odnos između najkraćeg mogućeg puta do platforme i stvarno pređenog puta).

Pošto tigmotaksa (tendencija plivanja ili plutanja uz sami zid bazena) predstavlja činilac koji doprinosi velikoj varijansi u vodenom lavirintu, i normalno slabi tokom niza plivanja (Vorhees i Williams, 2006), dodatno su praćeni i izvedeni parametri poput procenta vremena i procenta pređenog puta u perifernom prstenu bazena. U eksperimentu radne memorije praćeno je skraćenje latencije (s) koje predstavlja razliku u vremenima nalaska platforme između prvog i drugog plivanja (Collinson i sar., 2006).

U testu pozivanja memorije, standardno su praćeni put i vreme u SI kvadrantu, ciljnom regionu i perifernom prstenu, a po potrebi analizirani su i drugi parametri koji bi, u datim eksperimentalnim uslovima, doprineli boljem razumevanju uticaja prethodno davanih tretmana na pozivanje memorije (npr. latencija ulaska i efikasnost puta do ciljnog regiona ili broj ulazaka u SI kvadrant).

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka urađena je uz pomoć SigmaStat 11.0 softvera. Za analizu parametara dobijenih u toku treninga korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponavljanim merenjem, gde su faktori tretman i dan/blok testiranja. Za svaku životinju i svaki parametar podaci iz jednog dana su uprosečeni kao srednja vrednost četiri plivanja, a u slučajevima jednodnevnih eksperimenata gde je bilo 3 bloka od po 4 plivanja u toku istog dana, za svaku životinju uzimana je srednja vrednost tokom svakog bloka plivanja. U slučaju da je interakcija između faktora tretman i faktora dan značajna, rađeno je pet nezavisnih jednofaktorskih ANOVA za svaki dan

Materijal i metode

/blok treninga. Parametri iz testa pozivanja memorije analizirani su primenom jednofaktorske ANOVE. Za *post-hoc* analizu korišćen je *Student–Newman–Keuls* test. U svim testovima, razlike na nivou $p < 0,05$ uzimane su kao statistički značajne. Podaci na graficima su prikazani kao srednje vrednosti dana/blokova \pm standardna greška.

4. REZULTATI

4.1. Neselektivni modulatori benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora

Eksperiment 1

U Eksperimentu 1 praćen je uticaj rastućih doza diazepama (1, 1,5; 2 i 5 mg/kg) na ponašanje pacova u MVL-u. Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj oba faktora (tretman i dan) na sve parametre praćene tokom **5 dana treninga**: latenciju nalaska platforme (s), pređeni put (m), efikasnost puta, procenat vremena i procenat pređenog puta u perifernom prstenu i prosečnu brzinu plivanja (m/s). Rezultati dvofaktorske analize varijanse prikazani su u **Tabeli 2**, a rezultati *post hoc* testa u **Tabeli 2a**.

Tabela 2. Uticaj ponavljane primene rastućih doza diazepama na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(4,30)}=13,100$ $P<0,001$	$F_{(4,120)}=40,335$ $P<0,001$	$F_{(16,120)}=1,762$ $P=0,044$
Pređeni put (m)	$F_{(4,30)}=7,813$ $P<0,001$	$F_{(4,120)}=21,475$ $P<0,001$	$F_{(16,120)}=2,402$ $P=0,004$
Efikasnost puta	$F_{(4,30)}=8,077$ $P<0,001$	$F_{(4,120)}=25,595$ $P<0,001$	$F_{(16,120)}=3,537$ $P<0,001$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(4,30)}=7,093$ $P<0,001$	$F_{(4,120)}=47,950$ $P<0,001$	$F_{(16,120)}=2,611$ $P=0,002$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(4,30)}=5,788$ $P=0,001$	$F_{(4,120)}=39,097$ $P<0,001$	$F_{(4,120)}=3,680$ $P<0,001$
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(4,30)}=6,203$ $P<0,001$	$F_{(4,120)}=40,958$ $P<0,001$	$F_{(16,120)}=1,347$ $P=0,181$

Grupe koje su primile 1,5; 2 i 5 mg/kg diazepama imale su značajno duže latencije nalaska platforme (**Slika 10a**), duži pređeni put (**Slika 10b**), manju efikasnost puta (**Slika 11a**), kao i veći procenat vremena (**Slika 12a**) i puta u perifernom prstenu (**Slika 12b**), i u odnosu na kontrolnu grupu i u odnosu na grupu koja je primila 1 mg/kg diazepama.

Rezultati

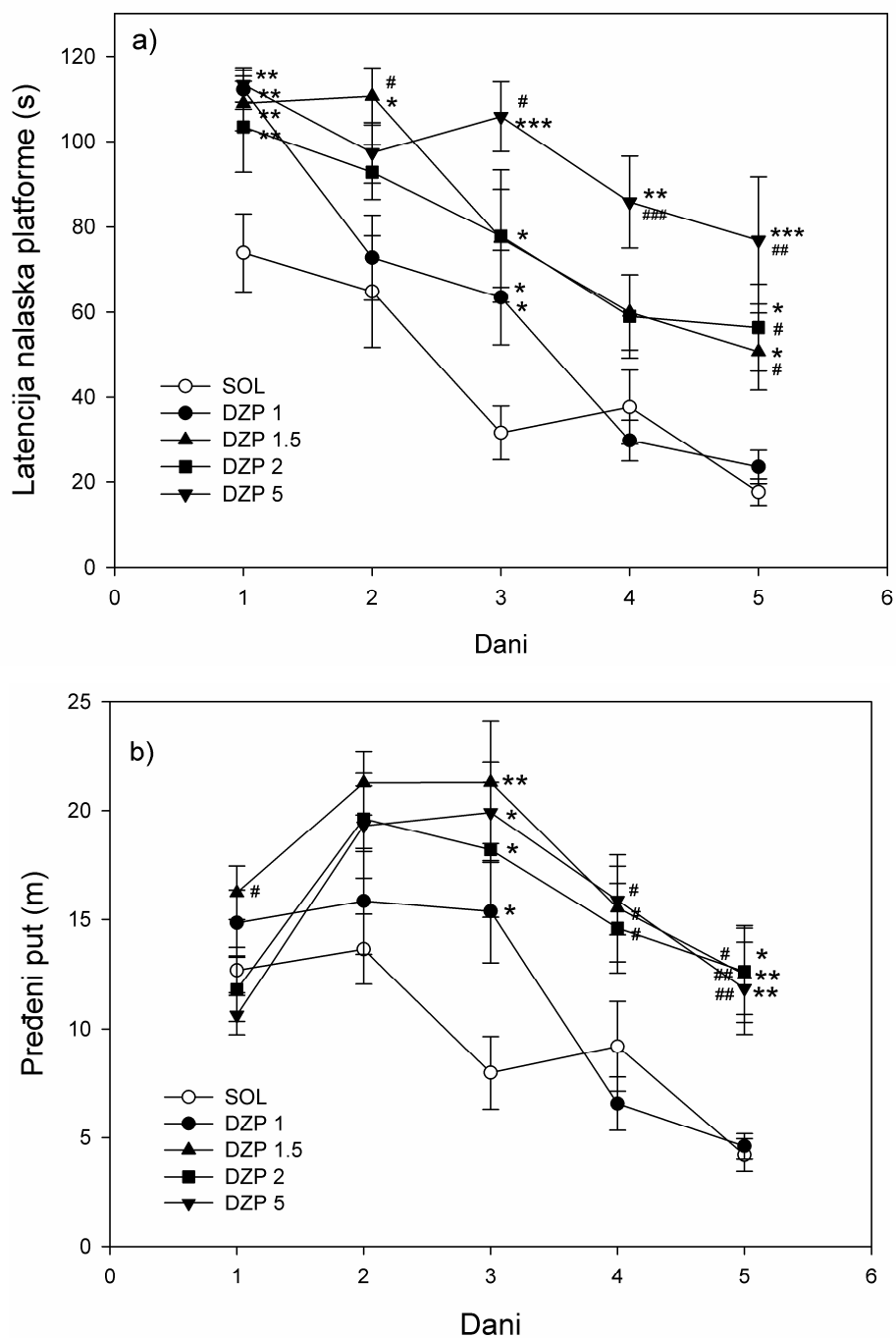
Tabela 2a. Rezultati *post hoc* analize nakon dvofaktorske ANOVE za praćene parametre (p vrednosti).

Parametri	DZP 1,5		DZP 2		DZP 5	
	SOL	DZP 1	SOL	DZP 1	SOL	DZP 1
Latencija (s)	<0,001	0,026	<0,001	0,030	<0,001	<0,001
Pređeni put (m)	<0,001	0,006	0,004	0,023	0,005	0,047
Efikasnost puta	0,001	0,012	0,002	0,010	0,001	0,014
Vreme u perifernom prstenu (%)	0,020	0,030	0,034	0,073	0,005	0,006
Put u perifernom prstenu (%)	0,012	0,015	0,033	0,029	0,002	0,002

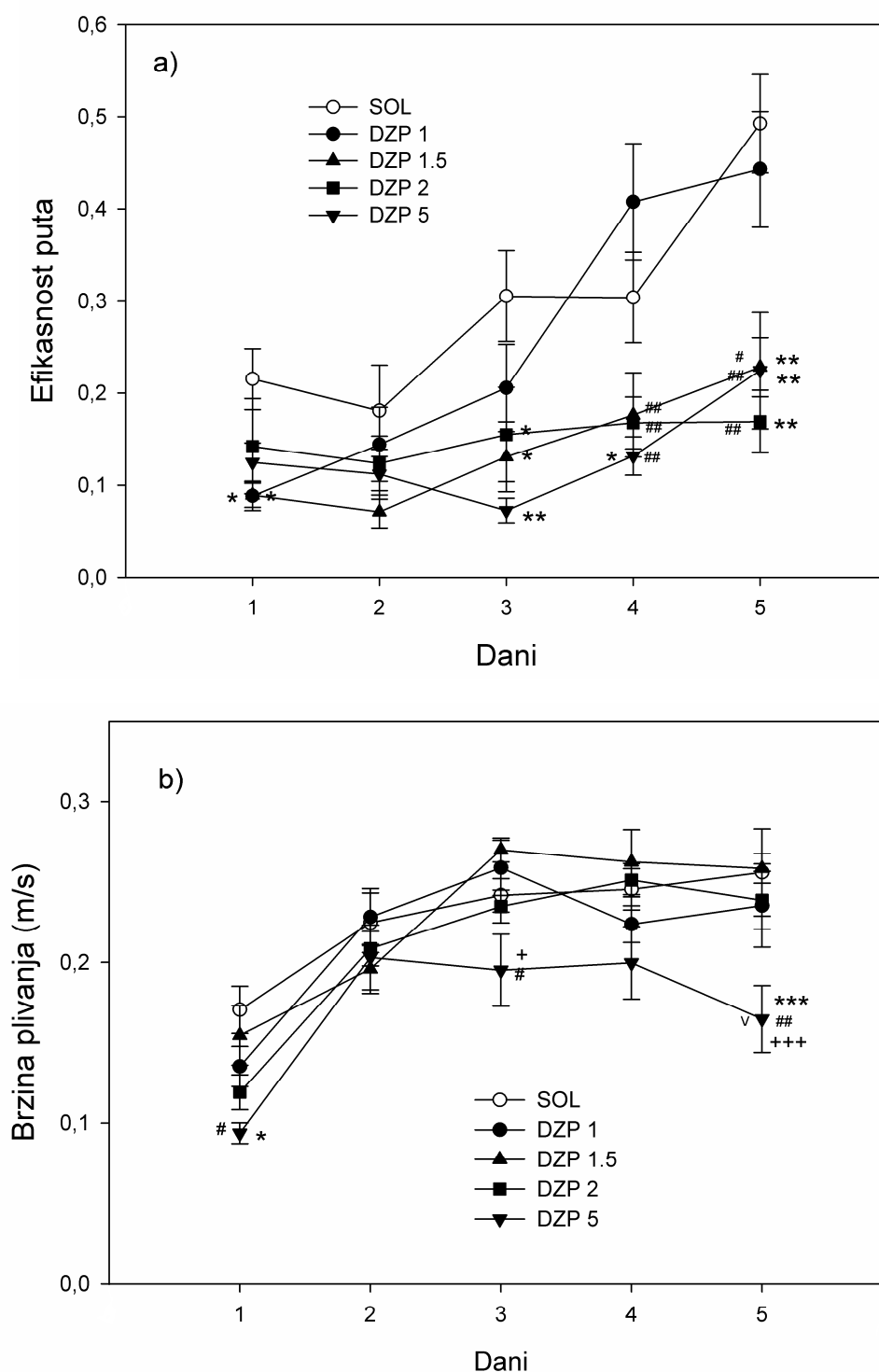
Grupa koja je primala 5 mg/kg diazepama plivala je značajno sporije u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,002$), ali i u odnosu na ostale tri grupe koje su primale 1, 1,5 i 2 mg/kg diazepama ($p=0,001$, $p=0,005$ i $p=0,006$) (**Slika 11b**). S obzirom na značajnu interakciju između faktora dan i tretman, za latenciju nalaska platforme, pređeni put, efikasnost puta i procenat vremena i puta u perifernom prstenu, urađeno je pet jednofaktorskih ANOVA, za svaki dan treninga, a rezultati su prikazani u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Uticaj ponavljane primene rastućih doza diazepama na parametre praćene tokom pet dana treninga (jednofaktorska ANOVA po danima).

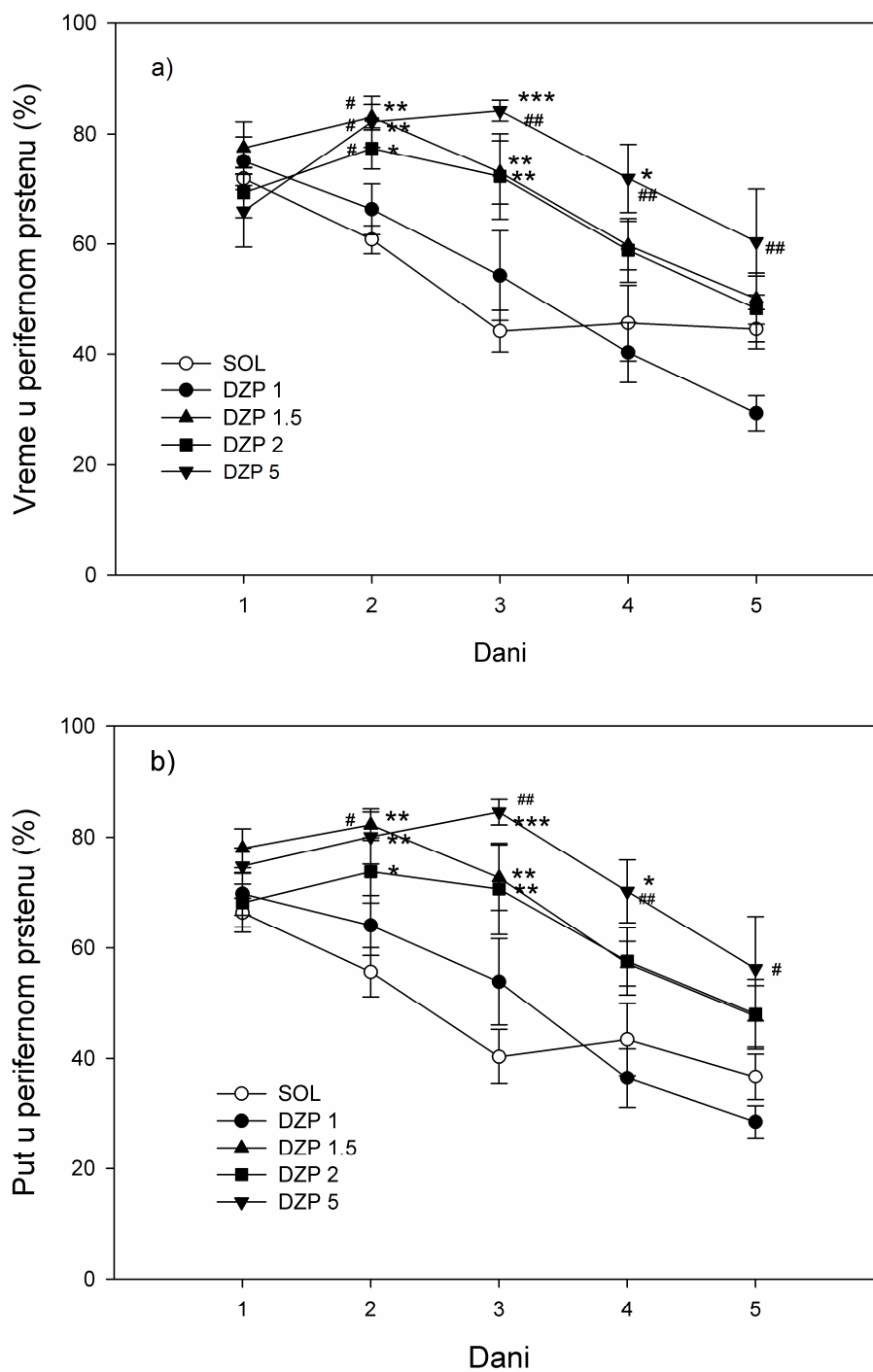
Parametar	I dan	II dan	III dan	IV dan	V dan
Latencija (s)	$F_{(4,30)}=4,863$ $P=0,004$	$F_{(4,30)}=4,270$ $P=0,007$	$F_{(4,30)}=6,050$ $P=0,001$	$F_{(4,30)}=6,177$ $P<0,001$	$F_{(4,30)}=6,890$ $P<0,001$
Pređeni put (m)	$F_{(4,30)}=3,280$ $P=0,024$	$F_{(4,30)}=2,600$ $P=0,056$	$F_{(4,30)}=4,490$ $P=0,006$	$F_{(4,30)}=4,830$ $P=0,004$	$F_{(4,30)}=6,730$ $P<0,001$
Efikasnost puta	$F_{(4,30)}=2,915$ $P=0,038$	$F_{(4,30)}=1,361$ $P=0,271$	$F_{(4,30)}=4,326$ $P=0,007$	$F_{(4,30)}=6,859$ $P<0,001$	$F_{(4,30)}=8,165$ $P<0,001$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(4,30)}=0,940$ $P=0,457$	$F_{(4,30)}=7,200$ $P<0,001$	$F_{(4,30)}=7,290$ $P<0,001$	$F_{(4,30)}=4,670$ $P=0,005$	$F_{(4,30)}=3,670$ $P=0,015$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(4,30)}=1,610$ $P=0,198$	$F_{(4,30)}=5,630$ $P=0,002$	$F_{(4,30)}=7,770$ $P<0,001$	$F_{(4,30)}=5,600$ $P=0,002$	$F_{(4,30)}=3,160$ $P=0,028$



Slika 10. Uticaj 1, 1,5: 2 i 5 mg/kg diazepama na a) latenciju nalaska platforme i b) pređeni put tokom pet dana treninga u MVL-u. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ i ### $p < 0,001$ u odnosu na DZP 1. Broj životinja po grupi je 7 (Slike 10-16).



Slika 11. Uticaj 1, 1,5; 2 i 5 mg/kg diazepama (DZP) na a) efikasnost puta i b) brzinu plivanja, tokom pet dana treninga u MVL-u. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ u odnosu na DZP 1. + $p < 0,05$ i +++ $p < 0,001$ u odnosu na DZP 1,5; $v p < 0,05$ u odnosu na DZP 2.



Slika 12. Uticaj 1, 1,5; 2 i 5 mg/kg diazepama (DZP) na a) procenat vremena i b) procenat predenog puta u perifernom prstenu, tokom pet dana treninga u MVL-u. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ u odnosu na DZP 1.

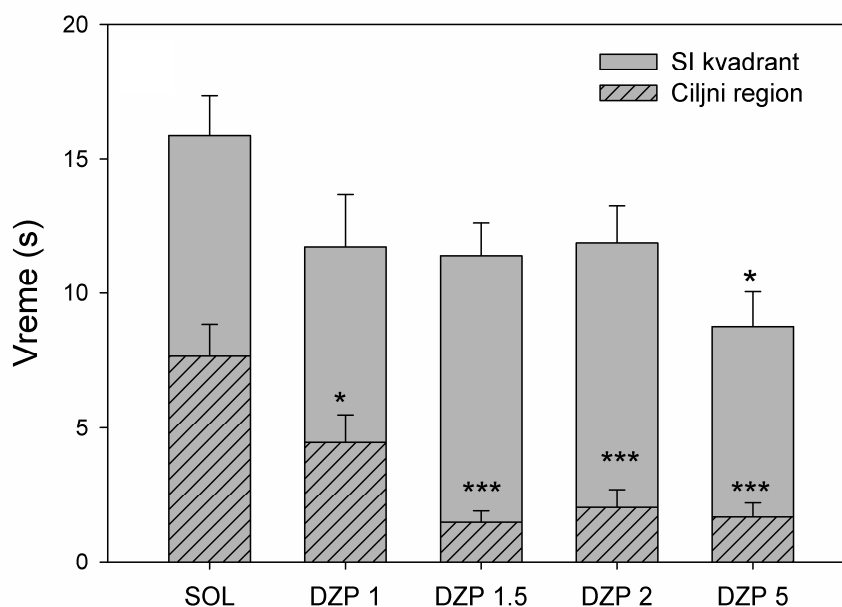
Rezultati

Za sve parametre praćene u **testu pozivanja memorije**, osim za pređeni put u SI kvadrantu, jednofaktorska ANOVA je pokazala da postoji značajna razlika među grupama zavisno od tretmana koji im je primenjivan u toku pet dana treninga. Rezultati jednofaktorske ANOVE prikazani su u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Uticaj ponavljane primene rastućih doza diazepama na parametre praćene u testu pozivanja memorije (jednofaktorska ANOVA).

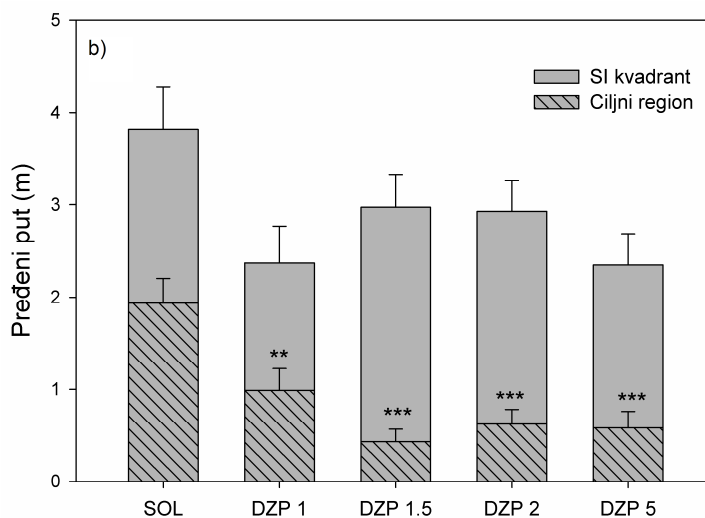
Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put	Vreme	Put	Vreme	Put	Vreme
$F_{(4,30)}$	2,428	2,927	9,126	10,369	8,066	11,281
P	0,070	0,037	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Post hoc *Student–Newman–Keuls* je pokazao je da sve životinje koje su primale diazepam tokom pet dana treninga, u testu pozivanja memorije provode manje vremena u ciljnom regionu u odnosu na kontrolnu grupu, a da grupa koja je primala 5 mg/kg diazepam provodi i manje vremena u SI kvadrantu nego kontrolna grupa (**Slika 13**).



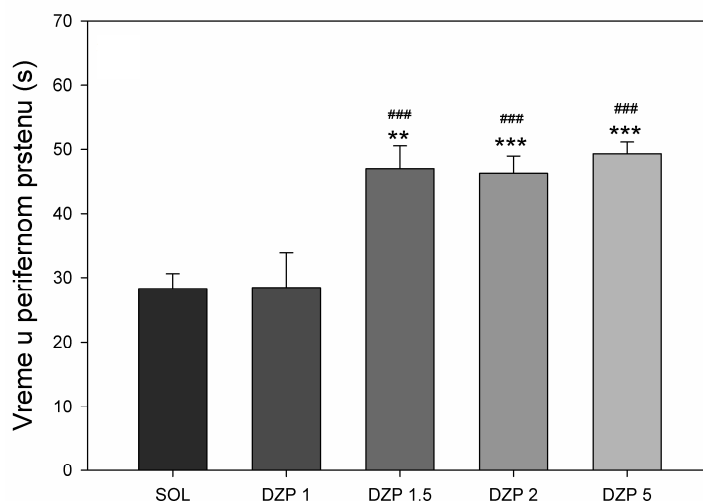
Slika 13. Uticaj primene 1, 1,5; 2 i 5 mg/kg diazepama (DZP) tokom pet dana treninga na vreme u SI kvadrantu i ciljnom regionu u testu pozivanja memorije * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).

Grupe koje su primale 1, 1,5; 2 i 5 mg/kg diazepama prešle su kraći put u ciljnom regionu u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 14).

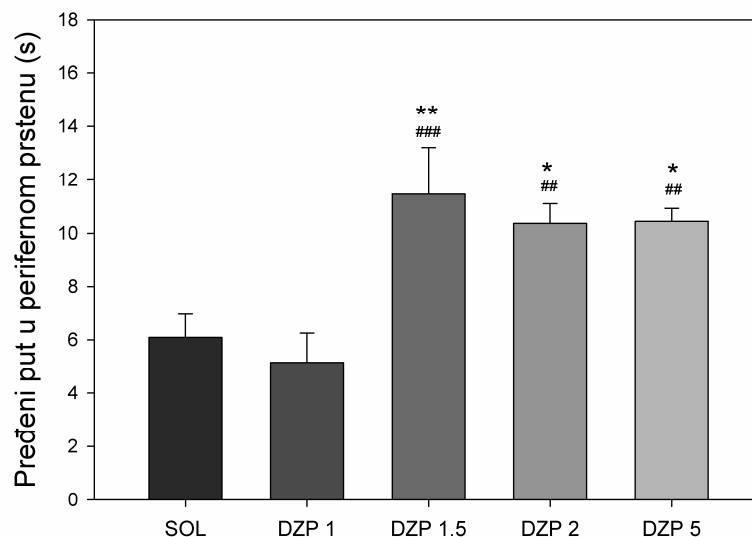


Slika 14. Uticaj primene 1, 1,5; 2 i 5 mg/kg diazepama (DZP) tokom pet dana treninga na put pređen u SI kvadrantu i ciljnom regionu u testu pozivanja memorije **p<0,01 i *p<0,001 u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).**

Kada su u pitanju parametri koji prate očuvanost tigmotakse, grupe koje su tokom treninga primale 1,5; 2 i 5 mg/kg diazepama provodile su značajno više vremena (Slika 15) i prelazile značajno duži put (Slika 16) u perifernom prstenu u odnosu na kontrolnu grupu, ali i u odnosu na grupu koja je primala 1 mg/kg diazepama.



Slika 15. Uticaj primene 1, 1,5; 2 i 5 mg/kg diazepama (DZP) tokom pet dana treninga na vreme u perifernom prstenu tokom testa pozivanja memorije. *p<0,001 u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); ###p<0,001 u odnosu na DZP 1.**



Slika 16. Uticaj primene 1, 1,5; 2 i 5 mg/kg diazepama (DZP) tokom pet dana treninga na put pređen u perifernom prstenu tokom testa pozivanja memorije. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); ### $p < 0,01$ i #### $p < 0,001$ u odnosu na DZP 1.

Eksperiment 2

U Eksperimentu 2 praćen je uticaj midazolama (0,5; 1 i 2 mg/kg) na akviziciju. Rezultati dvofaktorske ANOVE sa ponavljanjem za parametre praćene tokom **pet dana treninga** (latencija (s), pređeni put (m), efikasnost puta, procenat vremena i procenat pređenog puta u perifernom prstenu, prosečna brzina plivanja (m/s)) prikazani su u **Tabeli 5**. Faktor dan imao je značajan uticaj na sve parametre, dok je faktor tretman bio značajan za sve parametre, osim za latenciju nalaska platforme, gde je bio na granici značajnosti.

Interakcija između faktora tretman i dan bila je značajna za latenciju nalaska platforme, efikasnost puta i procenat vremena i puta u perifernom prstenu, pa je u tim slučajevim urađena jednofaktorska ANOVA po danima (**Tabela 6**).

Tabela 5. Uticaj ponavljane primene rastućih doza midazolama na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(3,20)}=3,04$ $P=0,053$	$F_{(4,80)}=29,27$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=2,42$ $P=0,010$
Pređeni put (m)	$F_{(3,20)}=5,78$ $P=0,005$	$F_{(4,80)}=20,67$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=1,38$ $P=0,192$
Efikasnost puta	$F_{(3,20)}=4,20$ $P=0,019$	$F_{(4,80)}=9,23$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=3,86$ $P<0,001$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,20)}=3,60$ $P=0,031$	$F_{(4,80)}=54,65$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=3,14$ $P=0,001$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,20)}=3,19$ $P=0,005$	$F_{(4,80)}=20,67$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=2,55$ $P=0,007$
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(3,20)}=8,15$ $P<0,001$	$F_{(4,80)}=15,29$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=0,91$ $P=0,537$

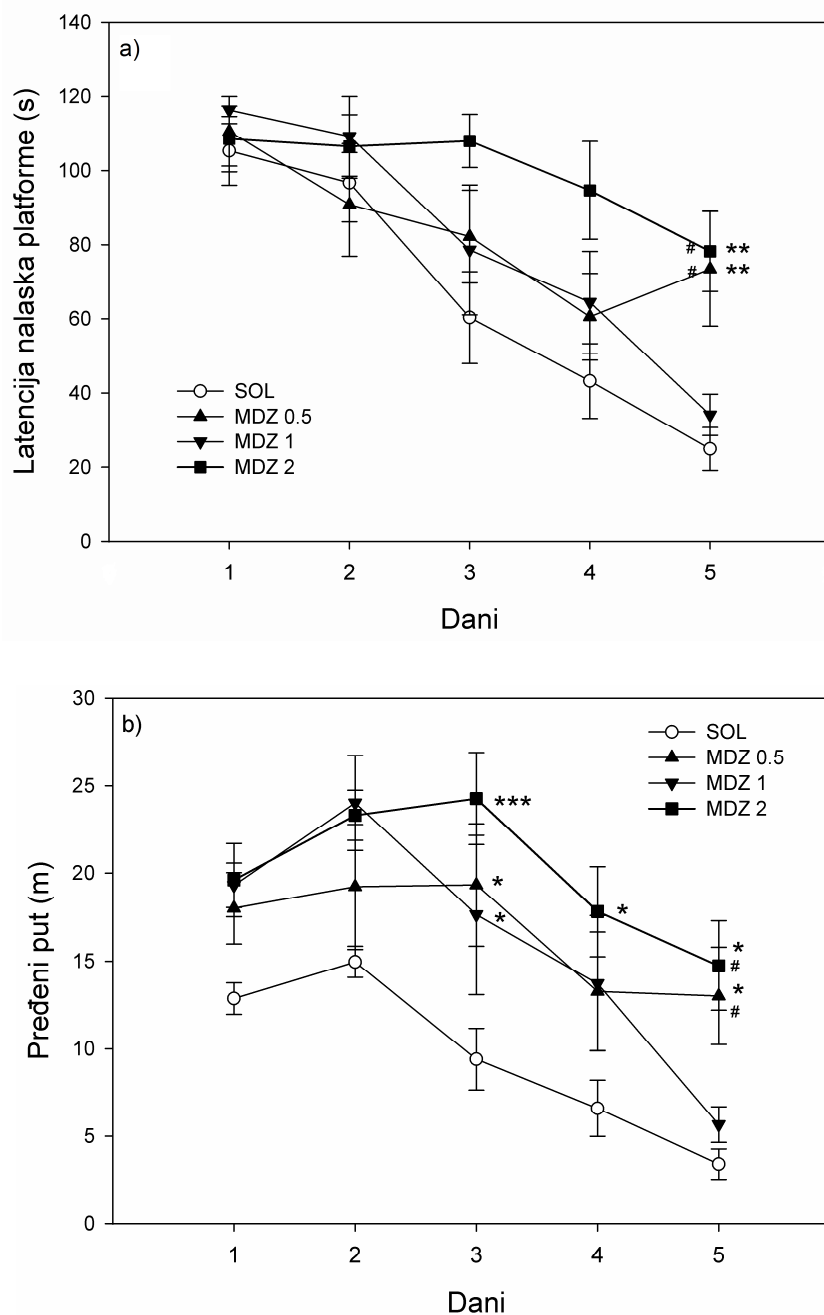
Tabela 6. Uticaj ponavljane primene rastućih doza midazolama na odabrane parametre tokom pet dana treninga (jednofaktorska ANOVA po danima).

Parametar	I dan	II dan	III dan	IV dan	V dan
Latencija (s)	$F_{(3,20)}=0,32$ $P=0,810$	$F_{(4,30)}=0,59$ $P=0,629$	$F_{(3,20)}=2,30$ $P=0,108$	$F_{(3,20)}=3,04$ $P=0,053$	$F_{(3,20)}=6,98$ $P=0,002$
Efikasnost puta	$F_{(3,20)}=0,43$ $P=0,731$	$F_{(3,20)}=0,355$ $P=0,654$	$F_{(3,20)}=2,299$ $P=0,108$	$F_{(3,20)}=6,256$ $P=0,004$	$F_{(3,20)}=8,62$ $P<0,001$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,20)}=0,43$ $P=0,731$	$F_{(3,20)}=0,43$ $P=0,731$	$F_{(4,30)}=7,29$ $P<0,001$	$F_{(4,30)}=4,67$ $P=0,005$	$F_{(4,30)}=3,67$ $P=0,015$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,20)}=1,86$ $P=0,169$	$F_{(3,20)}=1,08$ $P=0,38$	$F_{(3,20)}=2,76$ $P=0,069$	$F_{(3,20)}=4,94$ $P=0,021$	$F_{(3,20)}=9,97$ $P<0,001$

Grupe koje su primale 0,5 i 2 mg/kg midazolama imale su petog dana značajno duže latencije u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,009$ i $p=0,008$), ali i u odnosu na grupu koja je primala 1 mg/kg midazolama ($p=0,013$ i $p=0,01$) (Slika 17a). Sve tri grupe koje su primale midazolam (0,5; 1 i 2 mg/kg) prelazile su i značajno duži put do nalaska platforme u odnosu na kontrolne životinje ($p=0,031$, $p=0,019$ i $p=0,003$). Ovaj efekat je bio najizraženiji kod grupe koja je primala 2 mg/kg midazolama, gde je zapažena

Rezultati

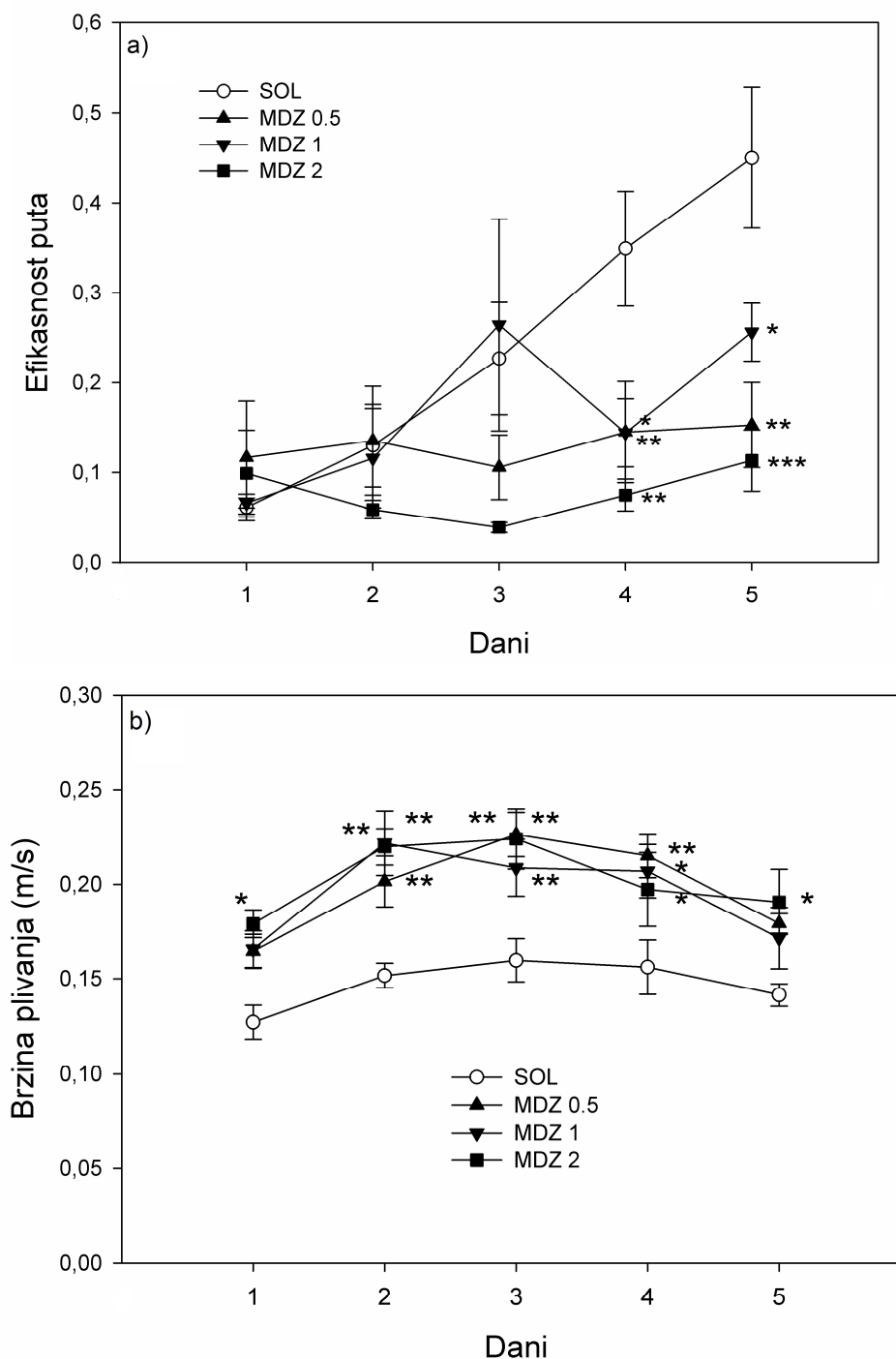
značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu od trećeg do petog dana treninga ($p < 0,001$, $p = 0,014$ i $p = 0,012$), a petog dana i u odnosu na grupu koja je primala 1 mg/kg midazolama (Slika 17b).



Slika 17. Uticaj 0,5; 1 i 2 mg/kg midazolama na a) latenciju nalaska platforme i b) ukupni pređeni put, tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ u odnosu na MDZ 1. Broj životinja po grupi je 6 (Slike 17-22).

Rezultati

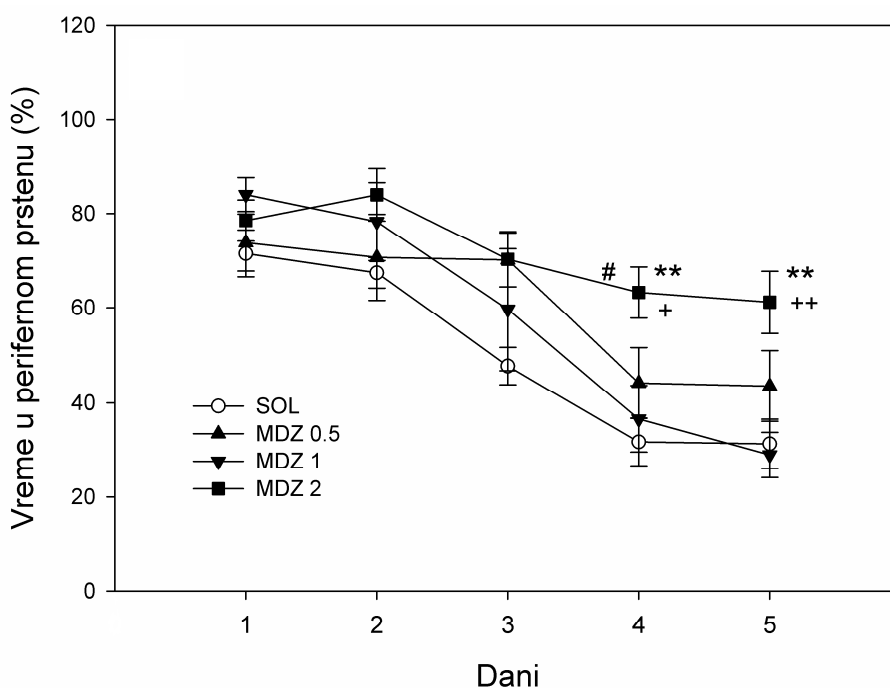
Grupa koja je primala 2 mg/kg midazolama imala je značajno nižu efikasnost puta ($p=0,012$) u odnosu na kontrolu (**Slika 18a**), a sve tri grupe midazolama imale su značajno nižu prosečnu brzinu plivanja ($p=0,002$, $p=0,001$ i $p=0,002$) u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 18b**).



Slika 18. Uticaj rastućih doza midazolama na a) efikasnost puta i b) brzinu plivanja tokom pet dana treninga. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ i * $p<0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).**

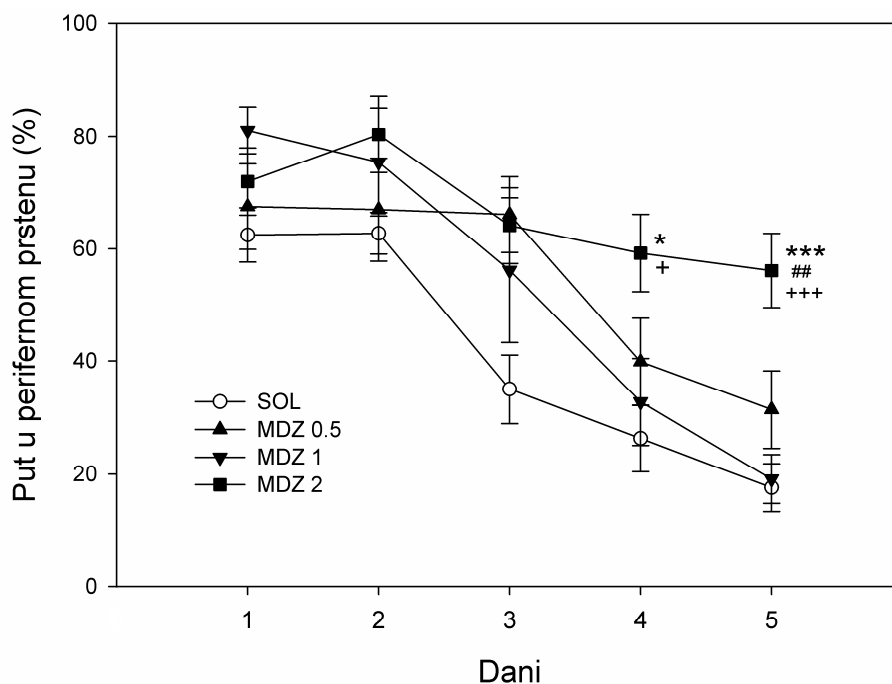
Rezultati

Tigmotaksično ponašanje, praćeno kroz procenat vremena i puta pređenog u perifernom prstenu, bilo je značajno izraženo u grupi koja je primala 2 mg/kg midazolama. U ovoj grupi životinje su tokom IV i V dana provodile značajno više vremena u perifernom prstenu u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,01$ i $p=0,06$), ali i u poređenju sa grupama koje su primale 0,5 mg/kg ($p=0,046$ za IV dan treninga) i 1 mg/kg midazolama ($p=0,019$ i $p=0,005$) (Slika 19).



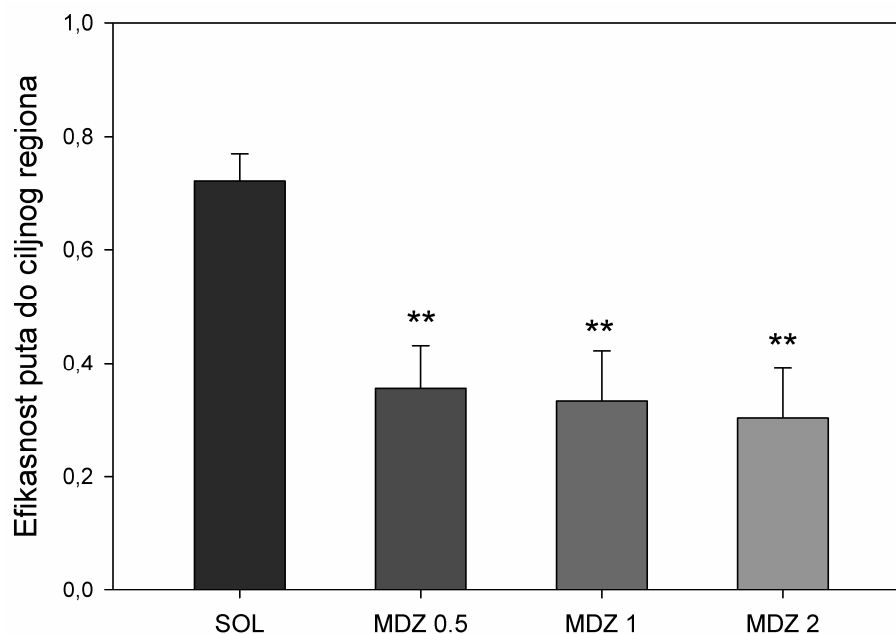
Slika 19. Uticaj 0,5; 1 i 2 mg/kg midazolama na procenat vremena provedenog u perifernom prstenu tokom pet dana treninga. ** $p<0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p<0,05$ u odnosu na MDZ 0,5; + $p<0,05$ i ++ $p<0,01$ u odnosu na MDZ 1.

Takođe, životinje koje su primale 2 mg/kg midazolama prelazile su značajno duži put u perifernom prstenu tokom IV i V dana treninga u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,018$ i $p<0,001$) ali i sa grupama koje su primale 1 mg/kg ($p=0,04$ i $p<0,001$) i 0,5 mg/kg midazolama ($p=0,006$ za V dan treninga) (Slika 20).

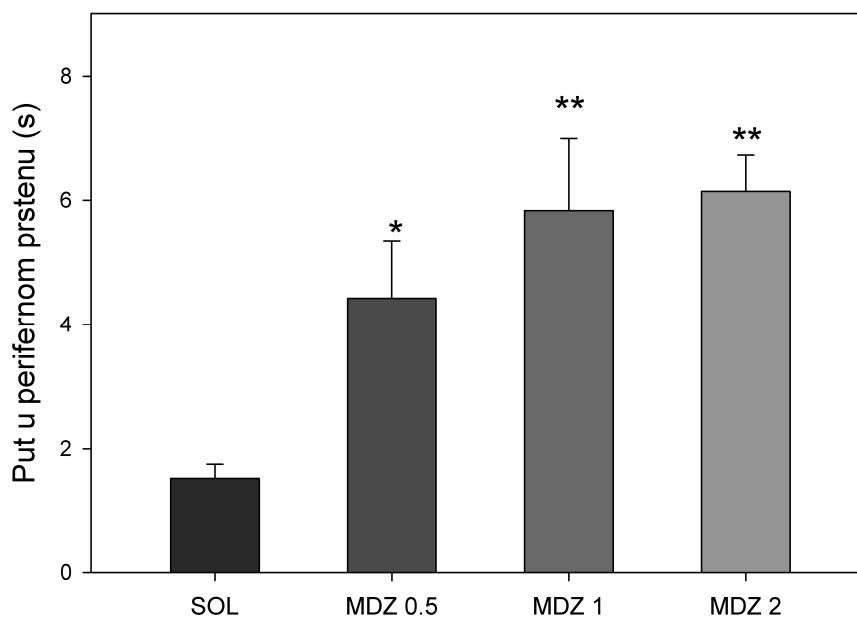


Slika 20. Uticaj rastućih doza midazolama na procenat pređenog puta u perifernom prstenu tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); ## $p < 0,01$ u odnosu na MDZ 0,5; + $p < 0,05$ i +++ $p < 0,001$ u odnosu na MDZ 1.

U testu pozivanja memorije praćeni su vreme (s) i put (m) u ciljnom regionu, SI kvadrantu i perifernom prstenu, kao i latencija ulaska (s) i efikasnost puta do ciljnog regiona. Među grupama je postojala statistički značajna razlika za efikasnost puta do ciljnog regiona ($F_{(3,20)}=6,439$, $P=0,003$) i put u perifernom prstenu ($F_{(3,20)}=0,150$, $P=0,002$). Grupe koje su tokom pet dana treninga primale 0,5; 1 i 2 mg/kg midazolama imale su značajno nižu efikasnost puta do ciljnog regiona u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,002$, $p=0,002$ i $p=0,003$) (Slika 21). Istovremeno, kod sve tri grupe zapaženo je prisustvo tigmotakse u toku testa pozivanja memorije, što se odrazilo kroz značajno veće vrednosti puta pređenog u perifernom prstenu u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,02$, $p=0,004$ i $p=0,004$) (Slika 22). Srednje vrednosti ostalih parametra i njihove standardne devijacije prikazane su u Tabeli 7.



Slika 21. Efikasnost puta do ciljnog regiona u testu pozivanja memorije kod pacova tretiranih sa 0,5; 1 i 2 mg/kg midazolama tokom pet dana treninga. ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).



Slika 22. Put u perifernom prstenu bazena tokom testa pozivanja memorije kod pacova tretiranih sa 0,5; 1 i 2 mg/kg midazolama tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).

Rezultati

Tabela 7. Srednje vrednosti (\pm standardna devijacija) parametara praćenih u testu pozivanja memorije nakon petodnevne primene rastućih doza midazolama pre svakog treninga.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	2,40 \pm 1,69	13,68 \pm 9,64	1,69 \pm 1,29	9,18 \pm 7,28	1,52 \pm 0,56	25,15 \pm 15,30
MDZ 0,5	2,13 \pm 0,95	11,87 \pm 4,72	1,25 \pm 0,71	6,65 \pm 1,40	4,42 \pm 2,28	28,07 \pm 12,76
MDZ 1	1,67 \pm 0,46	9,12 \pm 2,22	0,51 \pm 0,41	2,17 \pm 2,01	5,84 \pm 2,86	40,73 \pm 12,71
MDZ 2	2,42 \pm 1,31	10,92 \pm 7,74	1,15 \pm 0,73	4,72 \pm 4,24	6,14 \pm 1,46	35,30 \pm 6,74

Eksperiment 3

U Eksperimentu 3 praćen je uticaj midazolama (0,5; 1 i 2 mg/kg) na fazu konsolidacije memorije. Uticaj faktora dan tokom **pet dana treninga** bio je statistički značajan za sve praćene parametre, dok uticaj faktora tretman i interakcija između faktora nisu bili značajni. Rezultati dvofaktorske ANOVE sa ponavljanjem prikazani su u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Uticaj ponavljane primene rastućih doza midazolama nakon završenog treninga na praćene parametre (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(3,28)}=0,584$ P=0,631	$F_{(4,112)}=35,033$ P<0,001	$F_{(12,112)}=1,765$ P=0,063
Pređeni put (m)	$F_{(3,28)}=0,695$ P=0,563	$F_{(4,112)}=36,725$ P<0,001	$F_{(12,80)}=1,457$ P=0,151
Efikasnost puta	$F_{(3,28)}=0,139$ P=0,936	$F_{(4,112)}=11,750$ P<0,001	$F_{(12,112)}=1,644$ P<0,089
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,28)}=0,389$ P=0,762	$F_{(4,112)}=41,735$ P<0,001	$F_{(12,112)}=0,582$ P=0,853
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,28)}=0,300$ P=0,826	$F_{(4,112)}=38,780$ P<0,001	$F_{(12,112)}=0,800$ P=0,651
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(3,28)}=0,984$ P=0,826	$F_{(4,112)}=15,294$ P<0,001	$F_{(12,112)}=0,711$ P=0,737

U testu pozivanja memorije nije bilo značajnog uticaja tretmana (primenjanog tokom pet dana treninga) ni za jedan od praćenih parametara (put i

Rezultati

vreme u ciljnom regionu, SI kvadrantu i perifernom prstenu). U **Tabeli 9** prikazane su srednje vrednosti praćenih parametara i njihove standardne devijacije.

Tabela 9. Srednje vrednosti parametara (\pm standardna devijacija) praćenih u testu pozivanja memorije nakon petodnevne primene rastućih doza midazolama posle treninga.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	1,59 \pm 0,96	9,17 \pm 5,51	0,71 \pm 0,61	2,70 \pm 2,22	4,39 \pm 2,04	38,44 \pm 13,21
MDZ 0,5	2,86 \pm 1,09	13,73 \pm 8,39	0,93 \pm 0,39	3,60 \pm 1,41	5,97 \pm 2,23	33,94 \pm 6,58
MDZ 1	2,29 \pm 1,65	12,90 \pm 6,47	0,79 \pm 0,72	3,43 \pm 3,06	5,95 \pm 3,19	40,57 \pm 10,43
MDZ 2	3,36 \pm 2,04	14,54 \pm 6,80	1,85 \pm 1,47	6,91 \pm 5,57	5,69 \pm 3,09	34,61 \pm 13,04

Ekspiriment 4

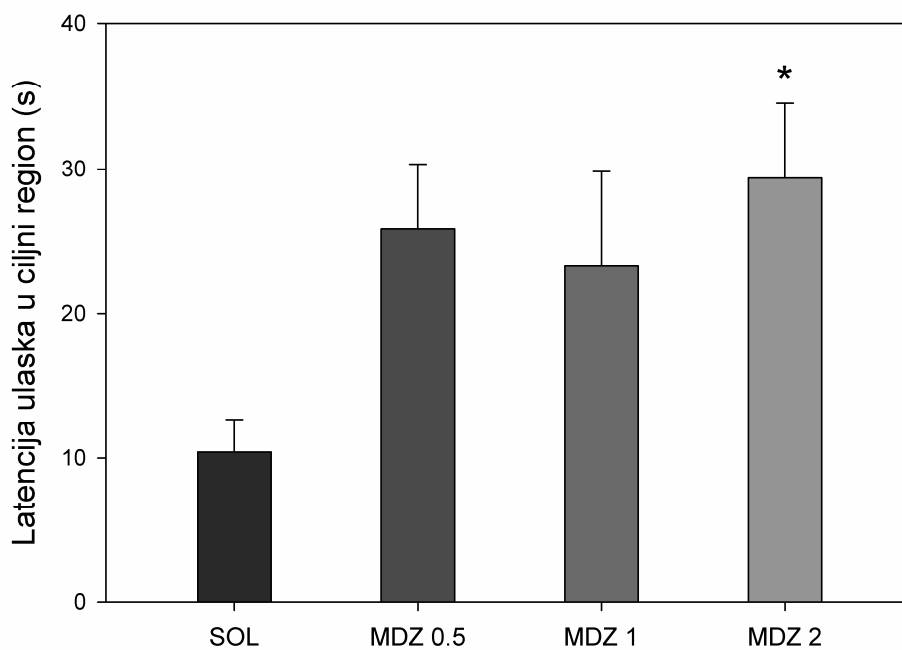
Analizom parametara iz Eksperimenta 4, u kojem je 0,5; 1 i 2 mg/kg midazolama primenjeno jednokratno, neposredno pre testa pozivanja memorije, zapažen je značajan uticaj primenjenog tretmana na latenciju ulaska u ciljni region (s) ($F_{(3,28)}=3,159$, $P=0,041$). Srednje vrednosti ostalih parametara i njihove standardne devijacije prikazane su u **Tabeli 10**.

Tabela 10. Srednje vrednosti parametara (\pm standardna devijacija) praćenih nakon jednokratne primene rastućih doza midazolama.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	3,54 \pm 1,52	17,00 \pm 7,29	1,83 \pm 1,19	7,85 \pm 5,20	5,11 \pm 1,83	31,78 \pm 7,60
MDZ 0,5	3,54 \pm 1,59	13,61 \pm 5,45	1,96 \pm 0,67	6,38 \pm 1,88	4,71 \pm 1,67	34,11 \pm 8,57
MDZ 1	3,27 \pm 1,32	14,41 \pm 5,19	1,40 \pm 1,28	4,63 \pm 4,37	6,61 \pm 2,56	40,46 \pm 13,79
MDZ 2	2,61 \pm 1,18	13,50 \pm 5,36	1,15 \pm 0,69	4,24 \pm 2,87	4,65 \pm 1,91	41,05 \pm 10,31

Rezultati

Grupa koja je primila 2 mg/kg midazolama imala je značajno dužu latenciju ulaska u ciljni region u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,036$), dok su grupe koje su primile 0,5 i 1 mg/kg midazolama bile blizu dostizanja statističke značajnosti ($p=0,066$ i $p=0,07$) (Slika 23). Broj životinja po grupi je 8.



Slika 23. Uticaj rastućih doza midazolama (MDZ) na latenciju ulaska u ciljni region tokom eksperimenta pozivanja memorije. * $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).

Eksperiment 5

U Eksperimentu 5, ispitivan je uticaj neselektivnog negativnog modulatora DMCM-a, na ponašanje pacova u MVL-u. Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj faktora dan, dok primena tretmana (0,2; 0,5 i 1 mg/kg DMCM) nije uticala značajno ni na jedan parametar ponašanja praćen tokom **pet dana treninga** u MVL-u: latenciju nalaska platforme (s), pređeni put (m), efikasnost puta, procenat vremena i puta u perifernom prstenu i prosečnu brzinu plivanja (m/s). Rezultati statističke analize prikazani su u **Tabeli 11**.

Tabela 11. Uticaj ponavljane primene rastućih doza DMCM-a na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

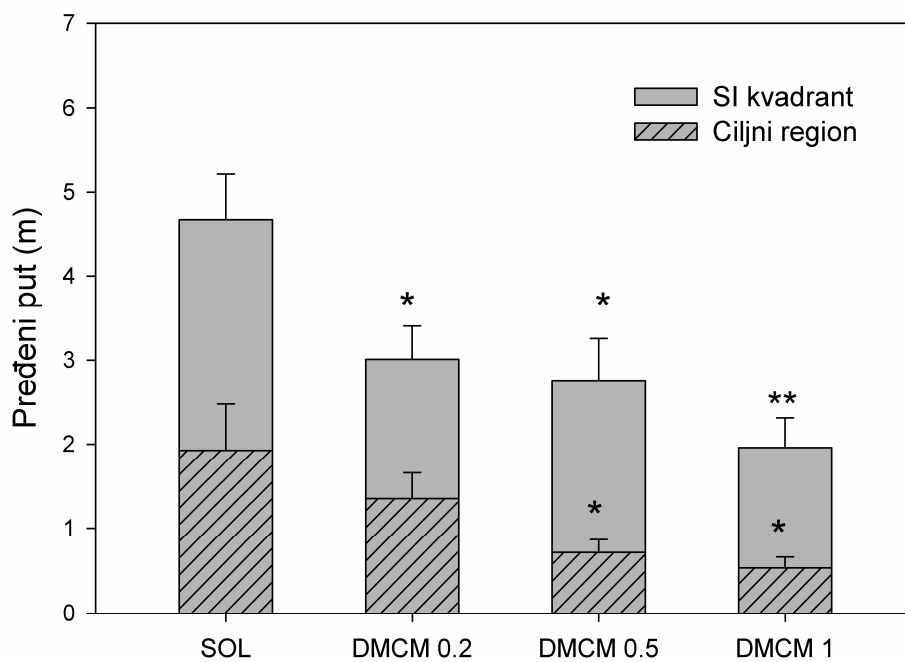
Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(3,24)}=0,190$ $P=0,902$	$F_{(4,96)}=25,671$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=0,896$ $P=0,554$
Pređeni put (m)	$F_{(3,24)}=0,198$ $P=0,896$	$F_{(4,96)}=17,450$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=1,180$ $P=0,309$
Efikasnost puta	$F_{(3,24)}=0,609$ $P=0,616$	$F_{(4,96)}=7,340$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=1,497$ $P=0,176$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,24)}=1,170$ $P=0,342$	$F_{(4,96)}=20,056$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=0,814$ $P=0,636$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,24)}=1,150$ $P=0,349$	$F_{(4,96)}=19,931$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=0,813$ $P=0,636$
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(3,24)}=1,083$ $P=0,375$	$F_{(4,96)}=8,438$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=0,914$ $P=0,537$

Za parametre praćene u toku testa pozivanja memorije, jednofaktorska ANOVA je pokazala da postoji znaćajan uticaj faktora tretman (0,2; 0,5 i 1 mg/kg DMCM), i to na put pređen u SI kvadrantu i ciljnom regionu, dok uticaj na ostale parametre nije bio znaćajan (**Tabela 12**).

Tabela 12. Uticaj ponavljane primene DMCM-a tokom pet dana treninga na parametre praćene u testu pozivanja memorije (jednofaktorska ANOVA).

Parametar	Ciljni region		SI kvadrant	
	$F_{(3,24)}$	P	$F_{(3,24)}$	P
Vreme (s)	2,590	0,076	2,990	0,051
Put (m)	3,727	0,025	6,356	0,003

Grupe koje su tokom pet dana treninga primale 0,2; 0,5 i 1 mg/kg DMCM-a imale su znaćajno niće vrednosti pređenog puta u SI kvadrantu u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,016$, $p=0,017$ i $p=0,002$). Grupe koje su primale 0,5 i 1 mg/kg DMCM-a imale su i znaćajno niće vrednosti pređenog puta i u ciljnom regionu u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,04$ i $p=0,03$). Rezultati su prikazani na **Slici 24**.



Slika 24. Uticaj 0,2; 0,5 i 1 mg/kg DMCM-a na put pređen u SI kvadrantu i ciljnom regionu tokom testa pozivanja memorije. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL). Broj životinja po grupi je 7.

4.2. Supstance selektivne za α_1 -podtip GABA_A receptora

Na osnovu rezultata dobijenih iz eksperimenta o dozno-zavisnom uticaju diazepama na parametre ponašanja pacova u MVL, urađena su dva eksperimenta (Eksperimenti 6 i 7) u kojima je ispitana mogućnost antagonizovanja efekata 1,5 i 2 mg/kg diazepama istovremenom primenom α_1 -selektivnog neutralnog modulatora β CCt-a.

Eksperiment 6

U Eksperimentu 6 ispitivan je uticaj kombinacije 1,5 mg/kg diazepama i 5 ili 15 mg/kg β CCt-a, a dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj faktora dan, dok uticaj faktora tretman nije bio statistički značajan ni za jedan od parametara praćenih tokom **pet dana treninga**. Rezultati statističke analize prikazani su u **Tabeli 13**.

Tabela 13. Uticaj ponavljane primene 1,5 mg/kg diazepama i kombinacije 1,5 mg/kg diazepam + β CCt (5 ili 15 mg/kg) na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(3,20)}=1,283$ $P=0,307$	$F_{(4,80)}=24,557$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=0,389$ $P=0,964$
Pređeni put (m)	$F_{(3,20)}=1,345$ $P=0,288$	$F_{(4,80)}=18,018$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=0,301$ $P=0,988$
Efikasnost puta	$F_{(3,20)}=1,478$ $P=0,251$	$F_{(4,80)}=15,813$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=1,054$ $P=0,410$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,20)}=0,763$ $P=0,528$	$F_{(4,80)}=38,650$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=0,684$ $P=0,762$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,20)}=0,694$ $P=0,567$	$F_{(4,80)}=29,859$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=0,696$ $P=0,750$
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(3,20)}=2,367$ $P=0,101$	$F_{(4,80)}=9,823$ $P<0,001$	$F_{(12,80)}=0,657$ $P=0,787$

U **testu pozivanja memorije**, nije bilo značajnog uticaja faktora tretman ni na jedan od praćenih parametara. U **Tabeli 14** prikazane su srednje vrednosti praćenih parametara sa standardnim devijacijama.

Rezultati

Tabela 14. Srednje vrednosti parametara praćenih u testu pozivanja memorije (\pm standardna devijacija) nakon petodnevne primene 1,5 mg/kg diazepama i kombinacije diazepam (1,5 mg/kg) + β CCt (5 ili 15 mg/kg).

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	2,29 \pm 1,30	13,48 \pm 7,93	1,36 \pm 1,03	7,47 \pm 4,87	4,88 \pm 1,78	38,82 \pm 8,62
DZP 1,5	1,55 \pm 0,95	6,40 \pm 4,02	0,84 \pm 0,82	2,85 \pm 3,00	5,29 \pm 2,30	37,58 \pm 14,47
DZP+ β CCt 5	3,46 \pm 2,09	13,53 \pm 5,54	1,76 \pm 1,11	7,10 \pm 2,73	5,42 \pm 1,85	27,75 \pm 5,31
DZP+ β CCt 15	2,17 \pm 0,09	9,50 \pm 3,45	1,13 \pm 0,69	4,35 \pm 2,51	6,87 \pm 1,16	36,68 \pm 6,58

Eksperiment 7

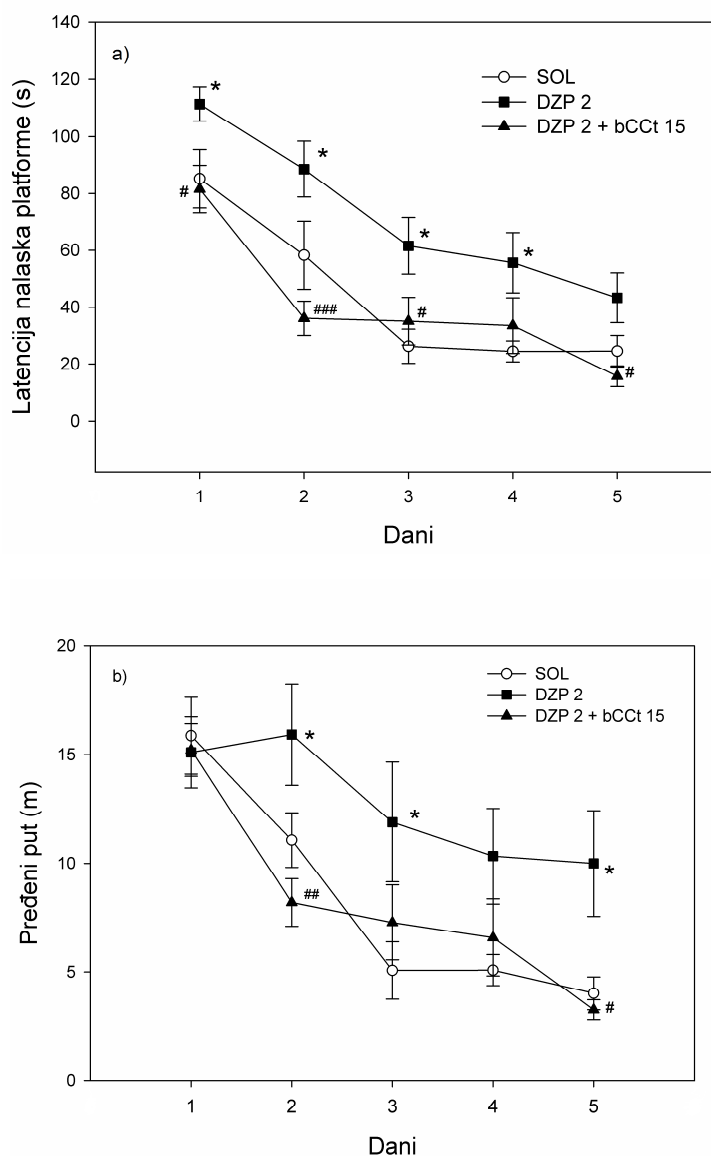
U Eksperimentu 7 praćen je uticaj kombinacije 2 mg/kg diazepama i 15 mg/kg β CCt-a na ponašanje pacova u MVL, dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj faktora dan na sve praćene parametre, dok je uticaj faktora tretman bio značajan za sve parametre osim brzine plivanja. Interakcija je bila značajna samo za procenat vremena i procenat puta u perifernom prstenu. Rezultati statističke analize prikazani su u **Tabeli 15**.

Tabela 15. Uticaj ponavljane primene 2 mg/kg diazepama i kombinacije diazepam (2 mg/kg) + β CCt (15 mg/kg) na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(2,16)}=16,403$ $P<0,001$	$F_{(4,64)}=31,664$ $P<0,001$	$F_{(8,64)}=0,978$ $P=0,461$
Pređeni put (m)	$F_{(2,16)}=7,529$ $P=0,005$	$F_{(4,64)}=19,074$ $P<0,001$	$F_{(8,64)}=1,562$ $P=0,151$
Efikasnost puta	$F_{(2,16)}=6,493$ $P=0,009$	$F_{(4,64)}=25,592$ $P<0,001$	$F_{(8,64)}=1,237$ $P=0,292$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(2,16)}=31,629$ $P<0,001$	$F_{(4,64)}=38,512$ $P<0,001$	$F_{(8,64)}=2,507$ $P=0,02$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(2,16)}=20,693$ $P<0,001$	$F_{(4,64)}=41,266$ $P<0,001$	$F_{(8,64)}=2,967$ $P=0,007$
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(2,16)}=2,398$ $P=0,123$	$F_{(4,64)}=5,481$ $P<0,001$	$F_{(8,64)}=1,4$ $P=0,214$

Rezultati

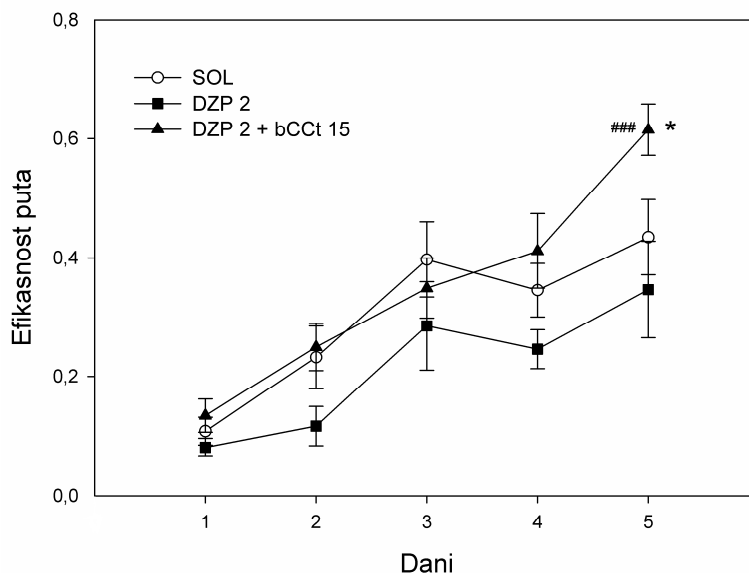
Post hoc analiza pokazala je da je grupa koja je primala 2 mg/kg diazepama imala značajno dužu latenciju nalaska platforme u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$), ali i u odnosu na grupu koja je primala 2 mg/kg diazepama + 15 mg/kg β CCt-a ($p < 0,001$). Rezultati *post hoc* analize po danima prikazani su na **Slici 25a**. Grupa koja je primala 2 mg/kg diazepama prelazila je i značajno duži put do nalaska platforme u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,005$) i u odnosu na grupu koja je primala kombinaciju 2 mg/kg diazepama i 15 mg/kg β CCt-a ($p = 0,008$) (**Slika 25b**).



Slika 25. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama+15 mg/kg β CCt-a na a) latenciju nalaska platforme i b) pređeni put tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ i ### $p < 0,001$ u odnosu na diazepam 2 mg/kg (DZP 2). Broj životinja po grupi je 6-7 (Slike 25-29).

Rezultati

Ova grupa je takođe imala i nižu efikasnost puta u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,041$) i grupu koja je primala kombinaciju 2 mg/kg diazepama i 15 mg/kg β CCt-a ($p=0,007$) (Slika 26).

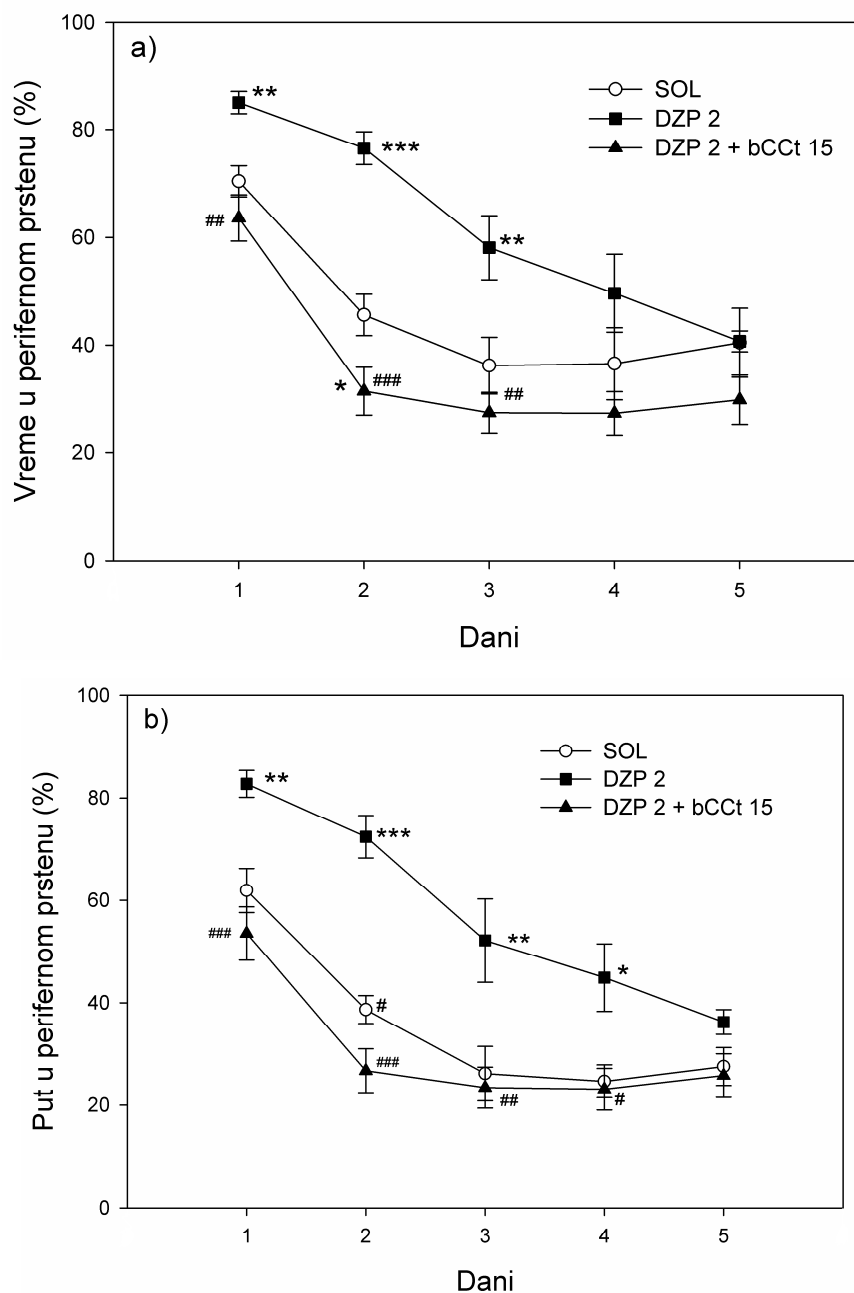


Slika 26. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama + 15 mg/kg β CCt-a na efikasnost puta tokom pet dana treninga. * $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); ### $p<0,001$ u odnosu na dizepam 2 mg/kg (DZP).

Statistički značajne razlike među grupama postojale su i za procenat vremena (Slika 27a) i procenat puta u perifernom prstenu (Slika 27b). Životinje koje su primale 2 mg/kg diazepama provodile su više vremena i prelazile duži put u perifernom prstenu u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,002$ i $p<0,001$), ali i u odnosu na grupu koja je primala 2 mg/kg diazepama + 15 mg/kg β CCt-a ($p<0,001$ i $p<0,001$). S obzirom na značajnu interakciju među faktorima za vreme i put u perifernom prstenu, urađene su jednofaktorske ANOVE po danima i rezultati su prikazani u Tabeli 16.

Tabela 16. Uticaj ponavljane primene 2 mg/kg diazepama i kombinacije diazepam (2 mg/kg) + β CCt (15 mg/kg) na vreme i put u perifernom prstenu (jednofaktorska ANOVA po danima).

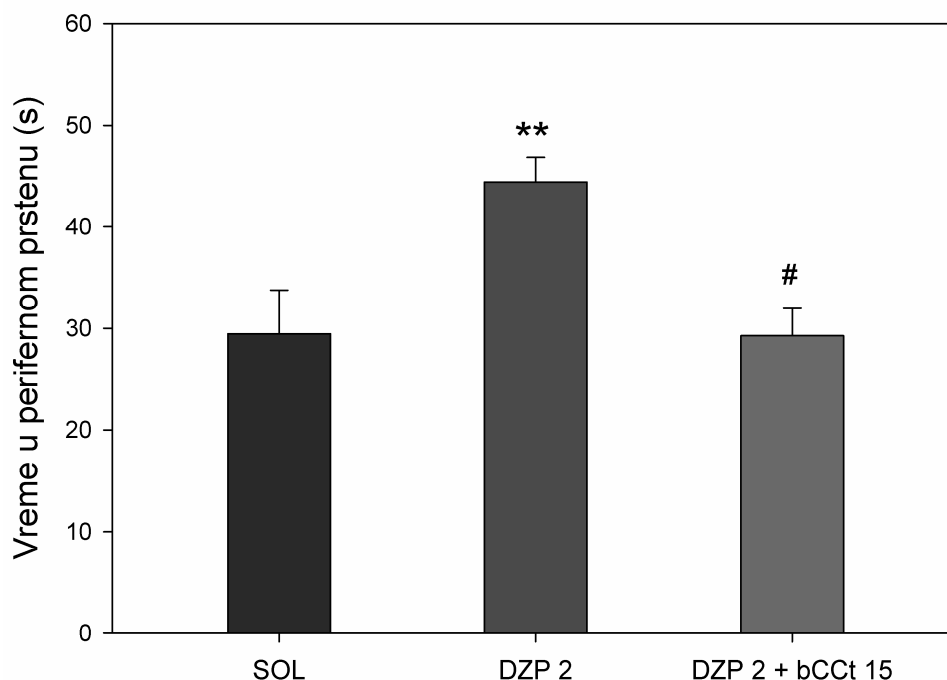
Parametar	I dan	II dan	III dan	IV dan	V dan
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(2,16)}=10,59$ $P=0,001$	$F_{(2,16)}=34,93$ $P<0,001$	$F_{(2,16)}=10,17$ $P=0,001$	$F_{(2,16)}=3,587$ $P=0,052$	$F_{(2,16)}=1,833$ $P=0,192$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(2,16)}=12,11$ $P<0,001$	$F_{(2,16)}=37,53$ $P<0,001$	$F_{(2,16)}=7,08$ $P=0,006$	$F_{(2,16)}=6,36$ $P=0,009$	$F_{(2,16)}=2,33$ $P=0,130$



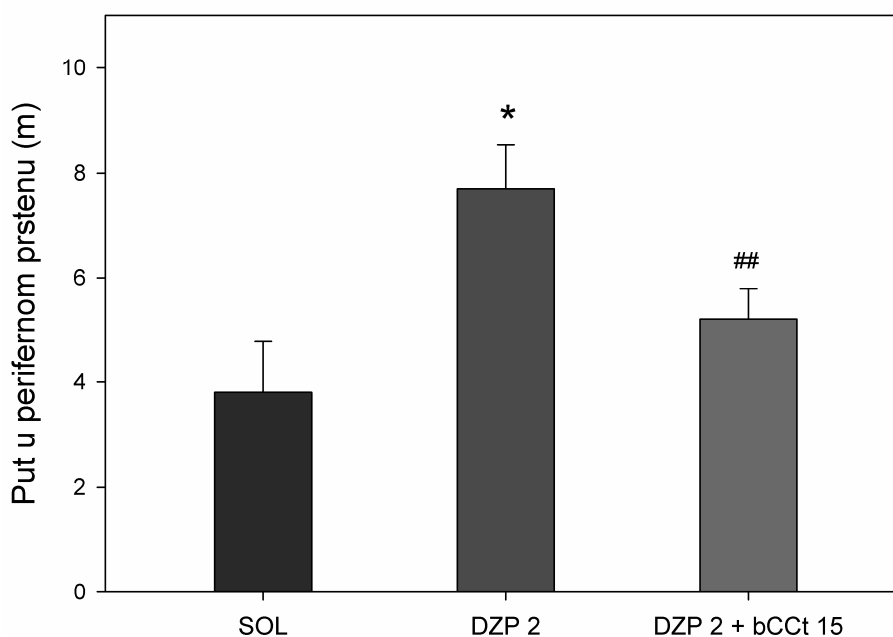
Slika 27. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama + 15 mg/kg betaCCt-a na a) vreme i b) put u perifernom prstenu tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ i ### $p < 0,001$ u odnosu na diazepam 2 mg/kg (DZP 2).

Rezultati

U testu pozivanja memorije praćeni su svi parametri za koje je prethodno pokazano da se menjaju pri primeni 2 mg/kg diazepama tokom pet dana treninga, a to su put (m) i vreme (s) u ciljnom regionu, SI kvadrantu i perifernom prstenu. Jednofaktorska ANOVA pokazala je značajan uticaj tretmana na vreme ($F_{(2,16)}=5,89$ i $P=0,012$) i put ($F_{(2,16)}=7,168$ i $P=0,006$) u perifernom prstenu. Grupa koja je tokom pet dana treninga primala 2 mg/kg diazepama provodila je značajno više vremena (Slika 28) i prelazila značajno duži put u perifernom prstenu (Slika 29) tokom testa pozivanja memorije, u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,005$ i $p=0,041$) i u odnosu na grupu koja je primala 2 mg/kg diazepama + 15 mg/kg β CCt-a ($p=0,011$ i $p=0,009$).



Slika 28. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama + 15 mg/kg β CCt na vreme perifernom prstenu tokom testa pozivanja memorije. ** $p<0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL) i # $p<0,05$ u odnosu na diazepam 2 mg/kg (DZP 2).



Slika 29. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama + 15 mg/kg β CCt na put u perifernom prstenu tokom testa pozivanja memorije. * $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ u odnosu na diazepam 2 mg/kg (DZP 2).

Za ostale parametre nije bilo značajne razlike među grupama. Njihove srednje vrednosti i standardne devijacije prikazane su u Tabeli 17.

Tabela 17. Srednje vrednosti parametara (\pm standardna devijacija) praćenih u testu pozivanja memorije nakon petodnevne primene 2 mg/kg diazepama ili kombinacije 2 mg/kg diazepama + 15 mg/kg β CCt-a.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	2,33 \pm 1,22	11,57 \pm 5,08	1,54 \pm 1,12	5,90 \pm 4,73	3,80 \pm 2,40	29,45 \pm 10,60
DZP 2	2,67 \pm 0,72	13,13 \pm 4,59	0,85 \pm 0,63	3,43 \pm 2,76	7,70 \pm 2,04	44,40 \pm 5,87
DZP + β CCt 15	1,91 \pm 1,32	7,99 \pm 5,72	1,10 \pm 0,59	4,17 \pm 2,71	5,20 \pm 1,53	29,27 \pm 7,10

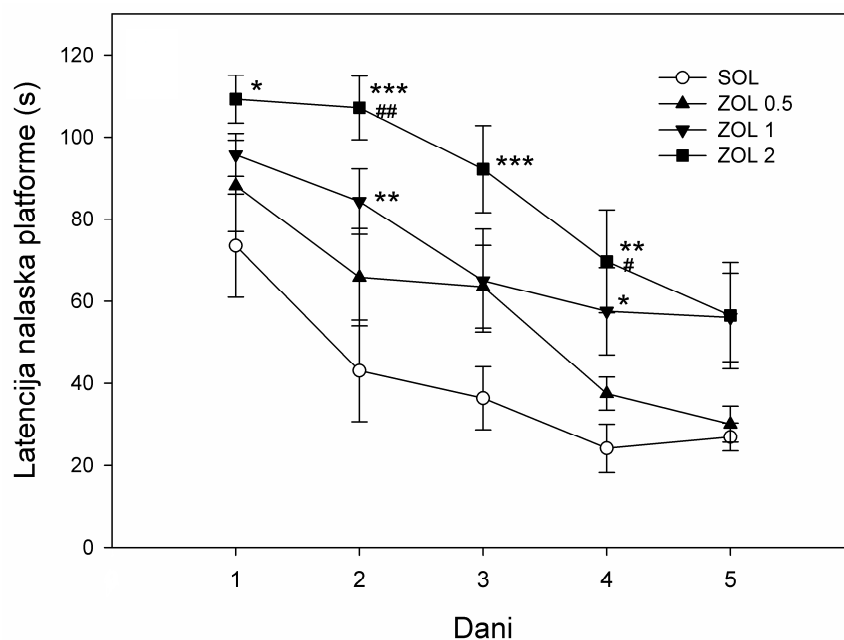
Eksperiment 8

U Eksperimentu 8 praćen je uticaj rastućih doza zolpidema (0,5; 1 i 2 mg/kg) na ponašanje pacova u MVL-u. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajan uticaj faktora dan i značajan uticaj faktora tretman na sve parametre praćene tokom **pet dana treninga (Tabela 18)**. Interakcija između faktora tretman i dan nije bila značajna ni za jedan parametar.

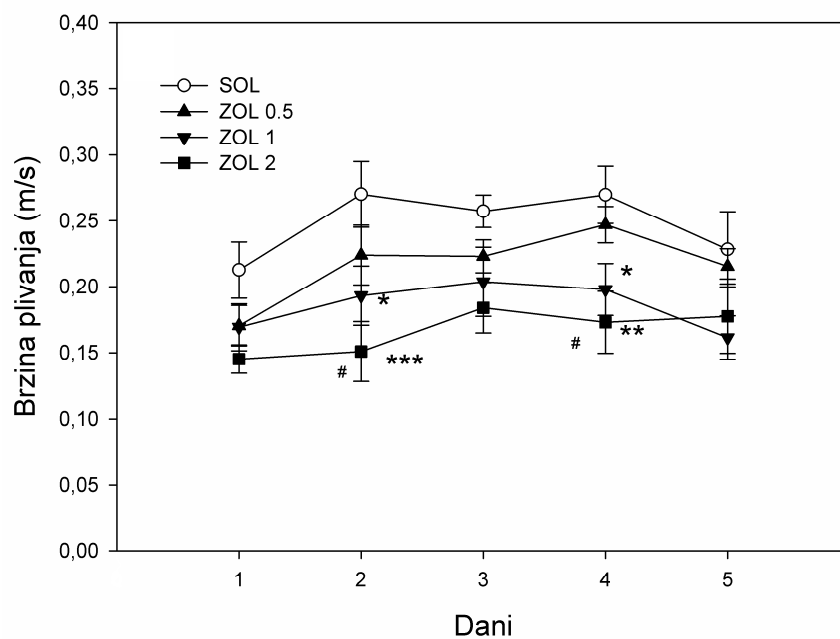
Tabela 18. Uticaj ponavljane primene rastućih doza zolpidema na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(3,28)}=10,707$ $P<0,001$	$F_{(4,112)}=23,846$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=0,728$ $P=0,722$
Pređeni put (m)	$F_{(3,28)}=6,155$ $P=0,002$	$F_{(4,112)}=27,299$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=1,020$ $P=0,151$
Efikasnost puta	$F_{(3,28)}=10,447$ $P<0,001$	$F_{(4,112)}=20,504$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=1,429$ $P=0,163$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,28)}=12,831$ $P<0,001$	$F_{(4,112)}=35,003$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=0,934$ $P=0,516$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,28)}=11,286$ $P < 0,001$	$F_{(4,112)}=24,588$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=1,216$ $P=0,281$
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(3,28)}=5,749$ $P=0,003$	$F_{(4,112)}=6,087$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=0,874$ $P=0,575$

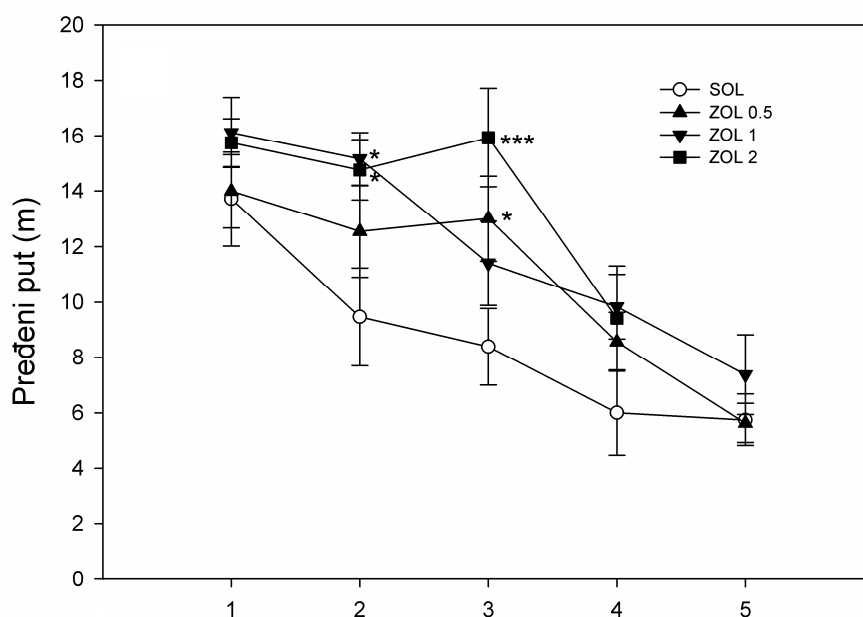
Post hoc test je pokazao da su grupe koje su primale 1 i 2 mg/kg zolpidema imale značajno duže latencije nalaska platforme ($p=0,017$ i $p=0,003$) (**Slika 30**) i značajno manje brzine plivanja ($p=0,017$ i $p=0,03$) (**Slika 31**) u odnosu na kontrolnu grupu. Sve tri grupe koje su primale zolpidem (0,5; 1 i 2 mg/kg) imale su i značajno duži pređeni put ($p=0,006$, $p=0,003$ i $p=0,041$) (**Slika 32**) i nižu efikasnost puta ($p<0,001$, $p<0,001$ i $p=0,006$) (**Slika 33**) u odnosu na kontrolnu grupu. Sve tri grupe koje su primale zolpidem (0,5; 1 i 2 mg/kg) provodile su značajno više vremena ($p=0,036$, $p<0,001$ i $p<0,001$) (**Slika 34**), i prelazile duži put ($p=0,006$; $p<0,001$, $p<0,001$) (**Slika 35**) u perifernom prstenu u odnosu na kontrolnu grupu. Pored toga, grupa koja je primala 2 mg/kg zolpidema provodila je i više vremena i prelazila više puta na periferiji bazena u odnosu na grupu koja je primala 0,5 mg/kg zolpidema ($p=0,049$ i $p=0,015$).



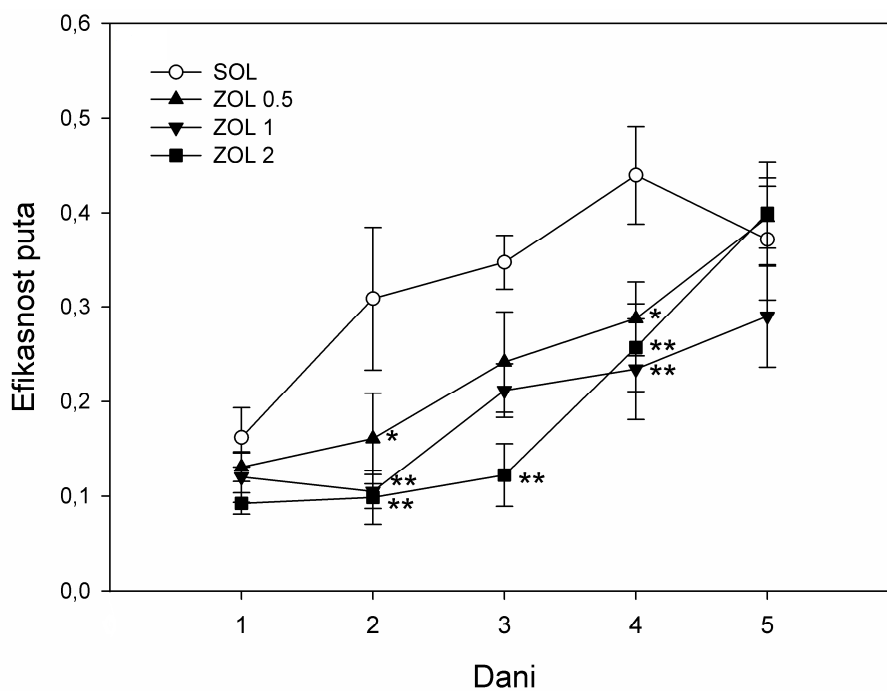
Slika 30. Uticaj rastućih doza zolpidema (0,5; 1 i 2 mg/kg) na latenciju nalaska platforme u MVL-u tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ u odnosu na ZOL 0,5. Broj životinja po grupi je 8 (za Slike 30-36).



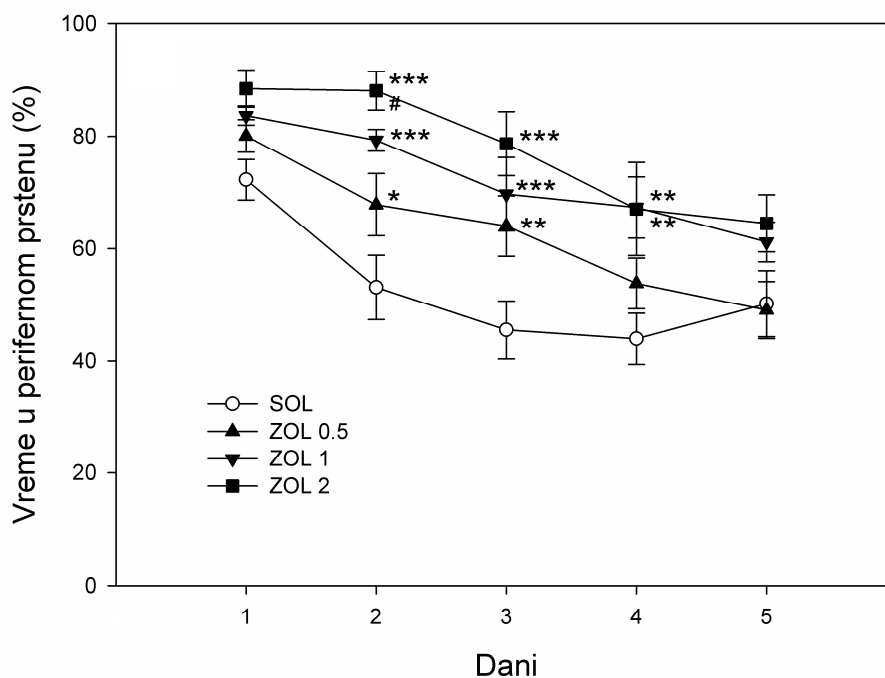
Slika 31. Uticaj rastućih doza zolpidema (0,5; 1 i 2 mg/kg) na a) brzinu u MVL-u tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,01$ u odnosu na ZOL 0,5.



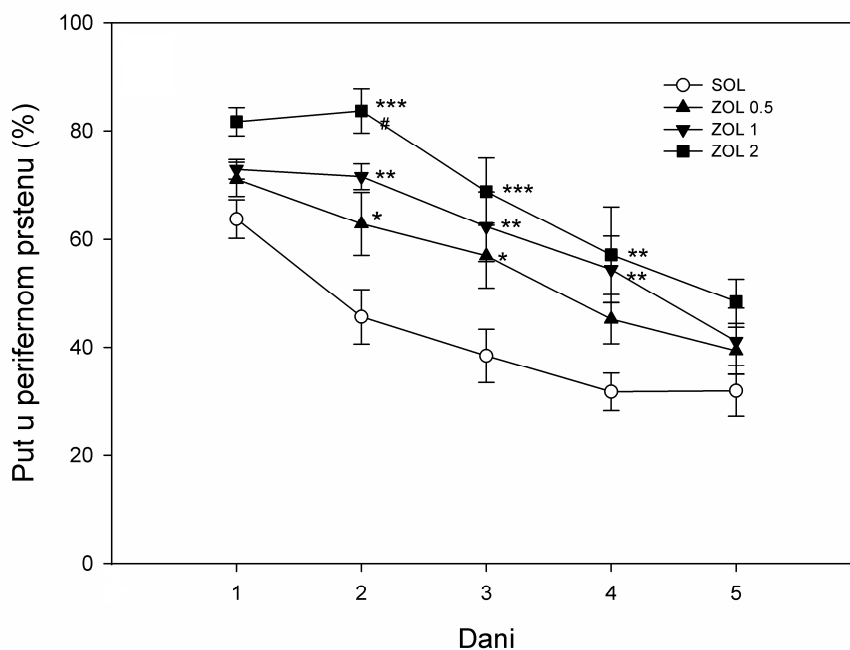
Slika 32. Uticaj rastućih doza zolpidema (0,5; 1 i 2 mg/kg) na ukupni pređeni put u MVL-u tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).



Slika 33. Uticaj rastućih doza zolpidema (0,5; 1 i 2 mg/kg) na efikasnost puta u MVL tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).



Slika 34. Uticaj rastućih doza zolpidema (0,5; 1 i 2 mg/kg) na procenat vremena u perifernom prstenu tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ u odnosu na ZOL 0,5.



Slika 35. Uticaj rastućih doza zolpidema (0,5; 1 i 2 mg/kg) na procenat puta u perifernom prstenu tokom pet dana treninga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ u odnosu na ZOL 0,5.

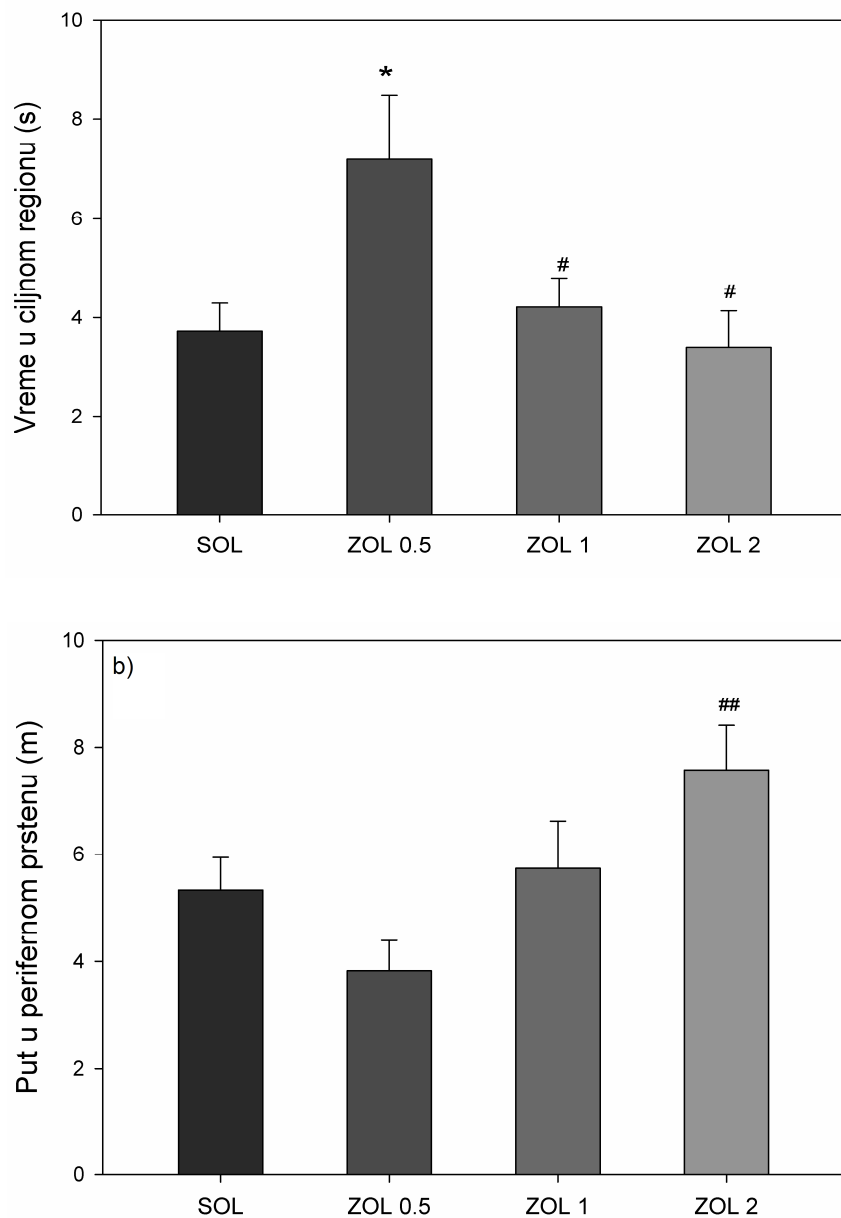
Rezultati

Od svih parametara praćenih u **testu pozivanja memorije**, značajne razlike među grupama koje su primale različite tretmane (rastvarač, 0,5; 1 i 2 mg/kg zolpidema) nađene su za vreme u ciljnom regionu ($F_{(3,28)}=4,207$, $P=0,014$) i put u perifernom prstenu ($F_{(3,28)}=4,434$, $P=0,011$). Srednje vrednosti praćenih parametara i njihove standardne devijacije prikazane su u **Tabeli 19**.

Tabela 19. Srednje vrednosti parametara (\pm standardna devijacija) praćenih u testu pozivanja memorije nakon petodnevne primene zolpidema.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	1,98 \pm 0,60	10,57 \pm 4,05	1,09 \pm 0,48	3,92 \pm 1,70	5,33 \pm 1,72	39,40 \pm 6,07
ZOL 0,5	2,50 \pm 0,81	12,39 \pm 4,02	1,57 \pm 0,78	7,58 \pm 3,80	3,82 \pm 1,62	32,04 \pm 11,03
ZOL 1	2,25 \pm 1,48	9,97 \pm 5,51	1,21 \pm 0,45	4,40 \pm 1,61	5,73 \pm 2,51	38,26 \pm 5,08
ZOL 2	2,32 \pm 1,28	10,09 \pm 5,81	1,02 \pm 0,68	3,61 \pm 2,25	7,59 \pm 2,33	41,90 \pm 9,54

Grupa koja je tokom pet dana treninga primala zolpidem u dozi 0,5 mg/kg provela je značajno više vremena u ciljnom regionu u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,02$), a grupe koje su primale 1 i 2 mg/kg zolpidema provele su značajno manje vremena u ciljnom regionu u odnosu na grupu koja je primala zolpidem 0,5 mg/kg ($p=0,019$ i $p=0,019$) (**Slika 36a**). Grupa koja je primala 2 mg/kg zolpidema imala je i značajno duži put u perifernom prstenu u odnosu na grupu koja je primala 0,5 mg/kg zolpidema ($p=0,006$) (**Slika 36b**).



Slika 36. Uticaj zolpidema (0,5; 1 i 2 mg/kg) na a) vreme provedeno u ciljnom regionu i b) pređeni put u perifernom prstenu tokom testa pozivanja memorije. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$, u odnosu na ZOL 0,5.

4.3. Supstance sa smanjenom aktivnošću na α_1 -podtipu GABA_A receptora**Eksperiment 9**

U Eksperimentu 9 ispitivan je uticaj rastućih doza JY-HXe-053 (5, 20 i 40 mg/kg) na ponašanje pacova u MVL-u, a dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj faktora dan na sve parametre praćene tokom pet dana treninga, dok uticaj faktora tretman i interakcije između faktora nisu bile značajne. Rezultati statističke analize prikazani su u **Tabeli 20**.

Tabela 20. Uticaj ponavljane primene rastućih doza JY-HXe-053 na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(3,24)}=0,231$ P=0,874	$F_{(4,96)}=50,934$ P<0,001	$F_{(12,96)}=0,580$ P=0,854
Pređeni put (m)	$F_{(3,24)}=3,094$ P=0,046	$F_{(4,96)}=38,757$ P<0,001	$F_{(12,96)}=1,129$ P=0,346
Efikasnost puta	$F_{(3,24)}=3,046$ P=0,048	$F_{(4,96)}=25,920$ P<0,001	$F_{(12,96)}=0,448$ P=0,939
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,24)}=0,364$ P=0,780	$F_{(4,96)}=16,108$ P<0,001	$F_{(12,96)}=0,538$ P=0,885
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,24)}=0,118$ P=0,949	$F_{(4,96)}=18,037$ P<0,001	$F_{(12,96)}=0,498$ P=0,911
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(3,24)}=1,917$ P=0,154	$F_{(4,96)}=2,797$ P=0,030	$F_{(12,96)}=2,722$ P=0,003

U testu pozivanja memorije jednofaktorska ANOVA je pokazala da nema statistički značajnih razlika među grupama ni za jedan od praćenih parametara (vreme i put u SI kvadrantu, ciljnom regionu i perifernom prstenu). U **Tabeli 21** prikazane su srednje vrednosti praćenih parametara sa standardnim devijacijama.

Tabela 21. Srednje vrednosti parametara (\pm standardna devijacija) praćenih u testu pozivanja memorije nakon petodnevne primene JY-HXe-053.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	1,99 \pm 2,59	7,81 \pm 9,55	0,99 \pm 1,22	3,54 \pm 4,47	3,02 \pm 2,99	42,07 \pm 11,93
JY-HXe-053 5	1,98 \pm 1,47	10,01 \pm 7,74	1,30 \pm 1,01	6,16 \pm 4,96	3,53 \pm 2,40	32,64 \pm 14,14
JY-HXe-053 20	1,15 \pm 1,27	5,01 \pm 5,54	0,59 \pm 0,49	2,53 \pm 2,36	3,04 \pm 3,00	42,51 \pm 15,98
JY-HXe-053 40	1,35 \pm 1,66	6,11 \pm 7,31	0,81 \pm 0,93	3,36 \pm 3,90	3,44 \pm 2,76	45,47 \pm 16,19

Ekspерiment 10

U Ekspерimentu 10 praćen je uticaj 30 mg/kg SH-053-2’N, 30 mg/kg SH-053-S-CH3-2’F i 30 mg/kg SH-053-R-CH3-2’F na ponašanje pacova u MVL-u. Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj faktora dana, dok uticaja faktora tretman i interakcija između faktora nisu bile značajne. Rezultati statističke analize parametara praćenih tokom pet dana treninga prikazani su u **Tabeli 22**.

Tabela 22. Uticaj ponavljane primene SH-053-2’N, SH-053-S-CH3-2’F i SH-053-R-CH3-2’F na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(3,28)}=0,827$ $P=0,490$	$F_{(4,112)}=30,113$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=0,463$ $P=0,932$
Pređeni put (m)	$F_{(3,28)}=0,554$ $P=0,650$	$F_{(4,112)}=27,958$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=0,293$ $P=0,989$
Efikasnost puta	$F_{(3,28)}=0,801$ $P=0,504$	$F_{(4,112)}=23,393$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=0,709$ $P=0,740$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,28)}=1,781$ $P=0,174$	$F_{(4,112)}=19,568$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=1,29$ $P=0,234$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,28)}=2,15$ $P=0,116$	$F_{(4,112)}=20,637$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=1,185$ $P=0,302$
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(3,28)}=1,080$ $P=0,373$	$F_{(4,112)}=5,457$ $P<0,001$	$F_{(12,112)}=0,566$ $P=0,865$

Rezultati

U testu pozivanja memorije, jednofaktorska ANOVA je pokazala da nema značajnog uticaja faktora tretman ni za jedan od praćenih parametara. Srednje vrednosti parametara i njihove standardne devijacije prikazane su u **Tabeli 23**.

Tabela 23. Srednje vrednosti parametara (\pm standardna devijacija) iz testa pozivanja memorije nakon petodnevne primene SH-053-2’N, SH-053-S-CH3-2’F i SH-053-R-CH3-2’F.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	2,55 \pm 1,54	12,26 \pm 6,18	1,36 \pm 0,99	6,19 \pm 3,73	4,45 \pm 3,32	31,75 \pm 9,22
SH-053-2’N 30	3,06 \pm 1,56	15,62 \pm 9,66	1,84 \pm 1,12	8,75 \pm 6,52	4,46 \pm 2,04	25,35 \pm 11,44
SH-053-R-CH3-2’F 30	3,17 \pm 1,02	14,09 \pm 6,08	2,01 \pm 0,85	8,40 \pm 4,92	4,93 \pm 2,05	28,49 \pm 8,13
SH-053-S-CH3-2’F 30	2,96 \pm 1,13	15,84 \pm 5,4	1,60 \pm 0,74	7,51 \pm 3,64	4,71 \pm 2,26	32,55 \pm 6,97

4.4. Supstance selektivne za α_5 -podtip GABA_A receptora

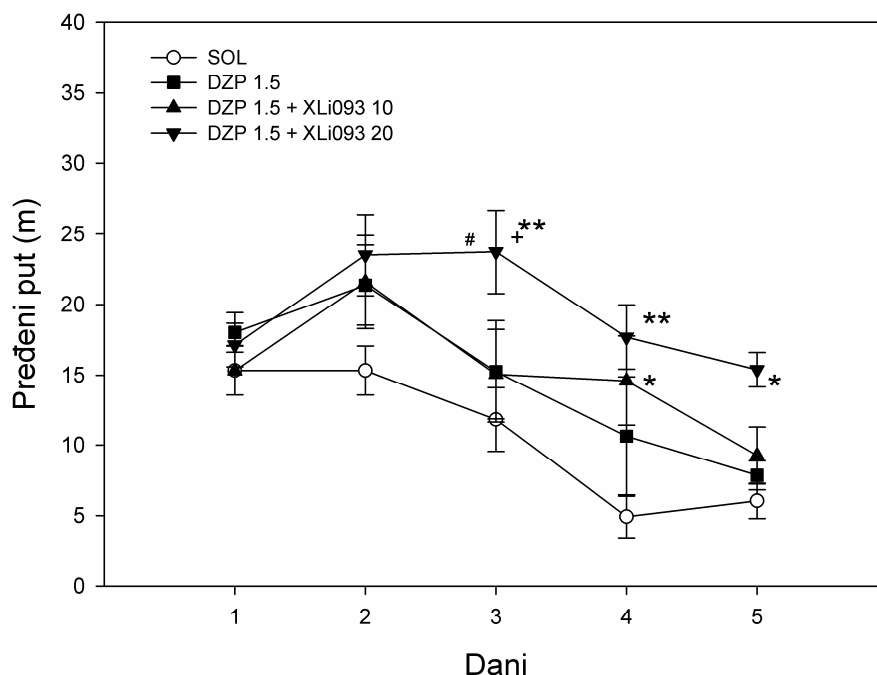
Eksperiment 11

U Eksperimentu 11 ispitivana je mogućnost antagonizovanja efekata 1,5 mg/kg diazepama istovremenom primenom 10 ili 20 mg/kg XLi093. Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj faktora dan za sve parametre praćene tokom pet dana treninga, dok je uticaj faktora tretman bio značajan za ukupni pređeni put (m), efikasnost puta i procenat puta u perifernom prstenu. Interakcije između faktora nisu bile značajne ni za jedan praćeni parametar (**Tabela 24**).

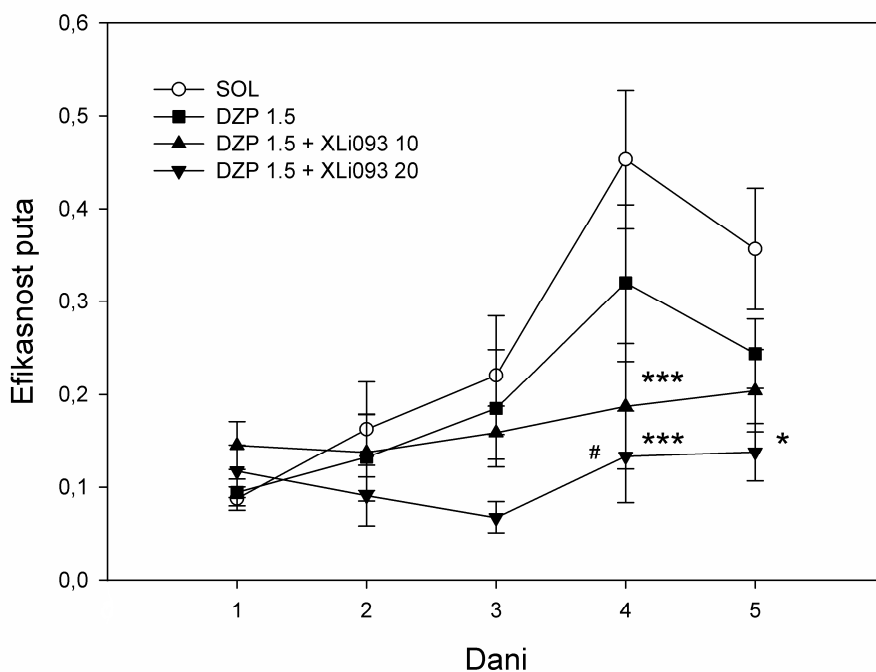
Tabela 24. Uticaj ponavljane primene 1,5 mg/kg diazepama i kombinacije 1,5 mg/kg diazepama i XLi093 (10 ili 20 mg/kg) na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	F _(3,20) =2,527 P=0,087	F _(4,80) =15,271 P<0,001	F _(12,80) =1,002 P=0,455
Pređeni put (m)	F _(3,20) =5,812 P=0,005	F _(4,80) =14,949 P<0,001	F _(12,80) =1,159 P=0,327
Efikasnost puta	F _(3,20) =7,450 P=0,002	F _(4,80) =8,448 P<0,001	F _(12,80) =1,752 P=0,071
Put u perifernom prstenu (%)	F _(3,20) =3,584 P=0,032	F _(4,80) =33,570 P<0,001	F _(12,80) =1,025 P=0,435
Vreme u perifernom prstenu (%)	F _(3,20) =1,506 P=0,244	F _(4,80) =23,372 P<0,001	F _(12,80) =0,703 P=0,744
Brzina plivanja (m/s)	F _(3,20) =0,610 P=0,616	F _(4,80) =5,747 P<0,001	F _(12,80) =0,773 P=0,676

Post hoc analiza je pokazala da je grupa koja je primala kombinaciju 1,5 mg/kg diazepama i 20 mg/kg XLi093 imala značajno duži put u odnosu na kontrolnu grupu (p=0,003) (**Slika 37**). Značajno nižu efikasnost puta u odnosu na kontrolnu grupu imale su životinje koje su primale kombinaciju 1,5 mg/kg diazepama i 10 ili 20 mg/kg XLi093 (p=0,027 i p<0,001) (**Slika 38**).



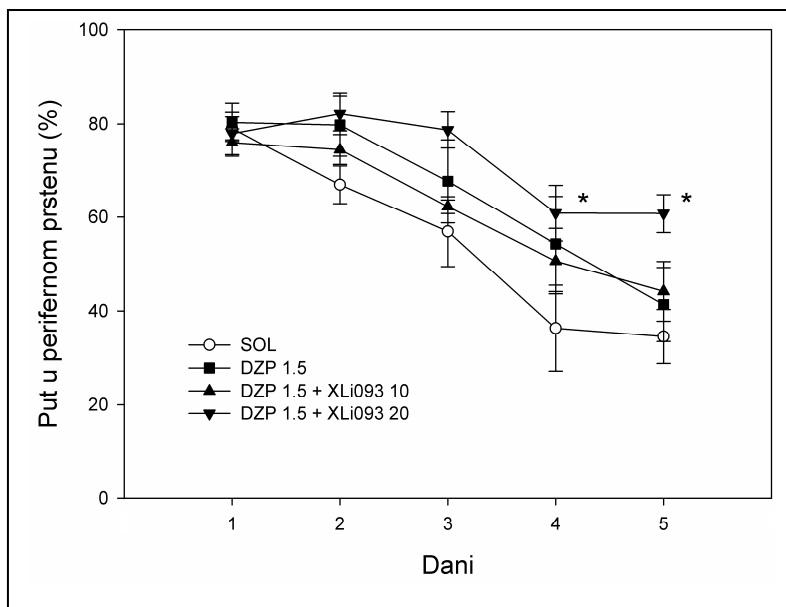
Slika 37. Uticaj 1,5 mg/kg diazepama i kombinacije 1,5 mg/kg diazepama i 10 ili 20 mg/kg XLi093 na ukupni pređeni put tokom pet dana treninga u MVL-u. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ u odnosu na DZP 1,5; + $p < 0,05$ u odnosu na DZP 1,5 + XLi093 10. Broj životinja po grupi je 6 (Slika 37-39).



Slika 38. Uticaj 1,5 mg/kg diazepama i kombinacije 1,5 mg/kg diazepama i 10 ili 20 mg/kg XLi093 na efikasnost puta tokom pet dana treninga u MVL-u. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ u odnosu na DZP 1,5.

Rezultati

Grupa koja je primala kombinaciju 1,5 mg/kg diazepama i 20 mg/kg XLi093 imala je značajnu nižu efikasnost puta u odnosu na grupu koja je primala 1,5 mg/kg diazepama ($p=0,034$) (Slika 38), kao i značajno duži put u perifernom prstenu u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,02$) (Slika 39).



Slika 39. Uticaj 1,5 mg/kg diazepama i kombinacije 1,5 mg/kg diazepama i 10 ili 20 mg/kg XLi093 na put u perifernom prstenu tokom pet dana treninga u MVL. * $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).

U testu pozivanja memorije, nije bilo značajnog uticaja faktora tretman ni za jedan od praćenih parametara. Srednje vrednosti praćenih parametara i njihove standardne devijacije prikazane su u Tabeli 25.

Tabela 25. Srednje vrednosti parametara (\pm standardna devijacija) iz testa pozivanja memorije nakon petodnevne primene 1,5 mg/kg diazepama ili kombinacije 1,5 mg/kg diazepama i XLi093 (10 ili 20 mg/kg).

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	2,29 \pm 1,29	13,48 \pm 7,93	1,36 \pm 1,03	7,47 \pm 4,87	4,88 \pm 1,78	38,82 \pm 8,62
DZP 1.5	1,55 \pm 0,95	6,40 \pm 4,02	0,84 \pm 0,82	2,85 \pm 3,00	5,29 \pm 2,30	37,58 \pm 14,47
DZP 1.5 + XLI093 10	2,62 \pm 0,92	11,80 \pm 5,32	1,34 \pm 0,8	5,67 \pm 3,61	7,04 \pm 3,98	35,88 \pm 12,95
DZP 1.5 + XLI093 20	2,70 \pm 1,53	10,75 \pm 5,33	1,11 \pm 1,06	4,20 \pm 4,31	7,86 \pm 3,71	37,80 \pm 7,16

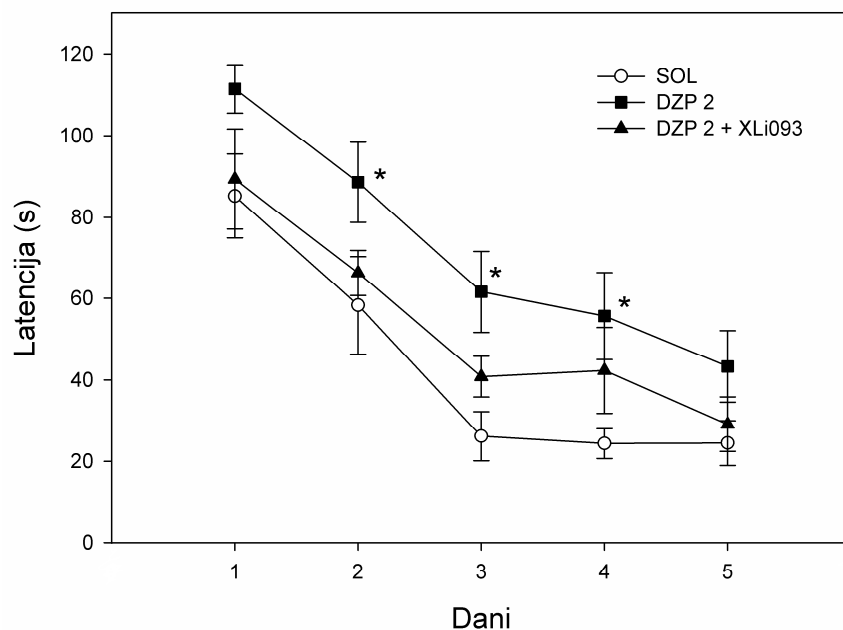
Eksperiment 12

U Eksperimentu 12 ispitivana je mogućnost antagonizovanja efekata 2 mg/kg diazepama istovremenom primenom 10 mg/kg XLi093, dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj faktora dan na sve praćene parametre, dok je uticaj faktora tretman bio značajan za latenciju (s), pređeni put (m), procenat puta i procenat vremena u perifernom prstenu. Interakcija između faktora nije bila značajna ni u jednom slučaju. Rezultati statističke analize prikazani su u **Tabeli 26**.

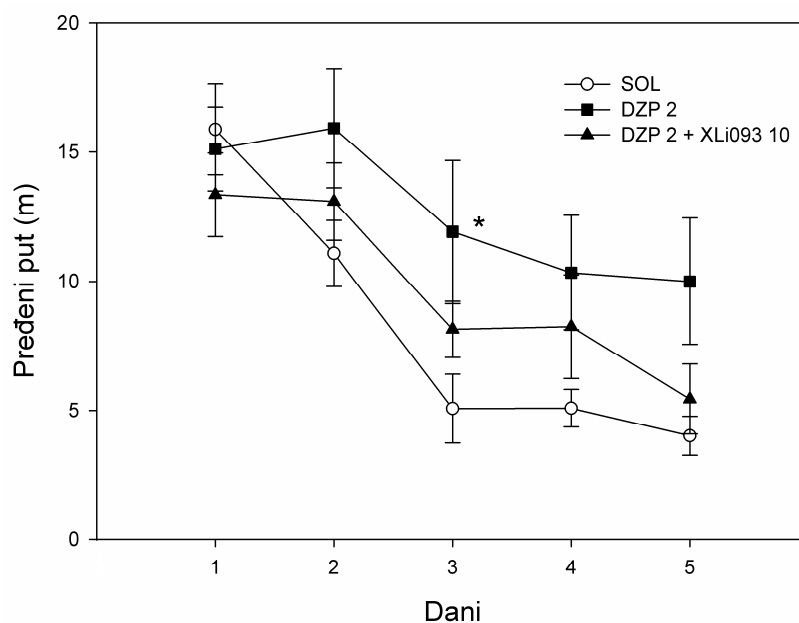
Tabela 26. Uticaj ponavljane primene 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama + 10 mg/kg XLi093 na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(2,16)}=7,426$ P=0,005	$F_{(4,64)}=34,203$ P<0,001	$F_{(8,64)}=0,267$ P=0,974
Pređeni put (m)	$F_{(2,16)}=4,409$ P=0,030	$F_{(4,64)}=16,792$ P<0,001	$F_{(8,64)}=1,067$ P=0,397
Efikasnost puta	$F_{(2,16)}=1,987$ P=0,170	$F_{(4,64)}=16,980$ P<0,001	$F_{(8,64)}=0,890$ P=0,530
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(2,16)}=11,168$ P<0,001	$F_{(4,64)}=42,475$ P<0,001	$F_{(8,64)}=1,128$ P=0,357
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(2,16)}=6,425$ P=0,009	$F_{(4,64)}=39,361$ P<0,001	$F_{(8,64)}=1,966$ P=0,065
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(2,16)}=0,725$ P=0,499	$F_{(4,64)}=4,415$ P=0,003	$F_{(8,64)}=1,24$ P=0,291

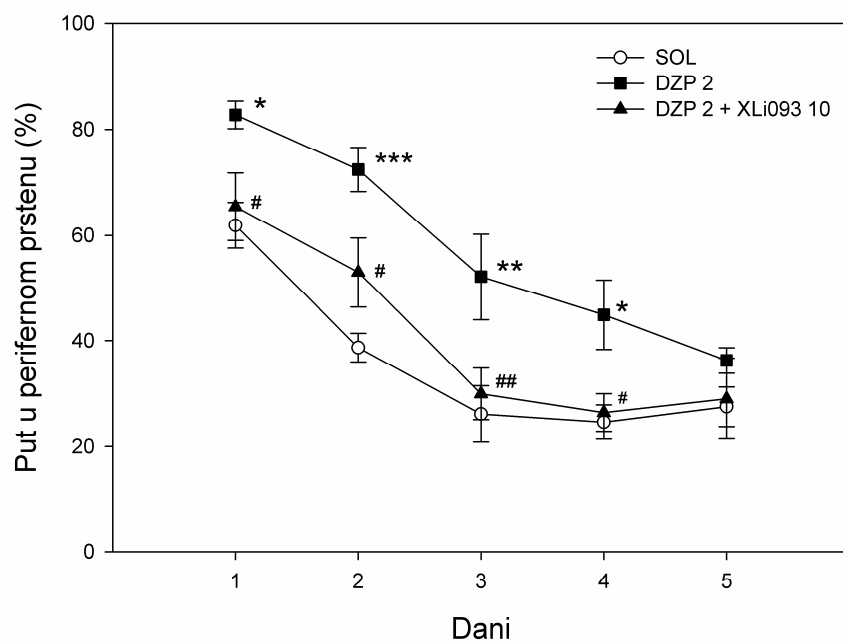
Značajno dužu latenciju nalaska platforme imale su životinje koje su primale 2 mg/kg diazepama i to u odnosu na kontrolnu grupu (p=0,004) i grupu koja je primala kombinaciju 2 mg/kg diazepama i 10 mg/kg XLi093 (p=0,021) (**Slika 40**). Životinje koje su primale 2 mg/kg diazepama prelazile su i značajno duži put (p=0,07) u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 41**). U odnosu na kontrolnu grupu i grupu koja je primala 2 mg/kg diazepama + 10 mg/kg XLi093, grupa koje je primala 2 mg/kg diazepama imala je i veći procenat puta (p=0,001 i p=0,003) (**Slika 42**) i veći procenat vremena (p=0,019 i p=0,006) (**Slika 43**) u perifernom prstenu bazena.



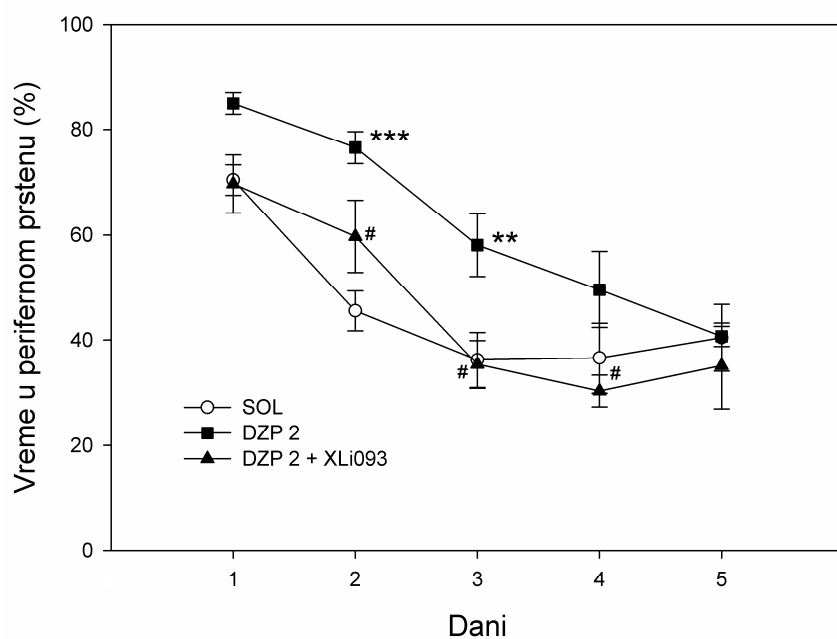
Slika 40. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama i 10 mg/kg XLi093 na latenciju nalaska platforme tokom pet dana treninga u MVL-u. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL). Broj životinja po grupi 6 - 7 (Slike 40-45).



Slika 41. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama i 10 mg/kg XLi093 na ukupni pređeni put tokom pet dana treninga u MVL-u. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).



Slika 42. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama + 10 mg/kg XLi093 na procenat puta u perifernom prstenu tokom pet dana treninga u MVL-u. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ i ## $p < 0,01$ u odnosu na diazepam 2 mg/kg (DZP 2).



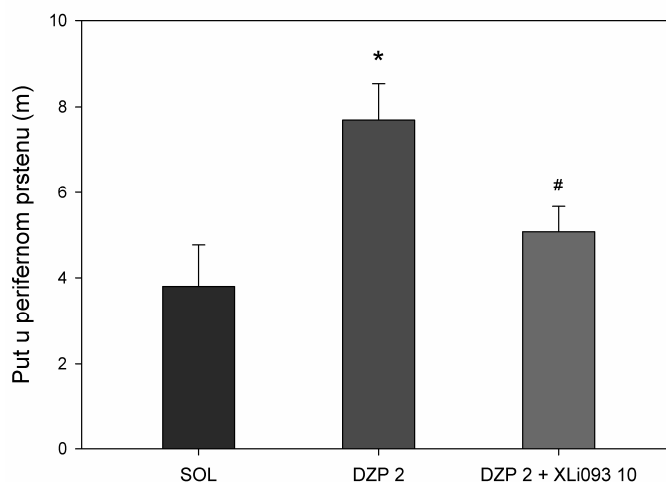
Slika 43. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama + 10 mg/kg XLi093 na procenat vremena u perifernom prstenu tokom pet dana treninga u MVL-u. ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL); # $p < 0,05$ u odnosu na diazepam 2 mg/kg (DZP 2).

Rezultati

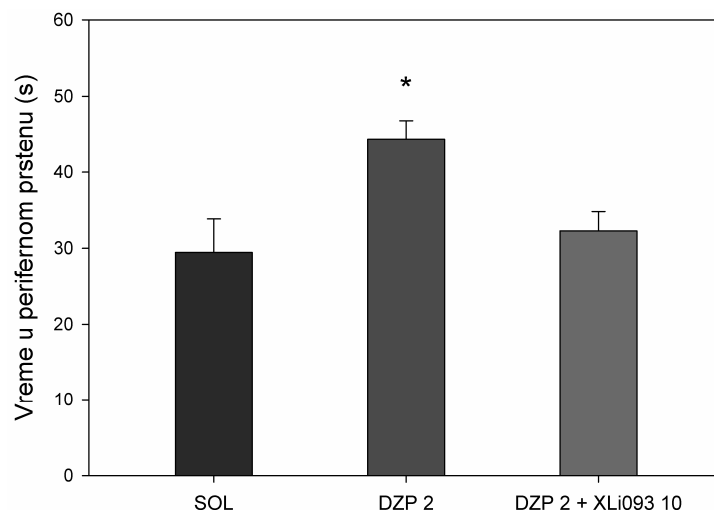
U testu pozivanja memorije, jednofaktorska ANOVA pokazala je značajan uticaj faktora tretman na vreme ($F_{(2,16)}=5,926$ i $P=0,012$) i put u perifernom prstenu ($F_{(2,16)}=6,159$ i $P=0,010$). U odnosu na kontrolnu grupu, životinje koje su primale 2 mg/kg diazepama prešle su značajno duži put u perifernom prstenu ($p=0,012$) (Slika 44). Ova grupa (diazepam 2 mg/kg) provela je i više vremena u perifernom prstenu, u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,015$), kao i u odnosu na grupu koja je primala 2 mg/kg diazepama + 10 mg/kg XLI093 ($p=0,041$) (Slika 45). Srednje vrednosti ostalih parametara praćenih u toku testa pozivanja memorije sa standardnim devijacijama prikazane su u Tabeli 27.

Tabela 27. Srednje vrednosti parametra (\pm standardna devijacija) praćenih u testu pozivanja memorije nakon petodnevne primene 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama i 10 mg/kg XLI093.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	2,33 \pm 1,23	11,57 \pm 5,08	1,54 \pm 1,12	5,90 \pm 4,73
DZP 2	2,67 \pm 0,72	13,13 \pm 4,59	0,85 \pm 0,63	3,43 \pm 2,76
DZP 2 + XLI093 10	1,97 \pm 0,64	10,77 \pm 4,92	1,19 \pm 0,72	5,13 \pm 3,26



Slika 44. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama + 10 mg/kg XLI093 na put u perifernom prstenu u testu pozivanja memorije. * $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL) i # $p<0,05$ u odnosu na diazepam 2 mg/kg (DZP 2).



Slika 45. Uticaj 2 mg/kg diazepama i kombinacije 2 mg/kg diazepama + 10 mg/kg XLI093 na b) vreme u perifernom prstenu u testu pozivanja memorije. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu (SOL).

Eksperiment 13

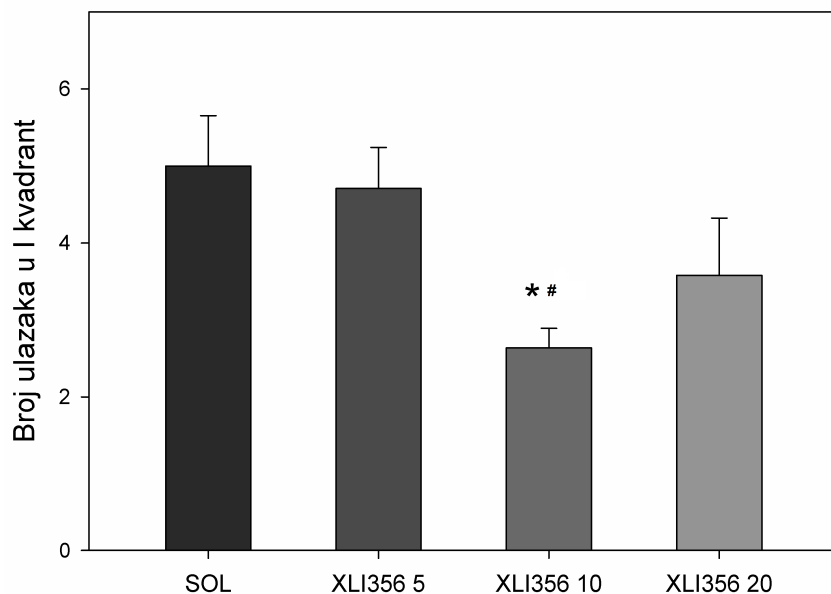
U Eksperimentu 13 ispitivan je uticaj rastućih doza XLI356 (5, 10 i 20 mg/kg) na ponašanje pacova u MVL-u. Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj faktora dan, dok uticaj faktora tretman i interakcije nisu bili značajni ni za jedan od praćenih parametara. Rezultati dvofaktorske analize prikazani su u **Tabeli 28**.

Tabela 28. Uticaj primene rastućih doza XLI356 na parametre praćene tokom tri bloka treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(3,25)}=1,455$ $P=0,251$	$F_{(2,50)}=38,454$ $P<0,001$	$F_{(6,50)}=1,380$ $P=0,241$
Pređeni put (m)	$F_{(3,25)}=1,021$ $P=0,400$	$F_{(2,50)}=29,395$ $P<0,001$	$F_{(6,50)}=1,551$ $P=0,181$
Efikasnost puta	$F_{(3,25)}=1,005$ $P=0,407$	$F_{(2,50)}=14,769$ $P<0,001$	$F_{(6,50)}=1,063$ $P=0,397$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,25)}=1,383$ $P=0,271$	$F_{(2,50)}=65,371$ $P<0,001$	$F_{(6,50)}=1,707$ $P=0,139$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,25)}=1,138$ $P=0,353$	$F_{(2,50)}=77,979$ $P<0,001$	$F_{(6,50)}=1,639$ $P=0,156$
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(3,25)}=0,116$ $P=0,950$	$F_{(2,50)}=6,979$ $P=0,002$	$F_{(6,50)}=1,064$ $P=0,397$

Rezultati

U testu pozivanja memorije, jednofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj faktora tretman za broj ulazaka u SI kvadrant ($F_{(3,25)}=3,923$ i $P=0,020$). *Post hoc* analiza pokazala je da životinje koje su primale 10 mg/kg XLI356 imaju značajno manji broj ulazaka u SI kvadrant u odnosu na kontrolu ($p=0,030$) i u odnosu na grupu koja je primala 5 mg/kg XLI356 ($p=0,037$) (Slika 46). Za ostale parametre iz testa pozivanja memorije prikazane su srednje vrednosti i njihove standardne devijacije (Tabela 29).



Slika 46. Uticaj 5, 10 i 20 mg/kg XLI356 na broj ulazaka u SI kvadrant u toku testa pozivanja memorije. * $p<0,05$ u odnosu na kontrolu (SOL); # $p<0,05$ u odnosu na XLI356 5. Broj životinja po grupi je 7.

Tabela 29. Srednje vrednosti parametara (\pm standardna devijacija) praćenih u testu pozivanja memorije nakon primene rastućih doza XLI356.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	4,74 \pm 2,16	20,07 \pm 6,70	3,09 \pm 1,65	13,39 \pm 5,53	4,18 \pm 1,74	22,01 \pm 6,62
XLI356 5	4,24 \pm 1,03	18,89 \pm 5,54	3,14 \pm 0,96	13,90 \pm 4,38	4,99 \pm 2,41	24,06 \pm 8,27
XLI356 10	2,55 \pm 1,48	10,56 \pm 6,09	1,44 \pm 1,52	5,84 \pm 6,02	6,49 \pm 3,58	32,10 \pm 11,61
XLI356 20	3,81 \pm 1,70	16,59 \pm 9,48	2,13 \pm 1,48	8,83 \pm 7,54	7,17 \pm 2,89	33,99 \pm 13,76

Eksperiment 14

U Eksperimentu 14 ispitivan je uticaj rastućih doza PWZ-029 (5, 10 i 15 mg/kg) na ponašanje pacova u MVL-u. Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj faktora dan na sve praćene parametre tokom **pet dana treninga**, dok uticaj faktora tretman i interakcija između faktora nisu bili značajni. U **Tabeli 30.** prikazani su rezultati statističke analize.

Tabela 30. Uticaj ponavljane primene rastućih doza PWZ029 na parametre praćene tokom pet dana treninga (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(3,24)}=0,733$ $P=0,542$	$F_{(4,96)}=26,289$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=1,064$ $P=0,399$
Pređeni put (m)	$F_{(3,24)}=1,799$ $P=0,174$	$F_{(4,96)}=19,234$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=1,076$ $P=0,389$
Efikasnost puta	$F_{(3,24)}=0,121$ $P=0,947$	$F_{(4,96)}=11,296$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=1,000$ $P=0,455$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,24)}=1,358$ $P=0,279$	$F_{(4,96)}=26,812$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=0,529$ $P=0,891$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,24)}=1,365$ $P=0,277$	$F_{(4,96)}=26,638$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=0,516$ $P=0,900$
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(3,24)}=0,768$ $P=0,523$	$F_{(4,96)}=11,512$ $P<0,001$	$F_{(12,96)}=0,663$ $P=0,783$

U **testu pozivanja memorije**, jednofaktorska ANOVA nije pokazala značajan uticaja faktora tretman ni za jedan od praćenih parametara. Srednje vrednosti praćenih parametara sa standardnim devijacijama date su u **Tabeli 31.**

Tabela 31. Srednje vrednosti parametara (\pm standardna devijacija) praćenih u testu pozivanja memorije nakon petodnevnne primene PWZ029.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	4,63 \pm 1,50	21,03 \pm 9,55	2,19 \pm 1,77	10,70 \pm 11,53	5,51 \pm 2,14	29,81 \pm 12,11
PWZ029 5	3,10 \pm 2,34	12,36 \pm 9,89	1,22 \pm 1,18	4,10 \pm 4,12	6,31 \pm 2,98	41,53 \pm 13,79
PWZ029 10	3,46 \pm 1,04	15,91 \pm 8,45	1,70 \pm 0,52	7,46 \pm 5,20	6,30 \pm 3,45	32,31 \pm 11,69
PWZ029 15	3,24 \pm 0,85	14,86 \pm 3,32	1,93 \pm 0,77	7,89 \pm 4,17	6,46 \pm 2,76	34,63 \pm 11,38

Ekspiriment 15

U Eksperimentu 15 ispitivan je uticaj rastućih doza PWZ029 (5, 15 i 30 mg/kg) na ponašanje pacova u MVL-u, u jednodnevnom protokolu. Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem pokazala je značajan uticaj faktora **blok plivanja**, dok uticaj faktora tretman, kao ni interakcija nisu bili značajni. Rezultati statističke analize za praćene parametre prikazani su u **Tabeli 32**.

Tabela 32. Uticaj jednokratne primene PWZ029 na parametre praćene u jednodnevnom protokolu MVL-a (dvofaktorska ANOVA).

Parametar	Tretman	Dan	Interakcija
Latencija (s)	$F_{(3,24)}=0,823$ $P=0,494$	$F_{(2,48)}=27,535$ $P<0,001$	$F_{(6,48)}=0,395$ $P=0,879$
Pređeni put (m)	$F_{(3,24)}=0,358$ $P=0,783$	$F_{(2,48)}=14,576$ $P<0,001$	$F_{(6,48)}=1,043$ $P=0,410$
Efikasnost puta	$F_{(3,24)}=0,909$ $P=0,451$	$F_{(2,48)}=17,319$ $P<0,001$	$F_{(6,48)}=1,588$ $P=0,171$
Put u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,24)}=0,990$ $P=0,414$	$F_{(2,48)}=64,536$ $P<0,001$	$F_{(6,48)}=0,253$ $P=0,9560$
Vreme u perifernom prstenu (%)	$F_{(3,24)}=0,907$ $P=0,452$	$F_{(2,48)}=76,638$ $P<0,001$	$F_{(6,48)}=0,572$ $P=0,750$
Brzina plivanja (m/s)	$F_{(3,24)}=0,660$ $P=0,585$	$F_{(2,48)}=3,676$ $P=0,033$	$F_{(6,48)}=4,200$ $P=0,002$

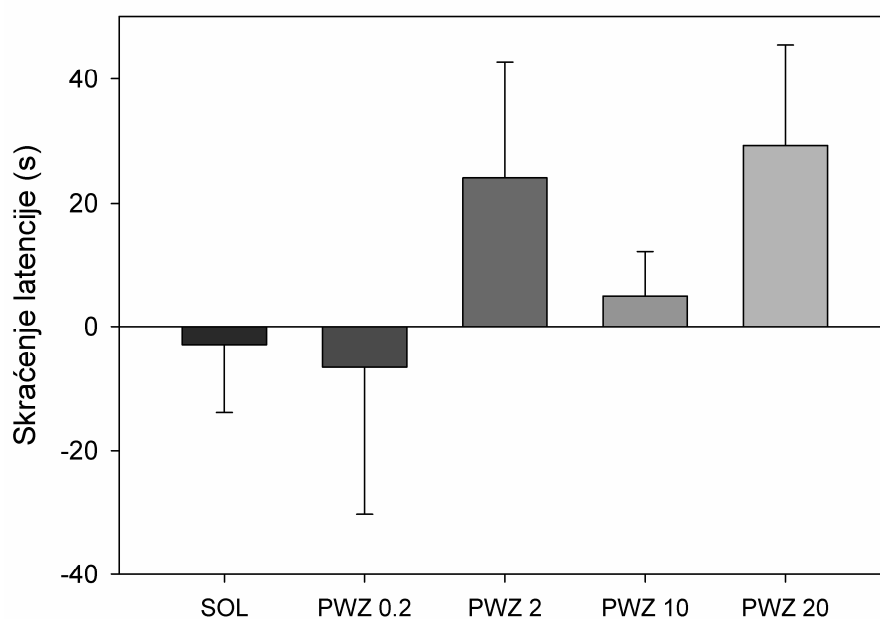
U **Tabeli 33**. prikazane su srednje vrednosti parametara praćenih u **testu pozivanja memorije**, sa standardnim devijacijama. Jednofaktorska ANOVA je pokazala da nema značajnog uticaja faktora tretman ni za jedan od praćenih parametara.

Tabela 33. Srednje vrednosti (\pm standardna devijacija) parametara praćenih u testu pozivanja memorije nakon jednokratne primene PWZ029.

Parametar	SI kvadrant		Ciljni region		Periferni prsten	
	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)	Put (m)	Vreme (s)
SOL	4,96 \pm 1,67	22,83 \pm 7,41	3,13 \pm 1,29	13,84 \pm 6,30	4,79 \pm 2,83	24,16 \pm 11,10
PWZ029 5	4,87 \pm 1,69	20,57 \pm 8,13	2,81 \pm 0,89	10,77 \pm 3,61	3,92 \pm 1,03	22,31 \pm 6,89
PWZ029 15	3,96 \pm 1,60	18,57 \pm 6,83	2,20 \pm 1,49	9,91 \pm 6,92	5,08 \pm 2,01	25,61 \pm 10,52
PWZ029 30	4,37 \pm 1,59	18,71 \pm 5,57	2,63 \pm 1,40	10,44 \pm 6,45	5,57 \pm 2,61	25,94 \pm 14,44

Eksperiment 16

U Eksperimentu 16 korišćen je protokol radne memorije, u kojem je praćen uticaj rastućih doza PWZ029 (0,2; 2, 10 i 20 mg/kg) na skraćenje latencije (s) između prvog i drugog plivanja na dan testiranja, jednofaktorska ANOVA nije pokazala značajan uticaj faktora tretman ($F_{(4,45)}=0,956$, $P=0,441$). Skraćenje latencije na dan testiranja prikazano je na **Slici 47**.



Slika 47. Uticaj rastućih doza PWZ029 (0,2; 2, 10 i 20 mg/kg) na skraćenje latencije između prvog i drugog u protokolu radne memorije. Broj životinja po grupi je 10.

5. DISKUSIJA

5.1. Neselektivni modulatori benzodiazepinskog mesta vezivanja

Opšte je prihvaćeno pravilo da pozitivni i negativni modulatori benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora dovode do suprotnih bihevioralnih efekata (Petersen, 1983; Duka i sar., 1988; Maubach, 2003; Atack i sar., 2005). Kada je u pitanju ispitivanje učenja i pamćenja kod eksperimentalnih životinja, za obe farmakološke grupe, međutim, može se uopšteno reći da je, usled ispoljene neselektivnosti ovih liganada, ponekad teško razlučiti šta je zapravo kognitivni, a šta nekognitivni efekat u jednom memorijskom testu u kome se uticaj leka procenjuje na osnovu motornih parametara.

Pozitivni modulatori benzodiazepinskog mesta vezivanja utiču negativno na više kognitivnih aspekata: pažnju, budnost, koncentraciju, učenje i pamćenje. U kliničkim uslovima, primenom odgovarajućih testova moguće je razdvojiti uticaj lekova na svaki od ovih procesa/stanja, što nije slučaj kada se ispitivanja rade na eksperimentalnim životinjama. Iako se kroz literaturu vrlo često sreću izrazi „kognitivni efekti leka“, „poboljšivači kognicije“ i „oštećenje kognicije“, ono što se zapravo testira u prekliničkim uslovima, kod životinja, jeste pamćenje. Da li je lek pri tome uticao i na budnost i pažnju, teško je reći. Za očekivati je da se u takvim situacijama tumačenje rezultata dobijenih na životinjama može u izvesnoj meri osloniti na podatke dobijene iz kliničkih ispitivanja. Tako je na primer pokazano da sedacija, iako smanjuje pažnju i reaktivnost pacijenata ka spoljnim stimulusima i oštećuje izvođenje baterije psihomotornih testova, nije „krivac“ za loše pamćenje pod uticajem benzodiazepina. Primena flumazenila kod zdravih dobrovoljaca može da prevenira uticaj diazepama i midazolama na budnost i pažnju, ali ne i da spreči značajna memorijska oštećenja (Curran i Birch, 1991; Hommer i sar., 1993). Sličnih ispitivanja sa neselektivnim inverznim agonistima nema, ali se, po analogiji sa pozitivnim modulatorima, može pretpostaviti da povećanje budnosti i pažnje, iako može da doprinese, nije jedini mehanizam koji dovodi do poboljšanja pamćenja.

Da je u pitanju specifični uticaj benzodiazepinskih liganada na učenje i pamćenje, govori i činjenica da pozitivni modulatori benzodiazepinskog mesta vezivanja

u *in vitro* uslovima, na preparatima hipokampusu pacova, inhibiraju indukciju LTP-a (del Cerro i sar., 1992), koji se smatra elektrofiziološkim korelatom učenja i pamćenja (Lynch, 2004), dok neselektivni negativni modulatori, poput DMCM-a, dovode do njegovog povećanja (Seabrook i sar., 1997). Ovaj nalaz ipak nije konzistentan za sve predstavnike jedne iste farmakološke grupe, pa je tako u slučaju benzodiazepina pozitivan za midazolam i diazepam, ali ne i klonazepam (del Cerro i sar., 1992; Evansi Viola-McCabe, 1996; Tokuda i sar., 2010), što svakako može uticati i na tumačenje rezultata dobijenih sa ovim supstancama.

5.1.1. Uticaj diazepama na ponašanje pacova u MVL-u

Dozno zavisni uticaj diazepama na učenje i pamćenje u MVL-u prethodno je ispitivan u dve studije, koje su po dizajnu slične našem eksperimentu (Arolfo i Brioni, 1991; Cain, 1997). Najniža efikasna doza u našem eksperimentu (1,5 mg/kg) nalazi se između doza koje su bile efikasne u ta dva eksperimenta, 1 mg/kg (Arolfo i Brioni, 1991) i 3 mg/kg diazepama (Cain, 1997). Ipak, kako se pokazalo u Eksperimentima 6 i 11, doza od 1,5 mg/kg diazepama, uprkos istom protokolu, ne dovodi uvek do oštećenja, te se može smatrati da je u našim eksperimentalnim uslovima pouzdana, inkapacitirajuća doza 2 mg/kg diazepama.

Tokom pet dana treninga, pacovi koji su primali diazepam (1,5; 2 i 5 mg/kg) značajno su sporije usvajali lokaciju skrivene platforme, što se pokazalo kroz produženje latencije i pređenog puta, uz smanjenje efikasnosti nalaska platforme. Istovremeno, ove životinje provodile su značajno više vremena u perifernom prstenu bazena i usvajale karakterističnu strategiju plivanja i lociranja platforme. Naime, za razliku od kontrolnih životinja koje se ubrzo nakon puštanja u bazen orijentišu ka platformi i usmeravaju pretragu ka širem ili užem regionu, kod pacova tretiranih diazepamom uočava se odsustvo jasne predstave o njoj lokaciji: životinje tipično kruže po bazenu dok na kraju ne „udare“ o platformu. Pri višim dozama (2 i 5 mg/kg), tokom prvih dana treninga, zapažena su i karakteristična preplivavanja i odbijanja od platforme, koja prema nekim autorima upućuju na prisustvo senzomotornih smetnji (Cain, 1997). Što se tiče brzine plivanja, samo je grupa koja je primala najvišu dozu (5 mg/kg) diazepama imala značajno nižu brzinu i u odnosu na kontrolu i u odnosu na ostale tri grupe koje su

primale diazepam. S obzirom da su i niže doze od ove (1,5 i 2 mg/kg) dovele do oštećenja učenja u MVL-u, smanjena brzina plivanja ne može se specifično povezati sa smanjenjem sposobnosti usvajanja pozicije platforme, što dodatno potvrđuje nalaz koji su dobili McNamara i Skelton (1991).

Primena diazepam tokom petodnevnog treninga odrazila se i na ponašanje pacova u testu pozivanja memorije. Za parametre koji su pokazatelji očuvanosti prostorne memorije (vreme u ciljnom kvadrantu, vreme i put u ciljnom regionu) nađen je negativan dozno-zavisni uticaj diazepam (1,5; 2 i 5 mg/kg). Ovi pacovi tokom testa pozivanja memorije nasumično plivaju po bazenu, bez usmeravanja pretrage u ciljni kvadrant, provodeći pri tome 75% vremena u perifernom prstenu, kružeći uz unutrašnje ivice bazena. Očuvanje tigmotakse i tokom testa pozivanja memorije upućuje da to nije akutni inkapacitirajući efekat diazepam. Diskretno oštećenje pamćenja u testu pozivanja memorije pokazalo se i za grupu koja je primala 1 mg/kg diazepam, a koja je tokom pet dana treninga bila ni nivou kontrole. Ovaj nalaz je interesantan jer upućuje na to da su izvesni memorijski efekti diazepam prisutni i onda kada svakodnevna primena ne dovodi do vidljivih oštećenja. Na sličan zaključak navode i Arolfo i Brioni (1991), koji su sa najnižom dozom diazepam (0,3 mg/kg) u testu pozivanja memorije zapazili sličan efekat. Prema tome, može se zaključiti da je sâm MVL, kao memorijski test, izuzetno osetljiv na uticaj diazepam.

Postoje različita tumačenja prirode oštećenja koje se vidi pri primeni diazepam u MVL-u. McNamara i Skelton (1991) sugerišu da diazepam specifično interferira sa memorijskim procesima u MVL-u, izazivajući reverzibilnu anterogradnu amneziju. S druge strane, Cain (1997) navodi da je deficit u akviziciji tokom treninga u MVL-u posledica senzomotornih smetnji koje diazepam izaziva, a koje su inkompatibilne sa adaptivnim ponašanjem i učenjem u MVL-u. Naime, Cain (1997) je pokazao da ako se pacovi prvobitno podvrgnu treningu koji se sastoji od nekoliko blokova plivanja sa promenljivom pozicijom platforme, ali bez primene tretmana, oni kasnije, kada se testiraju u MVL-u, vrlo brzo nauče novu poziciju platforme čak i uz primenu diazepam, i ispoljavaju normalno ponašanje, bez izražene tigmotakse, odbijanja od platforme, skakanja sa nje ili njenog preplivavanja. Šire posmatrano, pozitivan uticaj prethodnog treninga opisali su još Herz (1959) i Steinberg i sar. (1961), koji su našli da prethodno iskustvo sa uslovima testiranja može da eliminiše uticaj skopolamina ili kombinacije

amfetamina i barbiturata na izvođenje određenih memorijskih testova kod oglednih životinja. I sâm Morris (1989) je pokazao da prethodni trening u MVL-u (bez stalne pozicije platforme) može da ublaži senzomotorne smetnje izazvane primenom antagoniste NMDA receptora i poboljša učenje u vodenom lavirintu, što je objašnjeno mogućnošću učenja „upotrebe platforme“ i usvajanja opšte bihevioralne strategije koja je važna za izvođenje testa pod uticajem leka. Međutim, Ballard i sar. (2009) i posle višednevnog pretreninga dobijaju značajan uticaj diazepama na učenje nove pozicije platforme, što ukazuje na moguću interferenciju sa memorijskim procesom.

Poput Cain-a (1997), i Zanotti i sar. (1994) pokazali su da diazepam ne oštećuje učenje u MVL-u kod pacova koji su prethodno familijarizovani sa vodenom sredinom u bazenu. U istoj studiji, pokazano je i da diazepam ne utiče na učenje kada se životinjama koje su primale rastvarač primeni diazepam, a platforma iz prvobitne pozicije premesti u drugi kvadrant (tzv. reverzno učenje). Međutim, za razliku od Cain-a (1997), koji je oštećenje izvođenja u MVL-u pripisao senzomotornim smetnjama, Zanotti i sar. (1994) zaključuju da primarni mehanizam kojim diazepam oštećuje memoriju jeste ispoljavanje anksiolitičkog dejstva. MVL je averzivno motivisan test, a benzodiazepini bi mogli oštetiti učenje u MVL-u smanjujući anksioznost i motivaciju da se pronade najbrži izlaz iz vodene sredine. Na ovaj način bi se, prividno, mogli objasniti i povezati suprotni efekti benzodiazepina i neselektivnih inverznih agonista, za koje je pokazano da u dozama u kojima deluju proanksiogeno poboljšavaju i učenje u MVL-u (McNamara i Skelton, 1993b). Međutim, čvrst dokaz za vezu između prokognitivnih i anksiojenih efekata još uvek nije pronađen, a protiv ove hipoteze govori i studija u kojoj je pokazano da morfin može da uspori akviziciju, ali za razliku od diazepama, ne sprečava formiranje prostorne memorije u MVL-u (McNamara i Skelton, 1992).

U našem eksperimentu, najniža doza koja je dovela do oštećenja akvizicije i formiranja prostorne memorije bila je 1,5 mg/kg diazepama. Ranija istraživanja su pokazala da se sedativni efekat diazepama, izražen kao smanjenje lokomotorne aktivnosti (SLA), može zapaziti već u dozama od 1,25 mg/kg (Savić i sar., 2010). Fitzgerald i Dokla (1989) su pokazali da hipolokomotorni uticaj nekog tretmana u SLA nema reperkusija na brzinu plivanja u MVL-u. Naša studija potvrđuje ovaj nalaz, budući da diazepam u dozama od 1,5 i 2 mg/kg nije ispoljio smanjenu brzinu plivanja. Međutim, smanjena aktivnost u testu SLA ne znači samo smanjenu brzinu, već i

smanjenu eksploraciju nove okoline (smanjenje pređenog puta). U tom smislu se hipolokomotorni (sedativni) uticaj diazepama može posmatrati kao smanjenje pobuđenosti i motivacije životinje, pa se ta vrsta uticaja, za sada, ne može isključiti ni u MVL-u. Što se tiče anksiolitičkog dejstva diazepama, kao mogućeg nekognitivnog uticaja u MVL-u, ono se, zavisno od studije, može zapaziti već od 1 mg/kg (Wilson i sar., 2005) ili 1,5 mg/kg diazepama (Griebel i sar., 1996), a za obe doze je u našem eksperimentu pokazana određena amnezijaska aktivnost. Miorelaksacija, za koju je zapaženo da se javlja već u dozi od 2 mg/kg diazepama (Milić i sar., 2012), verovatno je od većeg značaja samo u slučaju najviše doze diazepama (5 mg/kg), pri kojoj su životinje, naročito tokom prvih dana treninga u MVL-u, imale problem održavanja na površini vode.

Uzimajući u obzir neselektivno dejstvo diazepama i doze pri kojima dolazi do ispoljavanja kognitivnih i nekognitivnih efekata benzodiazepina, izgleda da je opravdano pitanje koliko je efekat u MVL-u zaista čisto oštećenje učenja (McNamara i Skelton, 1991), a koliko neselektivna inkapacitacija (Cain, 1997). Imajući u vidu interakcije između pažnje, pobuđenosti, anksioznosti i kognitivnih funkcija (Curran, 1991), u ovom momentu je teško proceniti da li naši rezultati govore u prilog jednog ili drugog pristupa. Moguće je da su u procesu oštećenja izvođenja zadatka u MVL-u u uslovima ponavljane primene diazepama oba tipa uticaja od značaja.

5.1.2. Uticaj midazolama na akviziciju, konsolidaciju i pozivanje memorije

Malobrojne su studije koje su ispitivale uticaj benzodiazepina na različite memorijske stadijume u MVL-u. U DMTP (eng. *delayed matching to position*) verziji testa, koja se koristi za ispitivanje radne memorije, pokazano je da hlordiazepoksid oštećuje izvođenje kada se primeni pre akvizicije i pre testa pozivanja memorije, ali da ne utiče na fazu konsolidacije (Collinson i sar., 2006). Što se tiče protokola koji ispituju referentnu memoriju, relativno je konzistentan nalaz da benzodiazepini oštećuju akviziciju i retenciju memorije kod glodara (McNamara i Skelton, 1991; Brioni i Arolfo, 1992; Saraf i sar., 2003), dok su podaci o mogućim uticajima na konsolidaciju retki. Pokazano je da jednokratna primena brotizolama i triazolama pre testa pozivanja memorije u MVL-u oštećuje izvođenje kod miševa koji su tokom četiri dana treninga primali samo inertni

rastvarač (Saraf i sar., 2003). U istom eksperimentu, diazepam nije ošteti pozivanje memorije (Saraf i sar., 2003), što je u skladu sa rezultatima dobijenim i kod pacova u MVL-u (Brioni i Arolfo, 1992).

U okviru našeg istraživanja, sprovedena su tri eksperimenta koja su se razlikovala po vremenu kada je midazolam primenjivan, pre ili odmah nakon svake od pet sesija plivanja (uticaj na akviziciju, odnosno konsolidaciju), ili pre testa pozivanja memorije (uticaj tretmana na pozivanje referentne memorije), pri čemu je u prva dva slučaja midazolam primenjivan tokom pet dana treninga, a u trećem slučaju samo jednom, šestog dana. Analiza parametara praćenih tokom ispitivanja uticaja na akviziciju pokazala je da su sve tri doze midazolama oštetile učenje pozicije skrivene platforme, pri čemu je uticaj najveće doze (2 mg/kg) bio najviše izražen. Kod dve niže doze (0,5 i 1 mg/kg), zapažen je normalan gubitak tigmotakse, kao i kod kontrolnih životinja, dok se kod primene najviše doze tigmotaksa održala tokom cele faze učenja. Kao ni diazepam, ni midazolam nije uticao na brzinu plivanja tokom treninga u MVL-u, čime se isključuje mogući uticaj motornih efekata na ponašanje pacova u fazi učenja.

S obzirom na to da je u našem eksperimentu pri proučavanju uticaja tretmana na akviziciju midazolam primenjivan pre svakog bloka plivanja, a da nakon završetka bloka nije primenjivan antagonist koji bi prekinuo dejstvo primenjenog tretmana (uporediti Collinson i sar., 2006), potrebno je razmotriti mogućnost uticaja tretmana i na fazu konsolidacije memorije. Farmakokinetičke osobine leka imaju veliki značaj kada je u pitanju dizajn studije u kojoj se lek daje pre ili posle učenja s ciljem da selektivno deluje na akviziciju ili konsolidaciju. Među svim klinički relevantnim benzodiazepinima, midazolam ima najbrži nastup, ali i najkraće trajanje dejstva (Mandema i sar., 1991; Lau i sar., 1996; Olkkola i Ahonen, 2008). Ipak, koncentracija midazolama oko pola sata nakon primene, što odgovara vremenu kada bi trebalo da počne konsolidacija u našem eksperimentu, i dalje iznosi oko 50% od maksimalne vrednosti. U tom smislu, postojala je šansa da supstanca primenjivana pre treninga ostvari svoj uticaj ne samo na akviziciju, već i na konsolidaciju memorije. Međutim, u našem eksperimentu, kada je midazolam davan nakon završetka bloka plivanja, nije zapažen nikakav uticaj na učenje tokom pet dana treninga, a ni šestog dana u testu pozivanja memorije. Na taj način se može zaključiti da oštećenje učenja i pamćenja u testu akvizicije nije uključivalo i iole znatniji uticaj midazolama na konsolidaciju. Analizom parametara u testu pozivanja memorije

šestog dana, iz oba navedena eksperimenta, može se zaključiti da uočene promene tokom faze učenja rezultuju odgovarajućim promenama u referentnoj memoriji.

Rezultati iz eksperimenta u kome je praćen uticaj midazolama na akviziciju u potpunosti odgovaraju rezultatima dobijenim u drugim studijama (McNamara i Skelton, 1991; Cain, 1997; Saraf i sar., 2003). U MVL-u do sada nije istraživana uticaj primene benzodiazepina neposredno nakon završetka bloka plivanja, u protokolu referentne memorije. Postoji mogućnost da je u ranijim ispitivanjima u drugim testovima, zbog brze eliminacije midazolama, bilo lažno negativnih rezultata. Naime, u nekim testovima za praćenje učenja identifikovana su dva vremenska „prozora“ konsolidacije u kojima je moguće da dođe do oštećenja: jedan u vreme treninga, a drugi 3–4 sata nakon treninga (Bourtchouladze i sar., 1998). Izračunata koncentracija midazolama u ovom drugom periodu („prozoru“) manja je od 2% od maksimalne vrednosti, što najverovatnije nije dovoljno za delovanje u toj kasnijoj fazi. Ipak, činjenica da midazolam oštećuje kontekstualno uslovljavanje strahom kada se primeni centralno odmah nakon treninga, ali da nema uticaja ako se primeni 3 sata nakon treninga (Gafford i sar., 2005) potkrepljuje pretpostavku da bi efekti midazolama na konsolidaciju memorije u MVL-u, ukoliko postoje, trebalo da se uoče upravo u ovakvoj postavci eksperimenta – pri primeni neposredno nakon završenog treninga. Konačno, s obzirom na to da se oštećenje konsolidacije pri primeni benzodiazepina u memorijskim testovima kod životinja nalazi dosta retko (Jensen i sar., 1979; Chrobak i Napier, 1992; Gafford i sar., 2005), može se zaključiti da je izostanak uticaja midazolama na konsolidaciju očekivan nalaz, koji je već pokazan u MVL-u, ali u verziji testa u kojoj se ispituje radna memorija (Collinson i sar., 2006).

Prethodna istraživanja su pokazala da diazepam, ukoliko nije primenjivan tokom treninga, kasnije ne utiče na pozivanje referentne memorije u MVL-u (McNamara i Skelton, 1991; Brioni i Arolfo, 1992). Rezultati našeg eksperimenta u kojem je ispitan uticaj midazolama na pozivanje memorije pokazuju da midazolam pripada onoj grupi benzodiazepina (triazolobenzodiazepini, brotizolam i triazolam) koji oštećuju pozivanje memorije (Saraf i sar., 2003). S obzirom na to da je srednja brzina plivanja pacova koji su primili midazolam neposredno pre testa pozivanja memorije bila na nivou kontrolne grupe, isključen je mogući uticaj smanjene motorne aktivnosti na izvođenje naučenog zadatka (podaci nisu prikazani). Kada su u pitanju drugi memorijski testovi koji se

koriste kod oglednih životinja, rezultati su nekonzistentni: u određenim eksperimentima je pokazano da benzodiazepini oštećuju pozivanje memorije (Cole i Michaleski, 1984; Borde i sar., 1997), u drugim da ne ispoljavaju efekat (Venault i sar., 1986), a bilo je i onih koji ukazuju na facilitirajući uticaj benzodiazepina na pozivanje (Savić i sar., 2003; Obradović i sar., 2004). Ovi kontradiktorni nalazi ukazuju na to da efekti benzodiazepina na pozivanje memorije u velikoj meri zavise od postavke eksperimenta. Što se tiče rezultata iz kliničkih ispitivanja, dominantan je utisak da midazolam ne oštećuje ono što je već naučeno (Twersky i sar., 1993), dok je retrogradna amnezija retko prijavljivana (Koht i Moss, 1997).

Poredeći amnezijsko dejstvo diazepama i midazolama kod pacijenata na predijagnostičkoj medikaciji, Hennessy i sar., (1991) zaključuju da midazolam ima značajno izraženije amnezijsko dejstvo od diazepama, kada se primene u ekvipotentnim dozama. Kada se uporede uticaji midazolama sa uticajem diazepama na ponašanje pacova u MVL-u (Brioni i Arolfo, 1992; sadašnji rezultati), razlika postoji u tom smislu što midazolam utiče negativno, a diazepam uopšte ne utiče na pozivanje referentne memorije. Ako se uzmu u obzir *in vitro* podaci o afinitetima ova dva liganda (Graham i sar., 1996; Savić i sar., 2010), uočava se visok, subnanomolarni afinitet midazolama za GABA_A receptore koji sadrže α_5 podjedinicu (oko 18 puta veći od afiniteta diazepama), što bi moglo, makar delimično, objasniti uočenu razliku u bihevioralnim profilima u MVL-u. Hipokampus, struktura sa visokom ekspresijom α_5 GABA_A receptora (Pirker i sar., 2000), od ključnog je značaja ne samo za formiranje memorije uopšte (Izquierdo i Medina, 1997) već i za pozivanje prostorne memorije (Moser i Moser, 1998). Midazolam i diazepam blokiraju indukciju LTP-a na preparatu hipokampusa pacova (del Cerro i sar., 1992; Evans i Viola-McCabe, 1996; Tokuda i sar., 2010), dok zolpidem, koji ima izuzetno nizak afinitet za α_5 GABA_A receptore, može da izazove ovaj efekat samo pri veoma visokim koncentracijama (Higashima i sar., 1998). Konačno, uočena razlika između diazepama i midazolama može biti objašnjena i aktivnošću preko translokatornog proteina (18 kDa) (TSPO), ranije poznatog kao „periferni benzodiazepinski receptor“. Naime, iako su oba ova leka ligandi za TSPO (Rupprecht i sar., 2010; Tokuda i sar., 2010), samo za midazolam je potvrđeno da je aktivacija i GABA_A receptora i TSPO neophodna za inhibiciju LTP-a (Tokuda i sar., 2010).

5.1.3. Uticaj negativnog neselektivnog modulatora, DMCM-a

Sposobnost neselektivnih inverznih agonista, mahom iz grupe beta-karbolina (β CCM, FG7142, DMCM, β CCP), da pospeše procese učenja i pamćenja dokumentovana je rezultatima iz više prekliničkih i kliničkih studija (pregled dat u Venault i Chapouthier, 2007), pri čemu je zapaženo da ove supstance u visokim dozama mogu da deluju konvulzivno, u srednjim anksiogeno, a da niže doze ispoljavaju promnezijsko dejstvo. Kao i benzodiazepini, i beta-karbolini deluju specifično na fazu akvizicije. U testovima ponavljanog izlaganja, bihejvioralni efekti mogu se zapaziti kada se supstanca primeni pre ili neposredno nakon akvizicione sesije, a izostaju ako se supstanca primeni pre sesije pozivanja. Zbog toga neki autori smatraju da su termini „amnezijski“ i „promnezijski“ suviše opšti i da je preciznije reći “oštećenje i pospešivanje procesa akvizicije” (Ghoneim i Mewaldt, 1975; Ghoneim i sar., 1984).

DMCM je neselektivni negativni modulator benzodiazepinskog mesta vezivanja, za koga je pokazano da, u zavisnosti od testa i primenjene doze, može i da poboljša i da ošteti učenje, ali i da ne ispolji značajne efekte na pamćenje. U testu pasivnog izbegavanja kod pacova, DMCM pokazuje dvofazni efekat, gde niža doza (0,1 mg/kg) olakšava, a viša (0,5 mg/kg) oštećuje učenje (File i Pellow, 1988). U istom testu, Savić i sar. (2005b) nalaze facilitaciju memorije sa 0,2 mg/kg DMCM-a, dok su niže (0,1 mg/kg) i više doze (0,5 i 2 mg/kg) bile bez efekta, te dozno-efektna kriva ima oblik obrnutog slova U. I u testu dvosmernog aktivnog izbegavanja averzivne draži, DMCM u najnižoj dozi (0,1 mg/kg) poboljšava akviziciju/konsolidaciju kod pacova, dok su više doze bez efekta (0, 5, 1 i 2 mg/kg) (Savić i sar., 2005a). Sieve i sar. (2001) su u testu Pavlovljevog uslovljavanja kod pacova registrovali oštećenje učenja sa najvišom dozom (0,25 mg/kg) DMCM-a, dok pri nižim dozama (0,015 i 0,06 mg/kg) nije bilo efekta. Kod miševa, u istom testu, sâm DMCM primenjen u dozi od 2 mg/kg nije ispoljio značajnu aktivnost, ali je uspeo da otkloni oštećenje izazvano prethodnom primenom skopolamina (DeLorey, 2001).

Uticaj DMCM-a na ponašanje pacova u MVL-u do sada nije ispitivan. U našem eksperimentu, parametri praćeni tokom pet dana treninga bili su na nivou kontrolne grupe, za sve tri doze DMCM-a. Međutim, test pozivanja memorije pokazao je da su dve veće doze (0,5 i 1 mg/kg), oštetile formiranje prostorne memorije, što se manifestovalo

kroz značajno smanjenje puta u SI kvadrantu i ciljnom regionu. Razlog izostanka značajnih efekata tokom faze učenja može biti u izboru protokola sa manjim brojem plivanja tokom pet dana treninga. Naime, u takvom protokolu kontrolne životinje sporije uče, što je pogodno za ispoljavanje promnezijskih dejstava, dok su eventualna oštećenja teže uočljiva. U istom protokolu, McNamara i Skelton (1993b) dobili su facilitatorni efekat sa neselektivnim inverznim agonistom β CCM-om, iskazan kroz skraćenje pređenog puta tokom treninga, i sklonost ka odgovarajućem kvadrantu u testu pozivanja memorije. U našem eksperimentu, ne samo da nije bilo facilitatornog uticaja, već se pod uticajem dve više doze DMCM-a pozicija platforme slabije usvajala, što se i pokazalo u testu pozivanja memorije. Ovaj eksperiment upravo potvrđuje značaj testa pozivanja za procenu dugotrajne referentne memorije, na koji su ukazali i Baldi i sar. (2005).

Zbog nekonzistentnosti nalaza, tumačenje uticaja neselektivnih inverznih agonista na izvođenje u različitim memorijskim testovima nužno uključuje procenu nekognitivnih faktora, koji u značajnoj meri mogu da utiču na rezultate eksperimenta. U tom smislu se memorijski efekti β -karbolina povezuje direktno sa vrstom i „težinom“ memorijskog zadatka, kao i anksiozenim potencijalom same supstance (Beracochea, 2006). Često se „optimalni“ nivo anksioznosti dovodi u vezu sa olakšanjem, a veći nivo anksioznosti sa otežavanjem učenja (Eysenck, 1985). Iako su učenje i anksioznost najverovatnije posredovani različitim podtipovima GABA_A receptora, činjenica je da se u mozgu nalaze i receptori sa više različitih α -podjedinica u istom GABA_A kompleksu (Sieghart i Sperk, 2002), koji verovatno imaju svoj evolutivni smisao, ali i da isti region mozga, limbički sistem, reguliše oba ova stanja/procesa (McGaugh, 2002; Bast i Feldon, 2003). Međutim, u svom eksperimentu, McNamara i Skelton (1993b) poboljšanje učenja ne dovode u vezu sa povećanjem anksioznosti pod uticajem β CCM-a, jer doza koja je delovala anksigeno nije bila aktivna u MVL-u. S druge strane, od dve doze DMCM-a koje su u MVL-u oštetile učenje (0,5 i 1 mg/kg), samo je za višu dozu pokazano anksigeno dejstvo u uzdignutom plus lavirintu (Savić i sar., 2004), tako da ovaj nalaz zahteva dodatna objašnjenja. Naime, učenje u MVL-u je samo po sebi averzivno motivisano ponašanje, koje čak i kada se averzivni faktori (poput hladne vode) svedu na minimum, predstavlja stresan događaj za životinje. Pod ovim uslovima, dodatni stres može ispoljiti značajan uticaj na savlađivanje zadatka (D’Hooge i De Deyn, 2001). Za razliku od MVL-a, određeni nivo anksioznosti je preduslov za bolje izvođenje u testu

pasivnog izbegavanja (Ribeiro i sar., 1999). Hölscher (1999) je pokazao da životinje koje nisu prošle kroz pred-eksperimentalno rukovanje imaju bolje izvođenje i u testovima aktivnog izbegavanja, ali da suprotno tome, imaju sporije učenje u testovima prostorne memorije. Iz ovih nalaza se može zaključiti da potencijal anksioznog dejstva koji imaju neselektivni inverzni agonisti ne bi trebalo da suštinski doprinosi mogućem prokognitivnom dejstvu ovih supstanci u MVL-u, već da bi mogao da doprinese oštećenju izvođenja u ovom testu.

Ako se uzmu u obzir navedene metodološke razlike, ali i sama varijabilnost rezultata dobijenih na istoj vrsti, sa istim dozama jedne supstance i u okviru jednog testa (File i Pellow, 1988; Savić i sar., 2005b), nameće se zaključak da promnezijijski efekat inverznih agonista nije robustan nalaz, koji bi bio karakterističan za jednu supstancu ili grupu hemijski srodnih jedinjenja, kao što je to slučaj sa amnezijijskim efektom benzodiazepina. Pri tome se mehanizam poboljšanja, kao ni pogoršanja akvizicije, ne može objasniti isključivo proanksioznim dejstvom same supstance, i ne isključuje mogućnost učešća različitih podjedinica GABA_A receptora.

5.2. Supstance selektivne za α_1 -podtip GABA_A receptora

Od supstanci koje pokazuju selektivnost za α_1 -podtip GABA_A receptora, do sada su u MVL-u ispitivani samo selektivni pozitivni modulatori, zaleplon (Noguchi i sar., 2002) i CL218,872 (McNamara i Skelton, 1992), dok podataka o primeni α_1 -selektivnih antagonista nema. U našem eksperimentu, α_1 -selektivni neutralni modulator β CCt, primenjen u dozi 15 mg/kg, u potpunosti je antagonizovao uticaj diazepama (2 mg/kg) na sve parametre praćene tokom pet dana treninga, kao i tokom testa pozivanja memorije. Ovaj rezultat upućuje na dominantnu ulogu α_1 -podjedinice u ispoljavanju efekata diazepama u MVL-u, s obzirom da njegov efekat preko receptora koji sadrže preostale tri podjedinice (α_2 , α_3 i α_5) nije bio dovoljan za oštećenje memorije. Na ovaj način, indirektno je opovrgnuta hipoteza da bi oštećenje učenja i pamćenja u MVL-u moglo biti posledica anksiolitičkog dejstva diazepama (Zanotti i sar., 1994). Savić i sar. (2004) su pokazali da pri primeni kombinacije midazolama i β CCt-a (30 mg/kg) može čak doći i do pojačanja anksiolitičkog dejstva kod pacova u uzdignutom plus lavirintu. U našem eksperimentu, očuvanje ili moguće pojačanje anksiolitičke aktivnosti diazepama

nije od značaja, budući da je, ukupno gledano, ponašanje životinja u MVL-u bilo na nivou kontrole. U tom smislu, naši rezultati su u potpunosti u skladu sa publikovanim nalazima o ulozi α_1 podjedinice u amnezijским efektima benzodiazepina, dobijenim na genetski modifikovanim miševima (Rudolph i sar., 1999) i potvrđenim u farmakološkim studijama (Huang i sar., 2010; Zanin i sar., 2013).

Uticao zolpidema na akviziciju i retenciju memorije u MVL-u nije do sada ispitivan. Za zaleplon, supstancu slične strukture, ali dvostruko manjeg afiniteta za α_1 -podjedinicu, pokazano je da oštećuje učenje i pamćenje u MVL-u u značajno manjoj meri od klasičnih neselektivnih benzodiazepina (Noguchi i sar., 2002). U kliničkim studijama, zabeležen je različit uticaj zaleplona i zolpidema na pamćenje – zolpidem je, za razliku od zaleplona, oštetiо pamćenje zdravih dobrovoljaca, praćeno neposredno nakon davanja jedne doze leka (Dooley i Plosker, 2001). U našem eksperimentu, zolpidem je dozno-zavisno oštetiо deklarativnu komponentu učenja u MVL-u, što se tokom treninga pokazalo kroz smanjenje efikasnosti i povećanje dužine puta i latencije nalaska platforme, a tokom testa pozivanja memorije kao smanjenje vremena provedenog u ciljnom regionu. Životinje koje su primale zolpidem imale su i manju prosečnu brzinu plivanja tokom treninga, ali je, paradoksalno, zapaženo da je maksimalna brzina u sve tri grupe koje su primale zolpidem bila značajno veća u odnosu na maksimalnu brzinu kontrolne grupe (podaci nisu prikazani), što se može tumačiti kao „proboj“ bihevioralne dezinhibicije (aktivacije) kroz dominantno sedativni uticaj zolpidema. Zolpidem je negativno uticao i na proceduralnu komponentu zadatka u MVL-u. Naime, za efikasan nalazak platforme neophodna je supresija instinktivnog tigmotaksičnog ponašanja životinje u bazenu (Cain, 1998), a zolpidem je u sve tri primenjene doze doveo do povećanja vremena i puta pređenog u perifernom prstenu bazena. Ako se uporedi sa ponašanjem životinja pod uticajem diazepama u MVL-u, može se zaključiti da su efekti zolpidema, supstance koja je neaktivna na α_5 GABA_A receptorima, bliski efektima diazepama u MVL-u. Do sličnog zaključka došli su i McNamara i Skelton (1992) u sličnom protokolu u MVL-u, poredeći efekte α_1 -selektivnog liganda CL218,872 sa efektima hlordiazepoksida.

Iako i β CCt i zolpidem važe za relativno selektivne supstance, pri čemu se β CCt sa oko 20 puta većom selektivnošću za α_1 - u odnosu na α_2 - i α_3 GABA_A receptore smatra jednim od najselektivnijih liganada identifikovanih do danas (Cox i sar., 1995; Huang i

sar., 2000), bilo je i studija u kojima su ovi ligandi povezivani sa efektima za koje se smatra da nisu posredovani α_1 -podtipom GABA_A receptora. Tako je pokazano da zolpidem može da ispolji anksiolitički i miorelaksantni efekat (Griebel i sar., 1998; Milić i sar., 2012), a za ove efekte se smatra da su dominantno posredovani α_2 - i α_3 GABA_A receptorima. Zolpidem se, uprkos svojoj relativnoj selektivnosti za α_1 -populaciju, istovremeno veže i ispoljava aktivnost i na α_2 - i α_3 GABA_A receptorima (Sanna i sar., 2002). Izgleda da je selektivnost zolpidema *in vivo*, procenjena kroz relativno smanjenje vezivanja flumazenila za GABA_A receptore koji sadrže α_1 , odnosno α_2/α_3 podjedinice u različitim regionima mozga, generalno manja nego selektivnost u *in vitro* uslovima (Atack i sar., 1999). Međutim, navedeni bihevioralni efekti zolpidema uglavnom su izraženi pri višim dozama; u slučaju miorelaksacije dejstvo zolpidema ispoljeno je tek pri dozi od 5 mg/kg, što je pet puta veće od doze koja deluje sedativno i ataksično, a deset puta veće od najmanje doze koja je u MVL-u ispoljila amnezijски efekat (0,5 mg/kg). Slična situacija se može primetiti i kod β CCt-a. U određenim eksperimentalnim uslovima, za β CCt je pokazano da može da antagonizuje neke efekte diazepama koji nisu posredovani α_1 -podtipom receptora, kao što su anksiolitički i miorelaksantni efekat (Griebel i sar., 1999; Belzung i sar., 2000; Milić i sar., 2012). Kao i u slučaju zolpidema, ovi efekti su izveštavani pri primeni većih doza (20 i 30 mg/kg); ipak, nema dokaza da se pri ovim dozama β CCt-a gubi selektivnost za α_1 GABA_A receptore.

5.3. Supstance sa smanjenim afinitetom/aktivnošću na α_1 -podtipu GABA_A receptora

Ciljana sinteza supstanci sa smanjenim afinitetom i/ili efikasnošću na α_1 -podtipu GABA_A receptora uglavnom je bila usmerena na razdvajanje anksiolitičkog i sedativnog dejstva benzodiazepina, pa je najveći broj ovih supstanci u prekliničkim studijama ispitivan uglavnom u testovima indikativnim za procenu ova dva efekta, a samo izuzetno i u memorijskim testovima (Mirza i sar., 2008; Hofmann i sar., 2012).

Sva četiri liganda (JY-X-He-053, SH-053-2'N, SH-053-S-CH3-2'F i SH-053-R-CH3-2'F) ispitivana u okviru ovog dela našeg istraživanja karakterišu se umereno niskim do niskim afinitetom i blagom (parcijalnom) agonističkom aktivnošću na α_1 -podtipu GABA_A receptora. Nijedan od njih nije oštetiо učenje i pamćenje u standardnom

petodnevnom protokolu u MVL-u. Međusobno, ove se supstance razlikuju po afinitetima i efikasnostima na ostalim podtipovima GABA_A receptora, kao i bihevioralnoj (ne)aktivnosti u ostalim testovima, što može pružiti korisne informacije o povezanosti drugih efekata sa oštećenjem učenja i pamćenja u MVL-u. JY-HXe-053 ispoljava najveći afinitet za receptore koji sadrže α_5 podjedinicu, a najveću efikasnost na α_2 - i α_3 -podtipu GABA_A receptora. Kada se *in vitro* profil ovog liganda uporedi sa diazepamom, vidi se da JY-HXe-053, iako ima relativno veću selektivnost za α_5 -podtip receptora, ispoljava znatno manju aktivnost na svim podtipovima GABA_A receptora u odnosu na diazepam (Tabela 1, Slika 5). U uzdignutom plus lavirintu, u dozama do 30 mg/kg, JY-HXe-053 nije ispoljio anksiolitičko dejstvo, ali je u dozi od 10 mg/kg, tri puta manjoj od one korišćene u MVL-u, doveo do sedacije u testu spontane lokomotorne aktivnosti (Savić i sar., 2010). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da sedativni efekat nije preduslov za ispoljavanje oštećenja učenja i pamćenja u MVL-u, što je u skladu sa zaključcima iz nekih drugih studija (McNamara i Skelton, 1991).

SH-053-2'N pokazuje blagu selektivnost za α_5 podjedinicu, a među navedenim ligandima ima relativno najmanju efikasnost pri *in vitro* koncentraciji od 100 nM. SH-053-2'N je u nižoj dozi (20 mg/kg) od one koja je korišćena u MVL-u (30 mg/kg), ispoljio anksiolitičko dejstvo (Savić i sar., 2010). Tako je još jednom pokazano da anksiolitički efekat nije primarni mehanizam kojim nastaje oštećenje u MVL-u, kako su sugerisali Zanotti i sar. (1994). Međutim, na osnovu ovih eksperimenata, nije moguće dobiti precizniju sliku o tome koje podjedinice GABA_A receptora su odgovorne za (ne)ispoljene bihevioralne efekte SH-053-2'N, s obzirom da se značajnije razdvajanje u efikasnosti na α_2 - i α_3 -podtipovima postiže tek pri *in vitro* koncentracijama od oko 1 μ M. SH-053-S-CH3-2'F ispoljava najveći afinitet i efikasnost na α_2 -i α_5 -podtipu GABA_A receptora i u uzdignutom plus lavirintu u dozi od 30 mg/kg ispoljava anksiolitičko dejstvo, ali takođe izaziva i sedaciju (Savić i sar., 2008). U našem eksperimentu u MVL-u ovaj ligand nije doveo do oštećenja, što još jednom potvrđuje hipotezu da je oštećenje izazvano benzodiazepinima u MVL-u verovatno kognitivne prirode. Konačno, SH-053-R-CH3-2'F, iako pokazuje relativno veći afinitet i efikasnost na receptorima koji sadrže α_5 -podjedinicu u odnosu na druge podtipove GABA_A receptora, izaziva dozno-zavisnu sedaciju (Savić i sar., 2010), ali ne ispoljava amneziju u MVL-u. Prema

tome, još jednom se nameće zaključak da sedativni efekat nije dovoljan za ispoljavanje oštećenja učenja i pamćenja u MVL-u.

Za razliku od supstanci iz našeg eksperimenta, supstance L-838417 i NS11394, koje takođe imaju smanjenu aktivnost na α_1 -podtipu GABA_A receptora, dovele su do oštećenja učenja i pamćenja u MVL-u (Hofmann i sar., 2012). Za ove supstance je u prethodnim studijama, sprovedenim od strane drugih istraživačkih grupa, pokazano da ispoljavaju anksiolitičku aktivnost u različitim životinjskim modelima (McKernan i sar., 2000; Mirza i sar., 2008). Međutim, u bihejvioralnoj karakterizaciji čiji je segment bilo i ispitivanje u MVL-u, anksiolitički efekat je potpuno izostao, dok je sedacija bila izražena (test otvorenog polja). U slučaju supstance NS11394, amnezijski efekat u MVL-u pripisan je povećanoj aktivnosti na α_5 -podtipu GABA_A receptora, kao i opštoj psihomotornoj inkapacitaciji životinje, usled koje je čak i usvajanje pozicije vidljive platforme bilo kompromitovano (Hofmann i sar., 2012).

Dominantan utisak, koji proizilazi iz prezentovanih rezultata naših i sličnih eksperimenata (Hofmann i sar., 2012), jeste postojanje izvesne „disonance“ u odnosu *in vitro* i *in vivo* profila pojedinih supstanci, koja je i ranije prepoznata kao „usko grlo“ u razvoju novih selektivnijih lekova (Lynch, 2011). Na primer, Eksperiment 7 pokazuje da aktivnost diazepama na α_2 -, α_3 - i α_5 -podtipu GABA_A receptora nije dovoljna za oštećenje učenja u MVL-u, što su naši eksperimenti sa ligandima niske aktivnosti na α_1 GABA_A receptorima i potvrdili. Nasuprot tome stoji činjenica da ligand L-838417, iako bez aktivnosti na α_1 -podjedinici i sa tek parcijalnim agonizmom na ostalim podtipovima GABA_A receptora, može da dovede do oštećenja u MVL-u. Zbog toga se na osnovu ovih podataka ne može precizno utvrditi uloga pojedinih podtipova GABA_A receptora u efektima benzodiazepina u MVL-u, ali se može uopšteno reći da sedacija i anksiolitička aktivnost verovatno mogu da doprinesu, ali *nisu primarni* mehanizmi koji dovode do oštećenja izvođenja u ovom testu.

5.4. Supstance selektivne za α_5 -podtip GABA_A receptora

Zbog karakteristične regionalne distribucije α_5 GABA_A receptora (hipokampus i delovi korteksa), kao i činjenice da se njihova smanjena ekspresija povezuje sa facilitacijom izvođenja nekih memorijskih testova, ovi su receptori privukli veliku pažnju kao ciljno

mesto dejstva potencijalnih prokognitivnih lekova (Maubach i sar., 2003). Glavni pravac pri sintezi liganada selektivnih za α_5 -podtip GABA_A receptora bio je smanjenje GABA-ergičke transmisije i dobijanje α_5 -selektivnih inverznih agonista. Tokom protekle gotovo dve decenije, sintetisan je veći broj supstanci koje su u pretkliničkim uslovima pokazale efikasnost i relativno dobar bezbednosni profil (Liu i sar., 1996; Quirk i sar., 1996; Chambers i sar., 2003; Sternfeld i sar. 2004; Savić i sar., 2008), a neke su dospale i do početnih faza kliničkih ispitivanja (Nutt i sar., 2007). Iako je efikasnost većine njih dokazana na zdravim životinjama, čini se da ciljna populacija ove grupe potencijalnih lekova ipak nisu bili zdravi subjekti, već su se kao moguće područje primene navodile kognitivne promene povezane sa starenjem (Atack i sar., 2006), odnosno sa Alchajmerovom bolešću i „demencijama drugog porekla“ (Ballard i sar., 2009). Međutim, danas se u kliničkoj praksi još uvek ne nalazi ni jedan α_5 -selektivni inverzni agonista. Iako pojedini među njima i dalje „probijaju“ svoj put kroz različite faze kliničkih istraživanja, upadljivo je to što se za brojne supstance koje su dokazano efikasne u animalnim modelima pokazalo da nemaju efikasnost pri primeni na ljudima. Kao mogući razlog ove loše korelacije pretkliničkih i kliničkih rezultata jeste i to što je potreba za dobro kontrolisanim eksperimentima i lako merljivim varijablama uslovlila izbor testova na one u kojima je složeno kognitivno procesuiranje svedeno na minimum, pa su otuda i efekti lekova znatno uočljiviji u laboratorijskim uslovima nego u složenijem, realnom okruženju (Sarter i sar., 2009). Ipak, potraga za mogućim poljima primene ove farmakološke grupe ne jenjava, pa su novija ispitivanja pokazala da bi ovi lekovi mogli imati efikasnost u sprečavanju ili reverziji anterogradne amnezije izazvane primenom opštih anestetika (Saab i sar., 2010; Zurek i sar., 2012; Lecker i sar., 2013).

Nasuprot α_5 -inverznim agonistima stoji nesrazmerno manji broj liganada koji deluju kao pozitivni ili neutralni modulatori α_5 GABA_A receptora, i verovatno još manji broj publikovanih istraživanja posvećenih njihovim bihevioralnim efektima. Poslednjih godina, međutim, pojavljuju se izveštaji o prokognitivnom dejstvu agonista α_5 GABA_A receptora (Koh i sar., 2013), pa se može očekivati novi trend na polju istraživanja primene α_5 -selektivnih liganada.

5.4.1. α_5 -selektivni neutralni modulator XLi093

Mogućnost antagonizovanja kognitivnih efekata diazepama primenom α_5 -selektivnih antagonista nije do sada ispitivana na glodarima, ni u jednom memorijskom testu, što deluje neobično s obzirom da se ovaj podtip receptora dominantno vezuje upravo za regulaciju kognitivnih funkcija. Nedavno publikovana studija na makaki majmunima (*Macaca mulatta*) pokazala je mogućnost antagonizovanja efekata triazolama u testu prepoznavanja novog objekta, istovremenom primenom α_5 -selektivnog antagoniste XLi093 (Makaron i sar., 2013). Prema *in vitro* profilu, afinitet XLi093 za α_5 receptore je oko 60 puta veći nego za ostale podtipove GABA_A receptora (Tabela 1). U našem istraživanju u MVL-u, u Eksperimentu 11, sâm diazepam (1,5 mg/kg) nije doveo do značajnog oštećenja memorije, ali je zapaženo da je kombinacija 1,5 mg/kg diazepam + XLi093 (naročito viša doza, 20 mg/kg) značajno otežala učenje tokom pet dana treninga. Sličan efekat zabeležen je u testu spontane lokomotorne aktivnosti (Savić i sar., 2009), gde je dodatak XLi093 (10 i 20 mg/kg) potencirao sedativno dejstvo diazepama. U MVL-u, svakodnevni dodatak XLi093 diazepamu ošteti je učenje, što se odrazilo kroz povećanje ukupnog pređenog puta, smanjenje efikasnosti i povećanje pređenog puta u perifernom prstenu. Ovaj bi efekat mogao, barem delimično, da se objasni povećanom raspoloživošću diazepama na drugim podjedinicima GABA_A receptora, pre svega na α_1 , čija aktivacija u tom slučaju postaje dovoljna za oštećenje učenja u MVL-u. Doza od 20 mg/kg XLi093 verovatno bi mogla da dovede do kompletnog antagonizma efekata diazepama na α_5 GABA_A receptorima, jer pri dozi od 10 mg/kg XLi093, okupiranost α_5 GABA_A receptora kod miševa iznosi oko 65% (uporediti u Shinday i sar., 2008). Interesantno je da se uticaj ove kombinacije nije ispoljio i u testu pozivanja memorije, u kome su ove životinje bile na nivou kontrolne grupe. To ukazuje da se uprkos ovom tretmanu (diazepam + XLi093) formirao određeni memorijski trag, te da pamćenje nije u potpunosti bilo sprečeno.

Međutim, u Eksperimentu 12, u kome je primenjena veća doza diazepama (2 mg/kg), koja je sama po sebi bila dovoljna da ošteti učenje i tokom treninga i tokom testa pozivanja memorije, dodatak XLi093 u dozi od 10 mg/kg izaziva suprotan efekat: istovremena primena XLi093 uz diazepam, tokom 5 dana treninga, sprečava oštećenje učenja i pamćenja pod uticajem diazepama. Ovaj rezultat pokazuje da se značajan deo

efekata dizapema u MVL-u ostvaruje modulacijom α_5 GABA_A receptora. Ako se vratimo na rezultate Eksperimenta 7, zaključujemo da se amnezijski uticaj diazepama može u potpunosti antagonizovati primenom α_1 - i α_5 -antagoniste, β CCt-a i XLi093. Ovaj nalaz nije nov, jer je u već pomenutoj studiji na majmunima (Makaron i sar., 2013) pokazano da ova dva liganda, svaki za sebe, mogu da antagonizuju memorijske efekte triazolama. Ova podudarnost rezultata je od naročitog značaja, jer je dobijena na različitim životinjskim vrstama i u različitim memorijskim testovima.

Ukupno gledano, prikazani rezultati ukazuju na to da bi benzodiazepini mogli da oštete pamćenje u MVL-u (kao i u testu prepoznavanja objekta), različitim mehanizmima, gde oba podtipa GABA_A receptora (α_1 i α_5) imaju svoju specifičnu ulogu. Dovoljnost α_1 podjedinice za ispoljavanje oštećenja dokazana je u studijama sa α_1 -selektivnim modulatorima (zolpidem, zaleplon), dok za α_5 -podtip GABA_A receptora tek treba da bude pokazana.

5.4.2. α_5 -selektivni pozitivni modulator XLi356

XLi356 pokazuje 18-40 puta veći afinitet za α_5 - u odnosu na ostale podtipove GABA_A receptora. Međutim, *in vitro* efikasnost ovog liganda na α_5 GABA_A receptorima, pri koncentraciji od 100 nM, iznosi oko 120-130% i značajno je manja od efikasnosti diazepama pri istoj koncentraciji (~ 300%), te se XLi356 može smatrati α_5 -selektivnim parcijalnim agonistom (Slika 5). Na drugim podtipovima GABA_A receptora, XLi356 pri pomenutoj *in vitro* koncentraciji ne ispoljava aktivnost. Za ovu supstancu ne postoje publikovani rezultati iz pretkliničkih i kliničkih studija.

U našem eksperimentu pokazano je diskretno, ali ipak statistički značajno oštećenje pamćenja kod životinja koje su jednokratno primile 10 mg/kg XLi356 pre treninga u MVL-u. Ovo oštećenje se manifestovalo kao smanjenje broja ulazaka životinja u SI kvadrant u odnosu na kontrolnu grupu, dok su parametri vezani za ciljni region bili na granici statističke značajnosti. S obzirom na moguću ulogu α_5 podjedinice u ispoljavanju sedacije pri primeni benzodiazepina (Savić i sar., 2008b), urađena su i ispitivanja u testu SLA (neprikazani rezultati), koja su pokazala da ova supstanca, u testiranom rasponu doza, ne ispoljava sedativno dejstvo. Ovo je prvi eksperiment koji direktno pokazuje da selektivna pozitivna modulacija na nivou α_5 GABA_A receptora

može da ošteti pamćenje u nekom memorijskom testu, i na sasvim novi način potvrđuje ulogu ove podjedinice u memorijskim efektima benzodiazepina. Ipak, nameće se pitanje zašto je parcijalni agonizam na nivou α_5 GABA_A receptora dovoljan za i najmanje oštećenje pamćenja u MVL-u, dok puni agonizam na ovom podtipu receptora, koji postoji pri primeni JY-X-He-053, SH-053-S-CH3-2'F i SH-053-R-CH3-2'F, i verovatno pri primeni kombinacije diazepam + β CCt, nije dovoljan? Na ovo pitanje dosadašnji nivo istraživanja ne može dati odgovor, ali se kao mogući pravac ispitivanja nameće populacija α_2 i α_3 GABA_A receptora, na kojima je postojala određena aktivnost u sva četiri poslednja slučaja.

S druge strane, novija istraživanja upućuju da bi pozitivni modulatori α_5 GABA_A receptora mogli imati važnu ulogu u lečenju kognitivnih poremećaja povezanih sa starenjem (Koh i sar., 2013). Naime, studije na životinjskim modelima pokazuju da ekscesivna aktivnost neurona hipokampalne formacije doprinosi kognitivnom oštećenju tokom starenja (Wilson i sar., 2005), a magnetna rezonanca potvrđuje značajno veću aktivnost neurona hipokampusa kod osoba sa blagim kognitivnim oštećenjem u odnosu na zdrave dobrovoljce istih godina (Ewers i sar., 2011). U pretkliničkim ispitivanjima, Koh i sar. (2013) su, u više različitih eksperimentalnih protokola, dokazali značajno kognitivno poboljšanje nakon primene α_5 -selektivnog pozitivnog modulatora na starijim pacovima (preko 2 godine) sa dokazanim kognitivnim oštećenjem.

Ovo nije prvi i jedini nalaz koji upućuje na to da su efekti modulacije preko α_5 GABA_A receptora različiti kod mladih i starih životinja. Wilson i sar. (2005) pokazali su da primena α_5 -selektivnih inverznih agonista poboljšava akviziciju kod mladih pacova, ali da nema uticaja u modelu kognitivnih oštećenja povezanih sa starenjem, u kome postoji povećana frekvencija okidanja neurona u CA3 regionu hipokampusa. Trend povećanja, a ne smanjenja, GABA-ergičke transmisije u cilju poboljšanja kognitivnih funkcija ohrabruju i studije sa MAM (metoksiazometanol) modelom šizofrenije, koje pokazuju da primena α_5 -selektivnih pozitivnih modulatora kod pacova smanjuje ekscesivni hipokampalni izlaz i poboljšava bihevioralne abnormalnosti prisutne u ovom modelu (Gill i sar., 2011).

5.4.3. α_5 -selektivni negativni modulator PWZ-029

Za većinu α_5 -selektivnih negativnih modulatora može se reći da su parcijalni inverzni agonisti na α_5 GABA_A receptorima. Bez obzira da li ispoljavaju selektivni afinitet ili selektivnu efikasnost, maksimalni procenat smanjenja fluksa hloridnih jona u *in vitro* uslovima, na rekombinantnim receptorima, okvirno se kreće u rasponu od -17 % (Atack i sar., 2009) do -46 % (Ballard i sar., 2009). U skladu sa smanjenim stepenom aktivnosti (ili vezivanja) na ostalim podtipovima GABA_A receptora, prokonvulzivna i anksiogena dejstva ovih supstanci su mahom izbegnuta. Jedan broj ovih supstanci ispitan je i u MVL-u, na zdravim životinjama, u metodološki različitim protokolima, gde su uglavnom doveli do povećanja efikasnosti učenja (Chambers i sar., 2004; Atack i sar., 2006; Collinson i sar., 2006; Dawson i sar., 2006; Ballard i sar., 2009).

U okviru našeg istraživanja urađena su tri eksperimenta sa α_5 -selektivnim negativnim modulatorom PWZ-029. U odnosu na ostale podtipove GABA_A receptora, PWZ-029 pokazuje oko 30 puta veću selektivnost za α_5 -receptore, na kojima ispoljava parcijalnu inverznu agonističku aktivnost (smanjenje protoka Cl⁻ jona za oko 20% pri koncentracijama od 100 nM do 1 μ M, Slika 5). Prethodna istraživanja su pokazala da PWZ-029 poboljšava izvođenje u testu pasivnog izbegavanja kod pacova (Savić i sar., 2008a) i Pavlovljevom uslovljavanju strahom kod miševa (Harris i sar., 2008), a da u tim dozama ne ispoljava ni anksiogeno ili prokonvulzivno dejstvo. U našoj studiji, PWZ-029 testiran je u širokom rasponu doza, od 0,2 do 30 mg/kg, u protokolima referentne i radne memorije. Iako oba protokola prate prostornu memoriju, oni odražavaju različite memorijske procese, koji verovatno imaju i različite neurobiološke mehanizme te su u različitom stepenu podložni modulatornim uticajima (Lindner i sar., 1992; Frick i sar., 1995). U petodnevnom protokolu za procenu referentne memorije, broj plivanja je, kao i kod DMCM-a, smanjen sa četiri na dva dnevno tokom treninga, kako bi se usporila akvizicija kod kontrolnih životinja. Do sada nema izveštaja o efikasnosti α_5 inverznih agonista na zdravim životinjama u ovakvoj vrsti protokola, a PWZ-029 je bio na nivou kontrole, i tokom treninga i u testu pozivanja memorije.

U različitim jednodnevnim modifikacijama protokola za praćenje referentne memorije, Atack i sar. (2006) su pokazali poboljšanje efikasnosti učenja sa supstancom L655708, dok su Ballard i sar. (2009) pokazali da inverzni agonista RO4938581 ne

dovodi do poboljšanja, ali da uspešno antagonizuje amnezijske efekte diazepama. U jednodnevnoj verziji protokola koju smo mi koristili, i u kojoj je α_5 -agonista XLI356 ošteti pamćenje, PWZ-029 nije pokazao aktivnost. Efikasnost ovih liganada izgleda da nije u vezi sa maksimalnom inhibicijom protoka hloridnih jona, koja kod L655708 iznosi oko 16%, kod RO4938581 oko 46%, a kod PWZ-029 oko 10-20%. Međutim, direktno poređenje *in vitro* podataka nije jednostavno, jer su efikasnosti ovih liganada određivane pri različitim koncentracijama GABA-e (EC_{20} za L655708, EC_3 za PWZ029, dok za RO4938581 nema podataka). Takođe, osim značajnih razlika u eksperimentalnim protokolima, u smislu broja plivanja ili postojanja prethodnog pred-treninga (RO4938581), L655708 je, za razliku od druga dva liganda, primenjen u vidu supkutanih peleta sa sistemom postepenog oslobađanja, pa je životinja bila izložena relativno konstantnim nivoima leka tokom celokupnog treninga. Izgleda, međutim, da ni okupiranost receptora nije pouzdan pokazatelj za *in vivo* efikasnost liganda; iako za PWZ-029 nemamo podatke o okupiranosti receptora pri primenjenim dozama, interesantan je podatak da je pri primeni najveće doze RO4938581 u MVL-u, okupiranost α_5 GABA_A receptora hipokampusu iznosila 90%, a kod L655708, 75% (Atack i sar., 2006b; Ballard i sar., 2009).

Poboljšanje izvođenja u različitim verzijama protokola radne memorije dobijeno je sa α_5 -*knock out* miševima (Collinson i sar., 2002), kao i sa dva negativna modulatora MRK016 (Chambers i sar., 2004) i $\alpha 5$ IA-II (Collinson i sar., 2006), pri čemu je za $\alpha 5$ IA-II pokazano da poboljšava i akviziciju i pozivanje memorije u ovom protokolu. PWZ-029, međutim, ni u ovom protokolu nije bio bolji od kontrole. Za protokol radne memorije je, više nego drugde, karakteristična velika varijabilnost u dužini treninga, od 4 (PWZ-029) do 18 dana ($\alpha 5$ IA-II), te se stiče utisak da je poboljšanje efikasnosti više pitanje izbora adekvatnog protokola, no realne sposobnosti same supstance da dovede do „supraoptimalnog“ izvođenja.

Na osnovu naših eksperimenata, može se zaključiti da je PWZ-029 lišen bihevioralne aktivnosti u odabrana tri protokola, i da verovatno nema kapacitet poboljšanja efikasnosti učenja kod zdravih pacova u MVL-u, za razliku od testa pasivnog izbegavanja i testa uslovljavanja strahom. Ovu sporadičnu efikasnost, ili „efikasnost zavisnu od testa“ koja se viđa pri primeni PWZ-029, teško je komentarisati u kontekstu sličnih istraživanja, s obzirom na to da postoji trend neobjavlivanja

Diskusija

negativnih rezultata. Međutim, čini se da je upravo publikovanje i pozitivnih i negativnih rezultata jedna od karika koje nedostaju kako bi se istraživanja usmerila na pravi put, a predvidivost ishoda testiranja u kliničkim uslovima povećala.

6. ZAKLJUČCI

Supstance koje se vezuju za benzodiazepinsko mesto vezivanja deluju kao pozitivni, negativni i neutralni modulatori GABA-ergičke transmisije u centralnom nervnom sistemu, i odlikuju se specifičnim kombinacijama afiniteta i efikasnosti na različitim podtipovima GABA_A receptora. Na osnovu rezultata našeg istraživanja, usmerenog ka bihevioralnoj karakterizaciji ovih supstanci u Morisovom vodenom lavirintu, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Neselektivni pozitivni modulator diazepam na dozno-zavisan način dovodi do oštećenja učenja i pamćenja u MVL-u. S obzirom na doze koje su pokazale aktivnost, ne može se isključiti i doprinos nekih nekognitivnih efekata u ukupnoj inkapitaciji životinja koja se vidi u MVL-u.
2. Efekti benzodiazepina u MVL-u uglavnom su ograničeni na fazu akvizicije memorije, s time što je pokazano da midazolam može da dovede i do oštećenja pozivanja.
3. Uticaj diazepama u MVL-u u potpunosti se može antagonizovati primenom α_1 -selektivnog pozitivnog modulatora, β CCt-a. Ovaj rezultat upućuje na dominantnu ulogu α_1 -podjedinice u ispoljavanju efekata diazepama u MVL-u, s obzirom da njegov efekat preko preostalih podjedinica (α_2 , α_3 i α_5) nije bio dovoljan za izazivanje oštećenja.
4. α_1 -selektivni pozitivni modulator, zolpidem, dovodi do oštećenja u MVL-u, i njegovi efekti su slični efektima neselektivnih modulatora (diazepama i midazolama).
5. Supstance koje imaju smanjenu aktivnost na α_1 -podtipu GABA_A receptora nemaju uticaj na ponašanje pacova u MVL-u. Kako neke od njih pri tome ispoljavaju sedativni i/ili anksiolitički efekat, može se zaključiti da sedacija i anksiolitička aktivnost, iako verovatno mogu da doprinesu, nisu *primarni* mehanizmi kojima dolazi do oštećenja pamćenja.
6. Efekti diazepama na učenje i pamćenje pacova u MVL-u mogu se u potpunosti antagonizovati i primenom α_5 -selektivnog neutralnog modulatora XLi093, što je

- u skladu sa rezultatima dobijenim i pri primeni diazepama i XLi093 na majmunima, u odgovarajućim memorijskim testovima.
7. Selektivna pozitivna modulacija na nivou α_5 GABA_A receptora može da dovede do oštećenja pamćenja, što je prvi rezultat ovakve vrste i u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima, koji na sasvim novi način potvrđuje ulogu ove podjedinice u memorijskim efektima benzodiazepina.
 8. Neselektivni negativni modulator DMCM, poput diazepama, doveo je do oštećenja učenja i pamćenja. Poređenjem naših i rezultata drugih studija, može se zaključiti da promnezijski efekat inverznih agonista nije robustan nalaz, koji bi bio karakterističan za jednu supstancu ili grupu hemijski srodnih jedinjenja, kao što je to slučaj sa amnezijским efektom benzodiazepina.
 9. Za razliku od testa pasivnog izbegavanja i testa uslovljavanja strahom, u tri protokola referentne i radne memorije u MVL-u, α_5 -selektivni negativni modulator PWZ-029 nije doveo do poboljšanja učenja i pamćenja, pa se može zaključiti da ova supstanca nema kapacitet poboljšanja efikasnosti učenja kod zdravih pacova u ovom testu.

Ukupno gledano, prikazani rezultati ukazuju da su za bihevioralnu aktivnost benzodiazepinskih liganada u Morisovom vodenom lavirintu od ključnog značaja α_1 i α_5 populacija GABA_A receptora. Takođe, oni ukazuju i na moguća odstupanje između *in vitro* i *in vivo* profila, što je naročito izraženo kod tzv. „anksioselektivnih anksiolitika“ i „prokognitivnih lekova“, pa je za bihevioralni skrining novih supstanci potrebno uključiti što veći broj testova, modela, eksperimentalnih uslova i životinjskih vrsta, kako bi se postiglo bolje slaganje rezultata iz pretkliničkih i kliničkih studija.

7. LITERATURA

Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 180-7.

Amann LC, Gandal MJ, Halene TB, Ehrlichman RS, White SL, McCarren HS, Siegel SJ. Mouse behavioral endophenotypes for schizophrenia. *Brain Res Bull* 2010; 83: 147-61.

Arolfo MP, Brioni JD. Diazepam impairs place learning in the Morris water maze. *Behav Neural Biol* 1991; 55: 131-6.

Atack JR, Smith AJ, Emms F, McKernan RM. Regional differences in the inhibition of mouse in vivo [³H]Ro 15-1788 binding reflect selectivity for α_1 versus α_2 and α_3 subunit-containing GABA_A receptors. *Neuropsychopharmacology* 1999; 20: 255-62.

Atack JR. The benzodiazepine binding site of GABA_A receptors as a target for the development of novel anxiolytics. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14: 601-18.

Atack JR, Hutson PH, Collinson N, Marshall G, Bentley G, Moyes C, Cook SM, Collins I, Wafford K, McKernan RM, Dawson GR. Anxiogenic properties of an inverse agonist selective for α_3 subunit-containing GABA_A receptors. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 357-66.

Atack JR, Wafford KA, Tye SJ, Cook SM, Sohal B, Pike A, Sur C, Melillo D, Bristow L, Bromidge F, Ragan I, Kerby J, Street L, Carling R, Castro JL, Whiting P, Dawson GR, McKernan RM. TPA023 [7-(1,1-dimethylethyl)-6-(2-ethyl-2H-1,2,4-triazol-3-ylmethoxy)-3-(2-fluorophenyl)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazine], an agonist selective for α_2 - and α_3 -containing GABA_A receptors, is a nonsedating anxiolytic in rodents and primates. *J Pharmacol Exp Ther* 2006a; 316: 410-22.

Atack JR, Bayley PJ, Seabrook GR, Wafford KA, McKernan RM, Dawson GR. L-655,708 enhances cognition in rats but is not proconvulsant at a dose selective for α_5 -containing GABA_A receptors. *Neuropharmacology* 2006b; 51: 1023-9.

Atack JR, Maubach KA, Wafford KA, O'Connor D, Rodrigues AD, Evans DC, Tattersall FD, Chambers MS, MacLeod AM, Eng WS, Ryan C, Hostetler E, Sanabria SM, Gibson RE, Krause S, Burns HD, Hargreaves RJ, Agrawal NG, McKernan RM, Murphy MG, Gingrich K, Dawson GR, Musson DG, Petty KJ. In vitro and in vivo properties of 3-tert-butyl-7-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-ylmethoxy)-pyrazolo[1,5-d]-[1,2,4]triazine (MRK-016), a GABA_A receptor α_5 subtype-selective inverse agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 331: 470-84.

Atack JR (2010). Development of Subtype-Selective GABA_A Receptor Compounds for the Treatment of Anxiety, Sleep Disorders and Epilepsy. In *GABA and Sleep* (pp. 25-72). Springer Basel.

Atack JR. GABA_A receptor subtype-selective modulators. I. α_2/α_3 -selective agonists as non-sedating anxiolytics. *Curr Top Med Chem* 2011a; 11: 1176-202.

Atack JR, Wafford KA, Street LJ, Dawson GR, Tye S, Van Laere K, Bormans G, Sanabria-Bohórquez SM, De Lepeleire I, de Hoon JN, Van Hecken A, Burns HD, McKernan RM, Murphy MG, Hargreaves RJ. MRK-409 (MK-0343), a GABA_A receptor subtype-selective partial agonist, is a non-sedating anxiolytic in preclinical species but causes sedation in humans. *J Psychopharmacol* 2011b; 25: 314-28.

Baldi E, Efoudebe M, Lorenzini CA, Bucherelli C. Spatial navigation in the Morris water maze: working and long lasting reference memories. *Neurosci Lett* 2005; 378: 176-80.

Ballard TM, Knoflach F, Prinssen E, Borroni E, Vivian JA, Basile J, et al. RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABA_A α_5 subunit-containing receptors. *Psychopharmacology* 2009; 202: 207-23.

Baur R, Tan KR, Lüscher BP, Gonthier A, Goeldner M, Sigel E. Covalent modification of GABA_A receptor isoforms by a diazepam analogue provides evidence for a novel benzodiazepine binding site that prevents modulation by these drugs. *J Neurochem* 2008; 106: 2353-63.

Beer B, Clody DE, Mangano R, Levner M, Mayer P, Barrett JE. A review of the preclinical development of zaleplon, a novel non-benzodiazepine hypnotic for the treatment of insomnia. *CNS Drug Rev* 1997; 3: 207-224.

Belzung C, Le Guisquet AM, Griebel G. Beta-CCT, a selective BZ-omega1 receptor antagonist, blocks the anti-anxiety but not the amnesic action of chlordiazepoxide in mice. *Behav Pharmacol* 2000; 11: 125-31.

Benavides J, Peny B, Dubois A, Perrault G, Morel E, Zivkovic B, Scatton B. In vivo interaction of zolpidem with central benzodiazepine (BZD) binding sites (as labeled by [³H]Ro 15-1788) in the mouse brain. Preferential affinity of zolpidem for the omega 1 (BZD1) subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245: 1033-41.

Benson JA, Löw K, Keist R, Mohler H, Rudolph U. Pharmacology of recombinant gamma-aminobutyric acid_A receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated alpha-subunits. *FEBS Lett* 1998; 431: 400-4.

Beracochea D. Anterograde and retrograde effects of benzodiazepines on memory. *ScientificWorldJournal* 2006; 6: 1460-5.

Biggio G, Concas A, Corda MG, Serra M. Enhancement of GABAergic transmission by zolpidem, an imidazopyridine with preferential affinity for type I benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* 1989; 161: 173-80.

Block RI, Berchou R. Alprazolam and lorazepam effects on memory acquisition and retrieval processes. *Pharmacol Biochem Behav* 1984; 20: 233-41.

Blokland A, Geraerts E, Been M. A detailed analysis of rats' spatial memory in a probe trial of a Morris task. *Behav Brain Res* 2004; 23: 71-5.

Borde N, Krazem A, Jaffard R, Beracochea D. Memory deficits following diazepam administration in mice: evidence for retrieval memory impairments. *Psychobiology* 1997; 25: 202-9.

Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learning & Memory* 1998; 5: 365-74.

Brandt AL, Oakes FD. Preanesthesia medication: double-blind study of a new drug, diazepam. *Anesth Analg* 1965; 44: 125-9.

Brioni JD, Arolfo MP. Diazepam impairs retention of spatial information without affecting retrieval or cue learning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1992; 41: 1-5.

Buffalo EA, Reber PJ, Squire LR. The human perirhinal cortex and recognition memory. *Hippocampus* 1998; 8: 330-9.

Cahill L, McGaugh JL. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 1998; 21: 294-9.

Cain DP. Prior non-spatial pretraining eliminates sensorimotor disturbances and impairments in water maze learning caused by diazepam. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 130: 313-9.

Cain DP. Testing the NMDA, long-term potentiation, and cholinergic hypotheses of spatial learning. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 22: 181-93.

Chambers MS, Atack JR, Broughton HB, Collinson N, Cook S, Dawson GR, et al. Identification of a novel, selective GABA_A α_5 receptor inverse agonist which enhances cognition. *J Med Chem* 2003; 46: 2227-40.

Chambers MS, Atack JR, Carling RW, Collinson N, Cook SM, Dawson GR, et al. An orally bioavailable, functionally selective inverse agonist at the benzodiazepine site of GABA_A α_5 receptors with cognition enhancing properties. *J Med Chem* 2004; 47: 5829-32.

Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, Morris RG. A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000; 408: 975-9.

Chrobak JJ, Napier TC. Delayed-non-match-to-sample performance in the radial arm maze: effects of dopaminergic and gabaergic agents. *Psychopharmacology (Berlin)* 1992; 108: 72–8.

Chudasama Y, Robbins TW. Dopaminergic modulation of visual attention and working memory in the rodent prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1628–36.

Cimadevilla JM, Miranda R, López L, Arias JL. Partial unilateral inactivation of the dorsal hippocampus impairs spatial memory in the MWM. *Brain Res Cogn Brain Res* 2005; 25: 741-6.

Clayton NS, Griffiths DP, Emery NJ, Dickinson A. Elements of episodic-like memory in animals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 1483-91.

Click, Ivy A., "Gender Differences in Working Memory in Humans Tested on a Virtual Morris Water Maze." (2005). *Electronic Theses and Dissertations*. Paper 1052.

Cole, SO. Effects of benzodiazepines on acquisition and performance. A critical assessment. *Neurosci Biobehav Rev* 1986; 10: 265-72.

Cole J, Costafreda SG, McGuffin P, Fu CH. Hippocampal atrophy in first episode depression: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *J Affect Disord* 2011; 134: 483-7.

Cole SO, Michaleski A. Chlordiazepoxide impairs the performance of a learned discrimination. *Behavioral and Neural Biology* 1984; 41: 223–30.

Collins I, Moyes C, Davey WB, Rowley M, Bromidge FA, Quirk K, Atack JR, McKernan RM, Thompson SA, Wafford K, Dawson GR, Pike A, Sohal B, Tsou NN, Ball RG, Castro JL. 3-Heteroaryl-2-pyridones: benzodiazepine site ligands with functional delectivity for α_2/α_3 -subtypes of human GABA_A receptor-ion channels. *J Med Chem* 2002; 45: 1887-900.

Collinson N, Kuenzi FM, Jarolimek W, Maubach KA, Cothliff R, Sur C, et al. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the α_5 subunit of the GABA_A receptor. *J Neurosci* 2002; 22: 5572-80.

Collinson N, Atack JR, Laughton P, Dawson GR, Stephens DN. An inverse agonist selective for α_5 subunit-containing GABA_A receptors improves encoding and recall but not consolidation in the Morris water maze. *Psychopharmacology* 2006; 188: 619-28.

Craver C, Darden L. Discovering mechanisms in neurobiology: The case of spatial memory. In P. K. Machamer, R. Grush, & P. McLaughlin (Eds.). *Theory and method in the neurosciences*. Pittsburgh: University of Pittsburgh Press 2001.

Crestani F, Low K, Keist R, Mandelli M, M'ohler H, Rudolph U. Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 442–5.

Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Blüthmann H, Möhler H, Rudolph U. Trace fear conditioning involves hippocampal α_5 GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8980-5.

Curran HV, Birch B. Differentiating the sedative, psychomotor and amnesic effects of benzodiazepines: a study with midazolam and the benzodiazepine antagonist, flumazenil. *Psychopharmacology (Berl)* 1991; 103: 519-23.

Curran HV, Bond A, O'Sullivan G, Bruce M, Marks I, Lelliot P. Memory functions, alprazolam and exposure therapy: a controlled longitudinal study of agoraphobia with panic disorder. *Psychol Med* 1994; 24: 969-76.

Curran HV, Mintzer MZ. Psychopharmacology of memory. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 188: 393-6.

del Cerro S, Jung M, Lynch G. Benzodiazepines block long-term potentiation in slices of hippocampus and piriform cortex. *Neuroscience* 1992; 49: 1-6.

Dalm S, Grootendorst J, de Kloet ER, Oitzl MS. Quantification of swim patterns in the Morris water maze. *Behav Res Methods Instrum Comput* 2000; 32: 134-9.

Dawson GR, Collinson N, Atack JR. Development of subtype selective GABA_A modulators. *CNS Spectr* 2005; 10: 21-7.

Dawson GR, Maubach KA, Collinson N, Cobain M, Everitt BJ, MacLeod AM, et al. An inverse agonist selective for α_5 subunit-containing GABA_A receptors enhances cognition. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1335-45.

Deckersbach T, Moshier SJ, Tuschen-Caffier B, Otto MW. Memory dysfunction in panic disorder: an investigation of the role of chronic benzodiazepine use. *Depress Anxiety* 2011; 28: 999-1007.

DeLorey TM, Lin RC, McBrady B, He X, Cook JM, Lamah J, Loew GH. Influence of benzodiazepine binding site ligands on fear-conditioned contextual memory. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 45-54.

D'Hooze R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res* 2001; 907: 35-43.

Dias R, Sheppard WF, Fradley RL, Garrett EM, Stanley JL, Tye SJ, Goodacre S, Lincoln RJ, Cook SM, Conley R, Hallett D, Humphries AC, Thompson SA, Wafford KA, Street LJ, Castro JL, Whiting PJ, Rosahl TW, Atack JR, McKernan RM, Dawson GR, Reynolds DS. Evidence for a significant role of α_3 -containing GABA_A receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. *J Neurosci* 2005; 25: 10682-8.

Duka T, Edelmann V, Schütt B, Dorow R. Beta-carbolines as tools in memory research: human data with the beta-carboline ZK 93426. *Psychopharmacol Ser* 1988; 6: 246-60.

Dooley M, Plosker GL. Zaleplon: a review of its use in the treatment of insomnia. *Drugs* 2000; 60: 413-45.

Dorow R, Horowski R, Paschelke G, Amin M. Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet* 1983; 2: 98-9.

Edgar DM, Seidel WF, Gee KW, Lan NC, Field G, Xia H, Hawkinson JE, Wieland S, Carter RB, Wood PL. CCD-3693: an orally bioavailable analog of the endogenous neuroactive steroid, pregnanolone, demonstrates potent sedative hypnotic actions in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 420-9.

Evans MS, Viola-McCabe KE. Midazolam inhibits long-term potentiation through modulation of GABA_A receptors. *Neuropharmacology* 1996; 35: 47-57.

Ewers M, Sperling RA, Klunk WE, Weiner MW, Hampel, H. Neuroimaging markers for the prediction and early diagnosis of Alzheimer's disease dementia. *Trends Neurosci* 2011; 34: 430-42.

Eysenck MW. Anxiety and cognitive-task performance. *Pers Individ Diff* 1985; 6: 579-86.

File SE, Pellow S. Low and high doses of benzodiazepine receptor inverse agonists respectively improve and impair performance in passive avoidance but do not affect habituation. *Behav Brain Res* 1988; 30: 31-6.

File SE, Fluck E, Joyce EM. Conditions under which lorazepam can facilitate retrieval. *J Clin Psychopharmacol* 1999; 19: 349-53.

Fillmore MT, Kelly TH, Rush CR, Hays L. Retrograde facilitation of memory by triazolam: effects on automatic processes. *Psychopharmacology* 2001; 158: 314-21.

Fitzgerald LW, Dokla CP. Morris water task impairment and hypoactivity following cysteamine-induced reductions of somatostatin-like immunoreactivity. *Brain Res* 1989; 505: 246-50.

Floresco SB, Geyer MA, Gold LH, Grace AA. Developing predictive animal models and establishing a preclinical trials network for assessing treatment effects on cognition in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2005; 31: 888-94.

Floresco SB, Jentsch JD. Pharmacological enhancement of memory and executive functioning in laboratory animals. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 227-50.

Frick KM, Stillner ET, Berger-Sweeney J. Mice are not little rats: species differences in a one-day water maze task. *Neuroreport* 2000; 11: 3461-5.

Gafford GM, Parsons RG, Helmstetter FJ. Effects of post-training hippocampal injections of midazolam on fear conditioning. *Learning & Memory* 2005; 12: 573-8.

Gallagher M, Burwell R, Burchinal M. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 1993; 107: 618-26.

Ghoneim MM, Mewaldt SP. Effects of diazepam and scopolamine on storage, retrieval and organizational processes in memory. *Psychopharmacologia* 1975; 44: 257-62.

Ghoneim MM, Mewaldt SP, Berie JL, Hinrichs JV. Memory and performance effects of single and 3-week administration of diazepam. *Psychopharmacology* 1981; 73: 147-51.

Ghoneim MM, Mewaldt SP, Hinrichs JV. Behavioral effects of oral versus intravenous administration of diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* 1984; 21: 231-6.

Gill KM, Lodge DJ, Cook JM, Aras S, Grace AA. A novel α_5 GABA_AR positive allosteric modulator reverses hyperactivation of the dopamine system in the MAM model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* 2011; 36: 1903-11.

Goodrich-Hunsaker NJ, Livingstone SA, Skelton RW, Hopkins RO. Spatial deficits in a virtual water maze in amnesic participants with hippocampal damage. *Hippocampus* 2010; 20: 481-91.

Graham D, Faure C, Besnard F, Langer SZ. Pharmacological profile of benzodiazepine site ligands with recombinant GABA_A receptor subtypes. *European Neuropsychopharmacology* 1996; 6: 119–25.

Granon S, Passetti F, Thomas KL, Dalley JW, Everitt BJ, Robbins TW. Enhanced and impaired attentional performance after infusion of D₁ dopaminergic receptor agents into rat prefrontal cortex. *J Neurosci* 2000; 20: 1208–15.

Griebel G, Sanger DJ, Perrault G. The use of the rat elevated plus-maze to discriminate between non-selective and BZ-1 (omega 1) selective, benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology (Berl)* 1996; 124: 245-54.

Griebel G, Perrault G, Sanger DJ. Limited anxiolytic-like effects of non-benzodiazepine hypnotics in rodents. *J Psychopharmacol* 1998; 12: 356-65.

Griebel G, Perrault G, Letang V, Granger P, Avenet P, Schoemaker H, Sanger DJ. New evidence that the pharmacological effects of benzodiazepine receptor ligands can be associated with activities at different BZ (omega) receptor subtypes. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 146: 205-13.

Griebel G, Perrault G, Simiand J, Cohen C, Granger P, Decobert M, Françon D, Avenet P, Depoortere H, Tan S, Oblin A, Schoemaker H, Evanno Y, Sevrin M, George P, Scatton B. SL651498: an anxiolytic compound with functional selectivity for α_2 - and α_3 -containing gamma-aminobutyric acid(A) (GABA_A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 753-68.

de Haas SL, de Visser SJ, van der Post JP, Schoemaker RC, van Dyck K, Murphy MG, de Smet M, Vessey LK, Ramakrishnan R, Xue L, Cohen AF, van Gerven JM. Pharmacodynamic and pharmacokinetic effects of MK-0343, a GABA_A $\alpha_{2,3}$ subtype selective agonist, compared to lorazepam and placebo in healthy male volunteers. *J Psychopharmacol* 2008; 22: 24-32.

de Haas SL, Franson KL, Schmitt JA, Cohen AF, Fau JB, Dubruc C, van Gerven JM. The pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of SL65.1498, a GABA_A $\alpha_{2,3}$ selective agonist, in comparison with lorazepam in healthy volunteers. *J Psychopharmacol* 2009; 23: 625-32.

Hanchar HJ, Chutsrinopkun P, Meera P, Supavilai P, Sieghart W, Wallner M, Olsen RW. Ethanol potently and competitively inhibits binding of the alcohol antagonist Ro15-4513 to $\alpha_{4/6}\beta_3\delta$ GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8546-51.

Harris D, Clayton T, Cook J, Sahbaie P, Halliwell RF, Furtmüller R, et al. Selective influence on contextual memory: physiochemical properties associated with selectivity of benzodiazepine ligands at GABA_A receptors containing the α_5 subunit. *J Med Chem* 2008; 51: 3788-803.

Haslett WH, Dundee JW. Studies of drugs given before anaesthesia. XIV. Two benzodiazepine derivatives—chlordiazepoxide and diazepam. *Br J Anaesth* 1968; 40: 250-8.

Hauser CA, Wetzel CH, Berning B, Gerner FM, Rupprecht R. Flunitrazepam has an inverse agonistic effect on recombinant $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ -GABA_A receptors via a flunitrazepam-binding site. *J Biol Chem* 1997; 272: 11723-7.

Hennessy MJ, Kirkby KC, Montgomery IM. Comparison of the amnesic effects of midazolam and diazepam. *Psychopharmacology (Berl)* 1991; 103: 545-50.

Herz A. Über die Wirkung von Scopolamin, Benactyzin, und Atropin auf das Verhalten der Ratte. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pathol Pharmacol* 1959; 236: 110-11.

Herzog CD, Gandhi C, Bhattacharya P, Walsh TJ. Effects of intraseptal zolpidem and chlordiazepoxide on spatial working memory and high-affinity choline uptake in the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 2000; 73: 168-79.

Hinrichs JV, Ghoneim MM, Mewaldt SP. Diazepam and memory: retrograde facilitation produced by interference reduction. *Psychopharmacology* 1984; 84: 158-62.

Hevers W, Luddens H. The diversity of GABA_A receptors: pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol Neurobiol* 1998; 18: 35-86.

Higashima M, Kinoshita H, Koshino Y. Differences in the effects of zolpidem and diazepam on recurrent inhibition and long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters* 1998; 245: 77-80.

Hofmann M, Kordás KS, Gravius A, Bölcskei K, Parsons CG, Dekundy A, Danysz W, Dézsi L, Wittko-Schneider IM, Sághy K, Gyertyán I, Horváth C. Assessment of the effects of NS11394 and L-838417, $\alpha_{2/3}$ subunit-selective GABA_A receptor-positive allosteric modulators, in tests for pain, anxiety, memory and motor function. *Behav Pharmacol* 2012; 23: 790-801.

Holm KJ, Goa KL. Zolpidem: an update of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability in the treatment of insomnia. *Drugs* 2000; 59: 865-89.

Hölscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res* 1999; 100: 225-35.

Hommer D, Weingartner H, Breier A. Dissociation of benzodiazepine-induced amnesia from sedation by flumazenil pretreatment. *Psychopharmacology (Berl)* 1993; 112: 455-60.

Huang Q, He X, Ma C, Liu R, Yu S, Dayer CA, Wenger GR, McKernan R, Cook JM. Pharmacophore/receptor models for GABA_A/BzR subtypes ($\alpha_1\beta_3\gamma_2$, $\alpha_5\beta_3\gamma_2$, and $\alpha_6\beta_3\gamma_2$) via a comprehensive ligand-mapping approach. *J Med Chem* 2000; 43: 71-95.

Huang MP, Radadia K, Macone BW, Auerbach SH, Datta S. Effects of eszopiclone and zolpidem on sleep-wake behavior, anxiety-like behavior and contextual memory in rats. *Behav Brain Res* 2010; 210: 54-66.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory* 1997; 68: 285–316.

Jensen RA, Martinez Jr JL, Vasquez BJ, McGaugh JL. Benzodiazepines alter acquisition and retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Psychopharmacology* 1979; 64: 125–6.

Jensen LH, Stephens DN, Sarter M, Petersen EN. Bidirectional effects of beta-carbolines and benzodiazepines on cognitive processes. *Brain Res Bull* 1987; 19: 359-64.

June HL, Foster KL, McKay PF, Seyoum R, Woods JE, Harvey SC, Eiler WJ, Grey C, Carroll MR, McCane S, Jones CM, Yin W, Mason D, Cummings R, Garcia M, Ma C, Sarma PV, Cook JM, Skolnick P. The reinforcing properties of alcohol are mediated by GABA(A1) receptors in the ventral pallidum. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 2124-37.

Koh MT, Rosenzweig-Lipson S, Gallagher M. Selective GABA_A α_5 positive allosteric modulators improve cognitive function in aged rats with memory impairment. *Neuropharmacology* 2013; 64: 145-52.

Koht A, Moss JI. Does midazolam cause retrograde amnesia, and can flumazenil reverse that amnesia? *Anesthesia & Analgesia* 1997; 85: 211–2.

Korpi ER, Gründer G, Lüddens H. Drug interactions at GABA_A receptors. *Prog Neurobiol* 2002; 67: 113-59.

Kraemer PJ, Brown RW, Baldwin SA, Scheff SW. Validation of a single-day Morris Water Maze procedure used to assess cognitive deficits associated with brain damage. *Brain Res Bull* 1996; 39: 17-22.

Lau CE, Ma F, Wang Y, Smith C. Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam after intravenous, subcutaneous, intraperitoneal and oral administration under a chronic food-limited regimen: relating DRL performance to pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berlin)* 1996; 126: 241–8.

Lecker I, Yin Y, Wang DS, Orser BA. Potentiation of GABA_A receptor activity by volatile anaesthetics is reduced by α 5GABAA receptor-preferring inverse agonists. *Br J Anaesth* 2013. [Epub ahead of print]

Lippa A, Czobor P, Stark J, Beer B, Kostakis E, Gravielle M, Bandyopadhyay S, Russek SJ, Gibbs TT, Farb DH, Skolnick P. Selective anxiolysis produced by ocinaplon, a GABAA receptor modulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 7380–85.

Liu R, Hu RJ, Zhang P, Skolnick P, Cook JM. Synthesis and pharmacological properties of novel 8-substituted imidazobenzodiazepines: high-affinity, selective probes for alpha 5-containing GABAA receptors. *J Med Chem* 1996; 39: 1928-34.

Lister RG. The amnesic action of benzodiazepines in man. *Neurosci Biobehav Rev* 1985; 9: 87–94.

Logue SF, Paylor R, Wehner JM. Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav Neurosci* 1997; 111: 104-13.

Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 2000; 290: 131–34.

Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 2004; 84: 87-136.

Lynch G, Palmer LC, Gall CM. The likelihood of cognitive enhancement. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 99: 116-29.

Macdonald RL, Olsen RW. GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 569-602.

Maei HR, Zaslavsky K, Teixeira CM, Frankland PW. What is the Most Sensitive Measure of Water Maze Probe Test Performance? *Front Integr Neurosci* 2009; 3: 4.

Makaron L, Moran CA, Namjoshi O, Rallapalli S, Cook JM, Rowlett JK. Cognition-impairing effects of benzodiazepine-type drugs: Role of GABA_A receptor subtypes in an executive function task in rhesus monkeys. *Pharm Biochem Behav* 2013; 104: 62–8.

Mandema JW, Tukker E, Danhof M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the EEG effects of midazolam in individual rats: influence of rate and route of administration. *British Journal of Pharmacology* 1991; 102: 663–8.

Maubach K. GABA(A) receptor subtype selective cognition enhancers. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003; 2: 233-9.

McGaugh JL. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 2002; 25: 456.

McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci* 2000; 3: 587-92.

McNamara RK, Skelton RW. Diazepam impairs acquisition but not performance in the Morris water maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 38: 651-8.

McNamara RK, Skelton RW. Like diazepam, CL 218,872, a selective ligand for the benzodiazepine ω 1 receptor subtype, impairs place learning in the Morris water maze. *Psychopharmacology* 1992; 107: 347-351.

McNamara RK, Skelton RW. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res Brain Res Rev* 1993a; 18: 33-49.

McNamara RK, Skelton RW. Benzodiazepine receptor antagonists flumazenil and CGS 8216 and inverse-agonist β -CCM enhance spatial learning in the rat: Dissociation from anxiogenic actions. *Psychobiology* 1993b; 21: 101-8.

Milić M, Divljaković J, Rallapalli S, van Linn ML, Timić T, Cook JM, Savić MM. The role of α 1 and α 5 subunit-containing GABA_A receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rats. *Behav Pharmacol* 2012; 23: 191-7.

Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 2003; 70: 83-244.

Miller SL, Fenstermacher E, Bates J, Blacker D, Sperling RA, Dickerson BC. Hippocampal activation in adults with mild cognitive impairment predicts subsequent cognitive decline. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 630-5.

Mirza NR, Larsen JS, Mathiasen C, Jacobsen TA, Munro G, Erichsen HK, Nielsen AN, Troelsen KB, Nielsen EØ, Ahring PK. NS11394 [3'-[5-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-benzoimidazol-1-yl]-biphenyl-2-carbonitrile], a unique subtype-selective GABA_A

receptor positive allosteric modulator: in vitro actions, pharmacokinetic properties and in vivo anxiolytic efficacy. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327: 954-68.

Möhler H. The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology* 2011; 60: 1042-9.

Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11: 47-60.

Morris RGM. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 1989; 9: 3040-57.

Morris RG. Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 1453-65.

Moser MB, Moser EI. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 1998; 18: 7535-42.

Noguchi H, Kitazumi K, Mori M, Shiba T. Effect of zaleplon on learning and memory in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002; 366: 183-8.

Nutt DJ, Besson M, Wilson SJ, Dawson GR, Lingford-Hughes AR. Blockade of alcohol's amnesic activity in humans by an α_5 subtype benzodiazepine receptor inverse agonist. *Neuropharmacology* 2007; 53: 810-20.

Obradović DI, Savić MM, Anđelković DS, Ugrešić ND, Bokonjić DR. The influence of midazolam on active avoidance retrieval and acquisition rate in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2004; 77: 77-83.

Olkkola KT, Ahonen J. Midazolam and other benzodiazepines. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2008; 182: 335-60.

Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. *Update Pharmacol Rev* 2008; 60: 243-60.

Olsen RW, Sieghart W. GABA_A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacol* 2009; 56: 141-8.

Paul CM, Magda G, Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 2009; 203: 151-64.

Petersen EN. DMCM: a potent convulsive benzodiazepine receptor ligand. *Eur J Pharmacol* 1983; 94: 117-24.

Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* 2005; 48: 175-87.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 2000; 101: 815-50.

Prestia A, Boccardi M, Galluzzi S, Cavedo E, Adorni A, Soricelli A, Bonetti M, Geroldi C, Giannakopoulos P, Thompson P, Frisoni G. Hippocampal and amygdalar volume changes in elderly patients with Alzheimer's disease and schizophrenia. *Psychiatry Res* 2011; 192: 77-83.

Puia G, Vicini S, Seeburg PH, Costa E. Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ currents. *Mol Pharmacol* 1991; 39: 691-6.

Quirk K, Blurton P, Fletcher S, Leeson P, Tang F, Mellilo D, Ragan CI, McKernan RM. [3H]L-655,708, a novel ligand selective for the benzodiazepine site of GABA_A receptors which contain the α_5 subunit. *Neuropharmacology* 1996; 35: 1331-5.

Ribeiro RL, Andreatini R, Wolfman C, Viola H, Medina JH, Da Cunha C. The "anxiety state" and its relation with rat models of memory and habituation. *Neurobiol Learn Mem* 1999; 72: 78-94.

Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, Martin SJ, Bridge H, de Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RG. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci.* 1999; 2: 898-905.

Rose GM, Rowe WB. Water maze testing to identify compounds for cognitive enhancement. *Curr Protoc Pharmacol* 2012; 5: 5.63.

Rowlett JK, Cook JM, Duke AN, Platt DM. Selective antagonism of GABA_A receptor subtypes: an in vivo approach to exploring the therapeutic and side effects of benzodiazepine-type drugs. *CNS Spectr* 2005; 10: 40-8.

Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 1999; 401: 796-800.

Rudolph U, Möhler H. Analysis of GABA_A receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 475-98.

Rudolph U, Möhler H. GABA-based therapeutic approaches: GABA_A receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 18-23.

Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, Akula N, Groyer G, Adams D, Schumacher M. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 971–88.

Saab BJ, Maclean AJ, Kanisek M, Zurek AA, Martin LJ, Roder JC, Orser BA. Short-term memory impairment after isoflurane in mice is prevented by the α_5 γ -aminobutyric acid type A receptor inverse agonist L-655,708. *Anesthesiology* 2010; 113: 1061-71.

Sanger DJ, Morel E, Perrault G. Comparison of the pharmacological profiles of the hypnotic drugs, zaleplon and zolpidem. *Eur J Pharmacol* 1996; 313 : 35-42.

Sanna E, Busonero F, Talani G, Carta M, Massa F, Peis M, Maciocco E, Biggio G. Comparison of the effects of zaleplon, zolpidem, and triazolam at various GABA_A receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 2002; 451: 103–10.

Saraf MK, Kishore K, Thomas KM, Sharma A, Singh M. Role of platelet activating factor in triazolobenzodiazepines-induced retrograde amnesia. *Behav Brain Res* 2003; 142: 31–40.

Sarter M, Parikh V, Howe WM. nAChR agonist-induced cognition enhancement: integration of cognitive and neuronal mechanisms. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 658–67.

Savić M, Obradović D, Ugrešić N, Bokonjić D. The influence of diazepam on atropine reversal of behavioral impairment in dichlorvos-treated rats. *Pharmacol Toxicol* 2003; 93: 211-8.

Savić MM, Obradović DI, Ugresić ND, Cook JM, Sarma PV, Bokonjić DR. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands on active avoidance acquisition and retention: differential antagonism by flumazenil and beta-CCt. *Psychopharmacology (Berl)* 2005a; 180: 455-65.

Savić MM, Obradović DI, Ugresić ND, Cook JM, Yin W, Bokonjić DR. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the passive avoidance task: differential antagonism by flumazenil and β CCt. *Behav Brain Res* 2005b; 158: 293-300.

Savić MM, Clayton T, Furtmüller R, Gavrilović I, Samardzić J, Savić S, Huck S, et al. PWZ-029, a compound with moderate inverse agonist functional selectivity at GABA_A receptors containing α_5 subunits, improves passive, but not active, avoidance learning in rats. *Brain Res* 2008a; 1208: 150-9.

Savić MM, Huang S, Furtmüller R, Clayton T, Huck S, Obradović DI, Ugresić ND, Sieghart W, Bokonjić DR, Cook JM. Are GABA_A receptors containing alpha5 subunits contributing to the sedative properties of benzodiazepine site agonists? *Neuropsychopharmacology* 2008b; 33: 332-9.

Savić MM, Milinković MM, Rallapalli S, Clayton T Sr, Joksimović S, Van Linn M, Cook JM. The differential role of α_1 - and α_5 -containing GABA_A receptors in mediating

diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; 12:1179-93.

Savić MM, Majumder S, Huang S, Edwankar RV, Furtmüller R, Joksimović S, Clayton T Sr, Ramerstorfer J, Milinković MM, Roth BL, Sieghart W, Cook JM. Novel positive allosteric modulators of GABA_A receptors: do subtle differences in activity at α_1 plus α_5 versus α_2 plus α_3 subunits account for dissimilarities in behavioral effects in rats? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010; 34: 376-86.

Seabrook GR, Easter A, Dawson GR, Bowery BJ. Modulation of long-term potentiation in CA1 region of mouse hippocampal brain slices by GABA_A receptor benzodiazepine site ligands. *Neuropharmacology* 1997; 36: 823-30.

Shader RI, Greenblatt DJ. The use of benzodiazepines in clinical practice. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 11: 5S–9S.

Sieghart W. Structure and pharmacology of GABA_A receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 181–234.

Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 795–816.

Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M. A novel GABA_A receptor pharmacology: drugs interacting with the $\alpha(+)$ $\beta(-)$ interface. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 476-85.

Sieve AN, King TE, Ferguson AR, Grau JW, Meagher MW. Pain and negative affect: evidence the inverse benzodiazepine agonist DMCM inhibits pain and learning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 153: 180-90.

Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 13515-22.

Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 2004; 82: 171-7.

Stackman RW, Walsh TJ. Chlordiazepoxide-induced working memory impairments: site specificity and reversal by Flumazenil (RO15-1788). *Behav Neural Biol* 1992; 57: 233–43.

Steinberg H, Rushton R, Tinson C. Modification of the effects of an amphetamine-barbiturate mixture by the past experience of rats. *Nature* 1961; 192: 533–5.

Sternfeld F, Carling RW, Jelley RA, Ladduwahetty T, Merchant KJ, Moore KW, Reeve AJ, Street LJ, O'Connor D, Sohal B, Attack JR, Cook S, Seabrook G, Wafford K, Tattersall FD, Collinson N, Dawson GR, Castro JL, MacLeod AM. Selective, orally active gamma-aminobutyric acid A α_5 receptor inverse agonists as cognition enhancers. *J Med Chem* 2004; 47: 2176-9.

Stevens JC, Pollack MH. Benzodiazepines in clinical practice: consideration of their long-term use and alternative agents. *J Clin Psychiatry* 2005; 66: 21-7.

Study RE, Barker JL. Diazepam and (–)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 7180-4.

Tang AH, Smith MW, Carter DB, Im WB, VonVoigtlander PF. U-90042, a sedative/hypnotic compound that interacts differentially with the GABA_A receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 761-7.

Terry AV Jr. Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009.

Teuber L, Wätjens F, Jensen LH. Ligands for the benzodiazepine binding site--a survey. *Curr Pharm Des* 1999; 5: 317-43.

Tokuda K, O'Dell KA, Izumi Y, Zorumski CF. Midazolam inhibits hippocampal long-term potentiation and learning through dual central and peripheral benzodiazepine receptor activation and neurosteroidogenesis. *J Neurosci* 2010; 30: 16788–95.

Twersky RS, Hartung J, Berger BJ, McClain J, Beaton C. Midazolam enhances anterograde but not retrograde amnesia in pediatric patients. *Anesthesiology* 1993; 78: 51–5.

Venault P, Chapouthier G, de Carvalho LP, Simiand J, Morre M, Dodd RH, Rossier J. Benzodiazepine impairs and beta-carboline enhances performance in learning and memory tasks. *Nature* 1986; 321: 864-6.

Venault P, Chapouthier G. From the behavioral pharmacology of beta-carbolines to seizures, anxiety, and memory. *ScientificWorld Journal* 2007; 7: 204-23.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006; 1: 848-58.

Walters RJ, Hadley SH, Morris KD, Amin J. Benzodiazepines act on GABA_A receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci* 2000; 3: 1274-81.

Warrington EK, Weiskrantz L. The effect of prior learning on subsequent retention in amnesic patients. *Neuropsychologia* 1974; 12: 419-28.

Whishaw IQ, Tomie J. Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol Behav* 1996; 60: 1191-7.

Whishaw IQ. Posterior neocortical (visual cortex) lesions in the rat impair matching-to-place navigation in a swimming pool: a reevaluation of cortical contributions to spatial

Literatura

behavior using a new assessment of spatial versus non-spatial behavior. *Behav Brain Res* 2004; 155: 177–84.

Wieland HA, Luddens H, Seeburg PH. A single histidine in GABA_A receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Bio Chem* 1992; 267: 1426–9.

Wilson IA, Ikonen S, Gallagher M, Eichenbaum H, Tanila H. Age-associated alterations of hippocampal place cells are subregion specific. *J Neurosci* 2005; 25: 6877-86.

Yates D. Learning and memory: Stressful pathways to memory. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14: 4-5.

Zanin KA, Patti CL, Sanday L, Fernandes-Santos L, Oliveira LC, Poyares D, Tufik S, Frussa-Filho R. Effects of zolpidem on sedation, anxiety, and memory in the plus-maze discriminative avoidance task. *Psychopharmacology* 2013; 226: 459-74.

Zanotti A, Arban R, Perazzolo M, Giusti P. Diazepam impairs place learning in native but not in maze-experienced rats in the Morris water maze. *Psychopharmacology* 1994; 115: 73-8.

Zurek AA, Bridgwater EM, Orser BA. Inhibition of α_5 γ -Aminobutyric acid type A receptors restores recognition memory after general anesthesia. *Anesth Analg* 2012; 114: 845-55.

PRILOZI

PRILOG 1. Primeri putanja iz a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednog pacova iz grupa koje su primale rastvarač (SOL) ili diazepam (DZP) u dozama za koje se pokazalo da oštećuju učenje u MVL (1,5; 2 i 5 mg/kg).

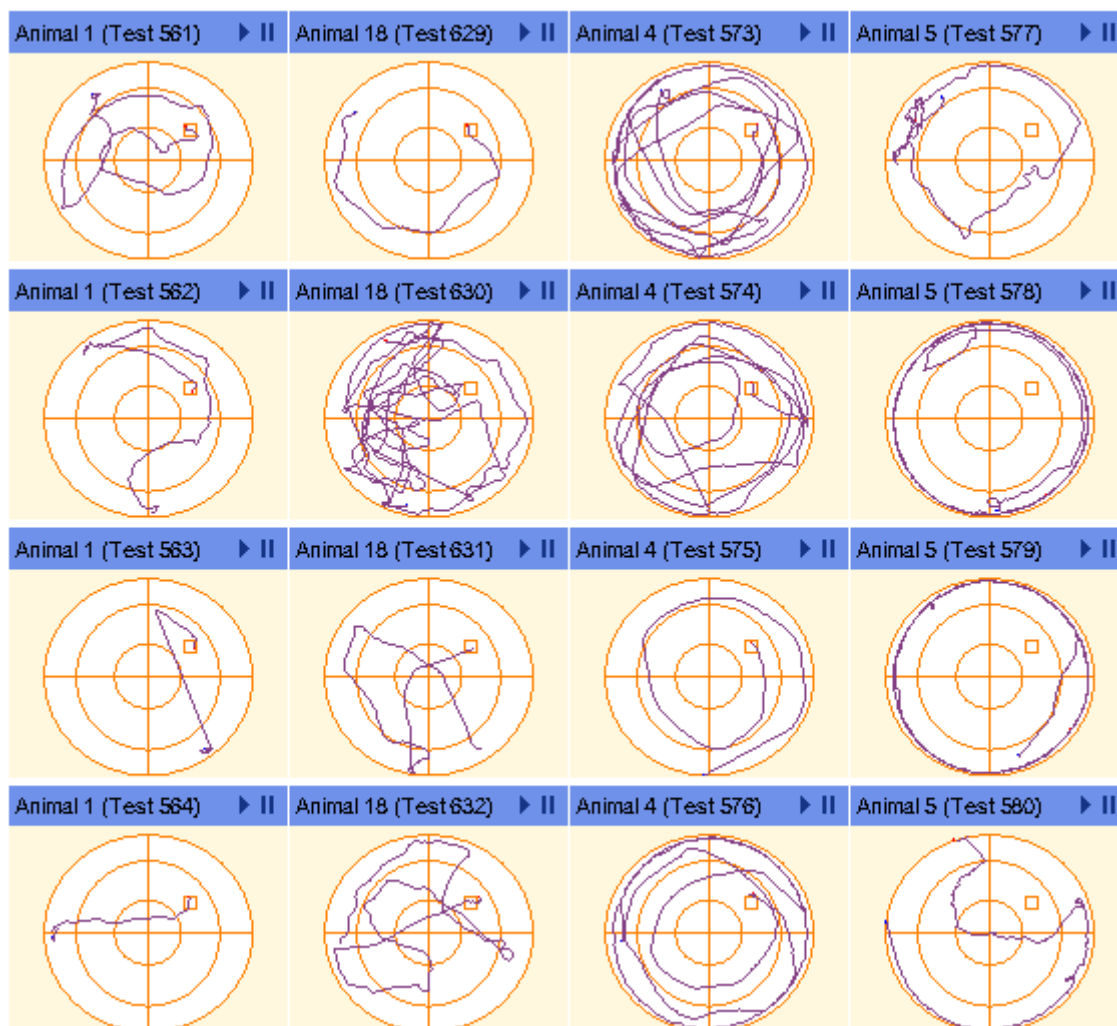
SOL

DZP 1,5

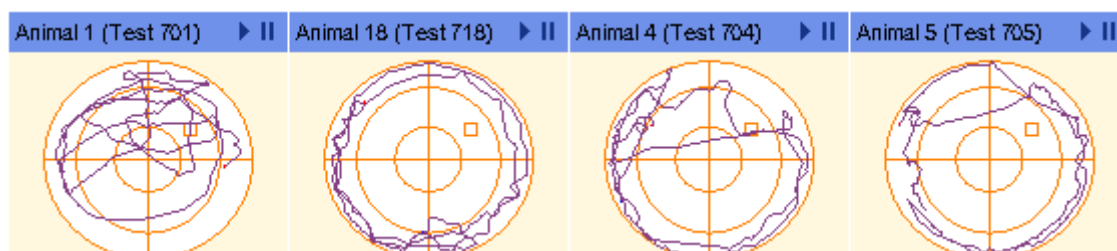
DZP 2

DZP 5

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 2. Primeri putanja iz a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednog pacova iz grupa koje su primale rastvarač (SOL) ili midazolam (0,5; 1 ili 2 mg/kg) pre treninga (uticaj na akviziciju).

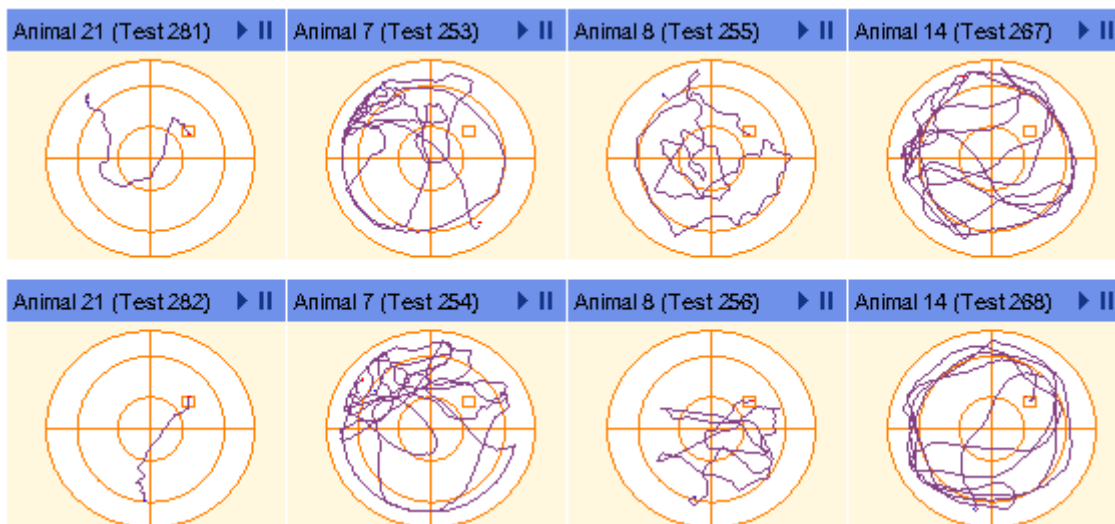
SOL

MDZ 0,5

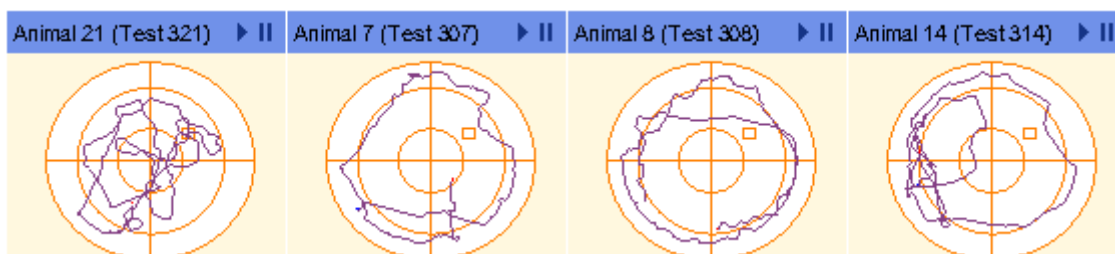
MDZ 1

MDZ 2

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 3. Primeri putanja iz a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednog pacova iz grupa koje su primale rastvarač (SOL) ili midazolam (0,5; 1 ili 2 mg/kg) nakon treninga (uticaj na konsolidaciju).

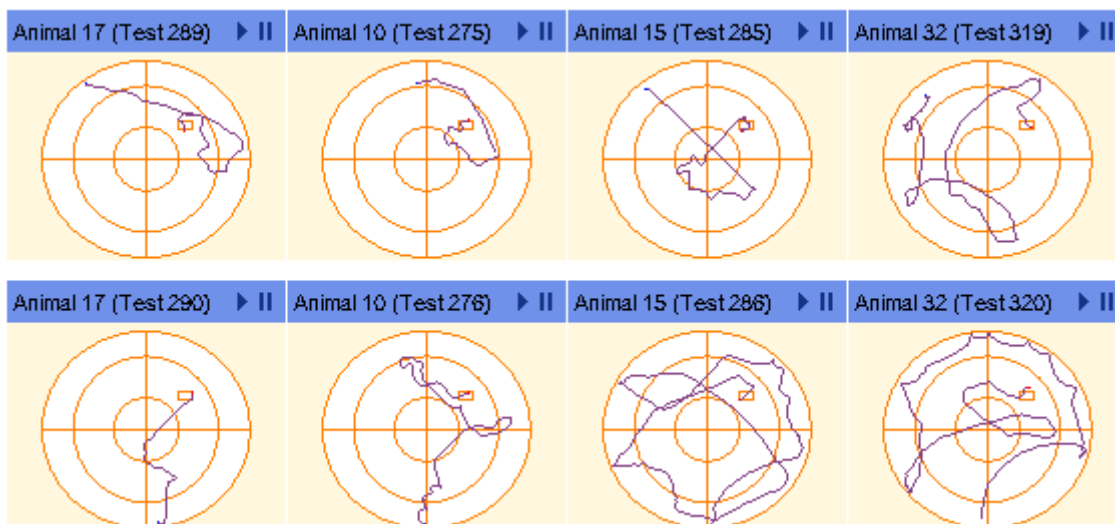
SOL

MDZ 0,5

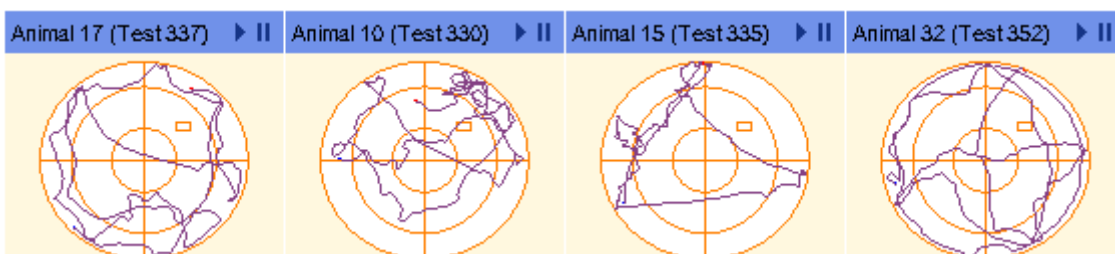
MDZ 1

MDZ 2

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 4. Primeri putanja iz a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednog pacova iz grupa koje su primale rastvarač (SOL) ili midazolam (0,5, 1 ili 2 mg/kg) nakon treninga (uticaj na konsolidaciju).

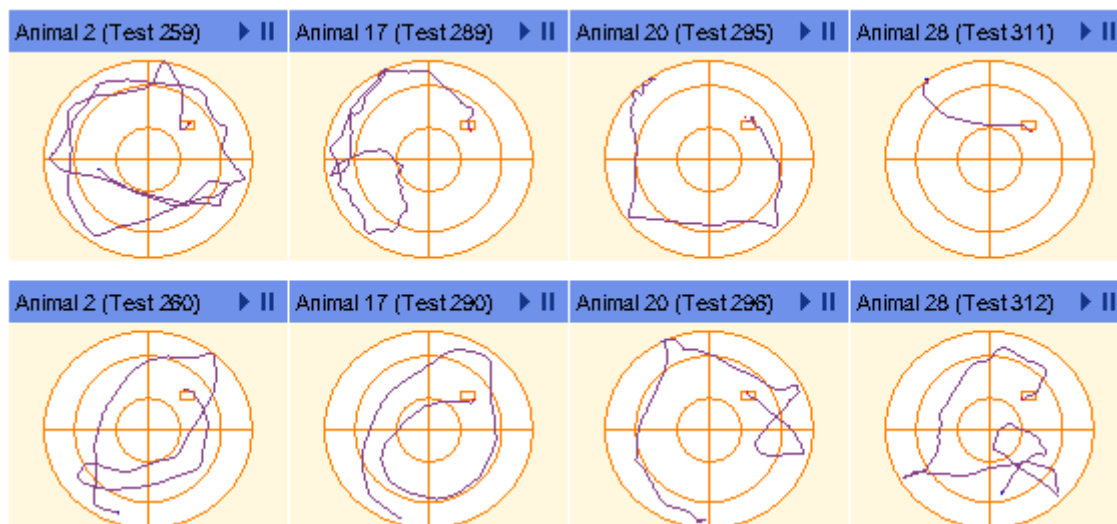
SOL

MDZ 0,5

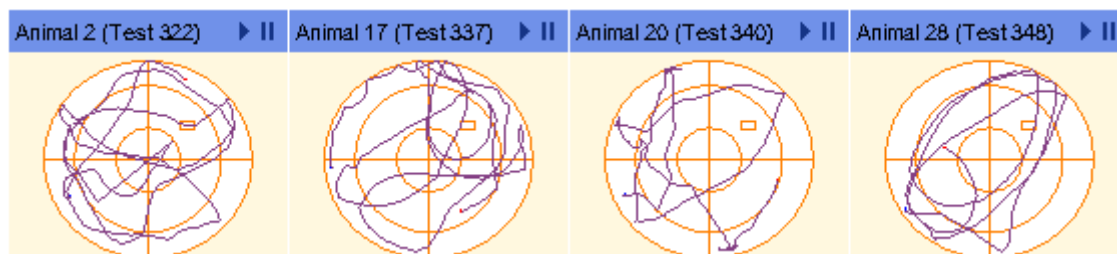
MDZ 1

MDZ 2

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 5. Primeri putanja iz a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednu životinju iz grupa koje su primale rastvarač (SOL) ili DMCM (0,2; 0,5 i 1 mg).

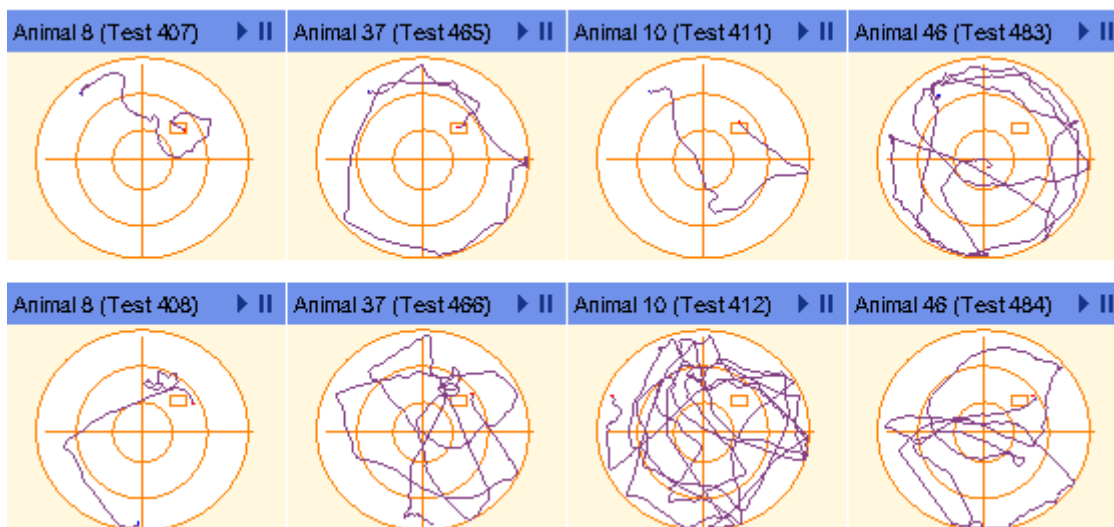
SOL

DMCM 0,2

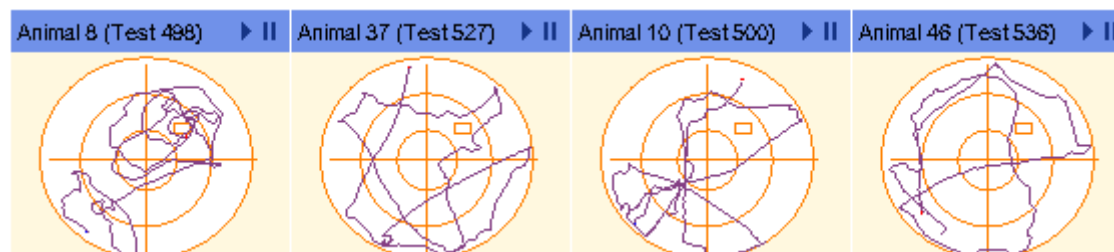
DMCM 0,5

DMCM 1

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 6. Primeri putanja iz a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednog pacova iz grupa koje su primale rastvarač (SOL), 1,5 mg/kg diazepama (DZP 1,5) i kombinaciju 1,5 mg/kg diazepama i 5 ili 15 mg/kg β CCt-a (DZP 2 + β CCt 5 i 15).

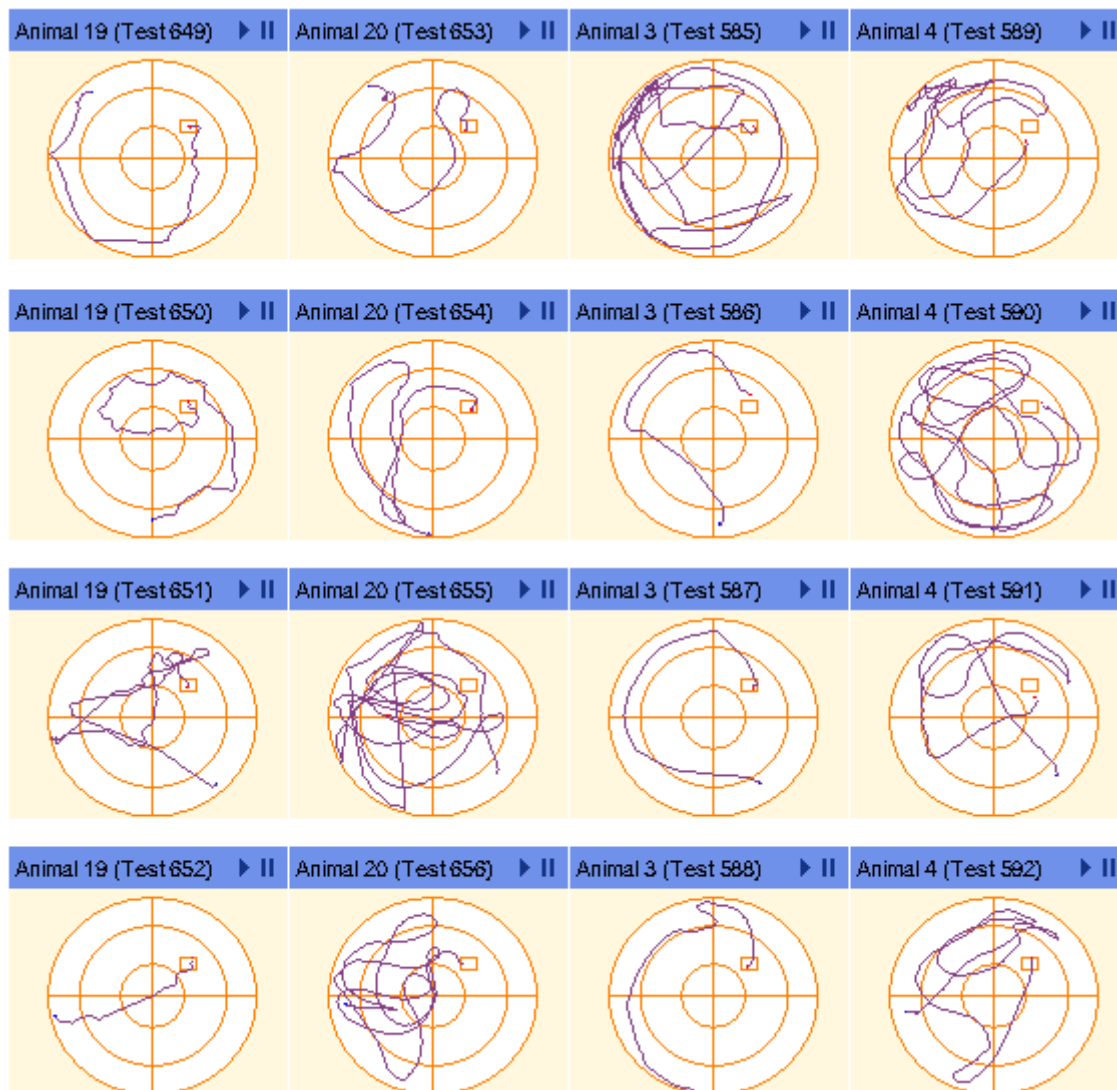
SOL

DZP 1,5

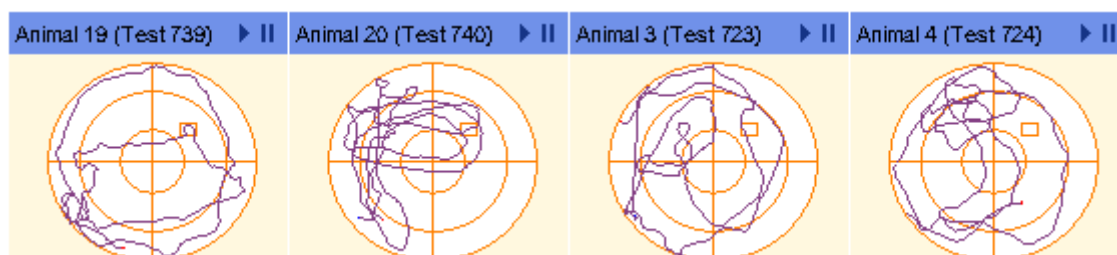
DZP 1,5 + β CCt 5

DZP 1,5 + β CCt 15

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



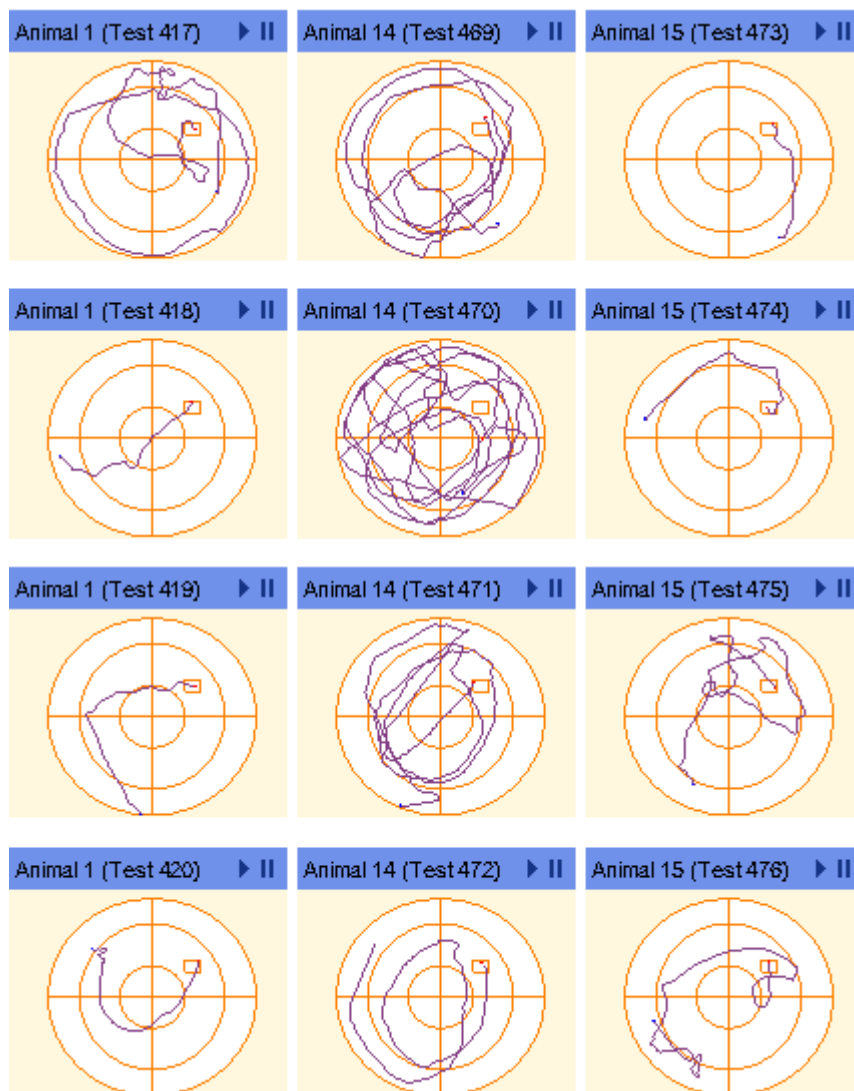
PRILOG 7. Primeri putanja iz a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednog pacova iz grupa koje su primale rastvarač (SOL), 2 mg/kg diazepam (DZP 2) i 2 mg/kg diazepam + 15 mg/kg β CCt-a.

SOL

DZP 2

DZP 2 + β CCt 15

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 8. Primeri putanja iz a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednu životinju iz grupa koje su primale rastvarač (SOL) ili zolpidem (0,5, 1 i 2 mg/kg).

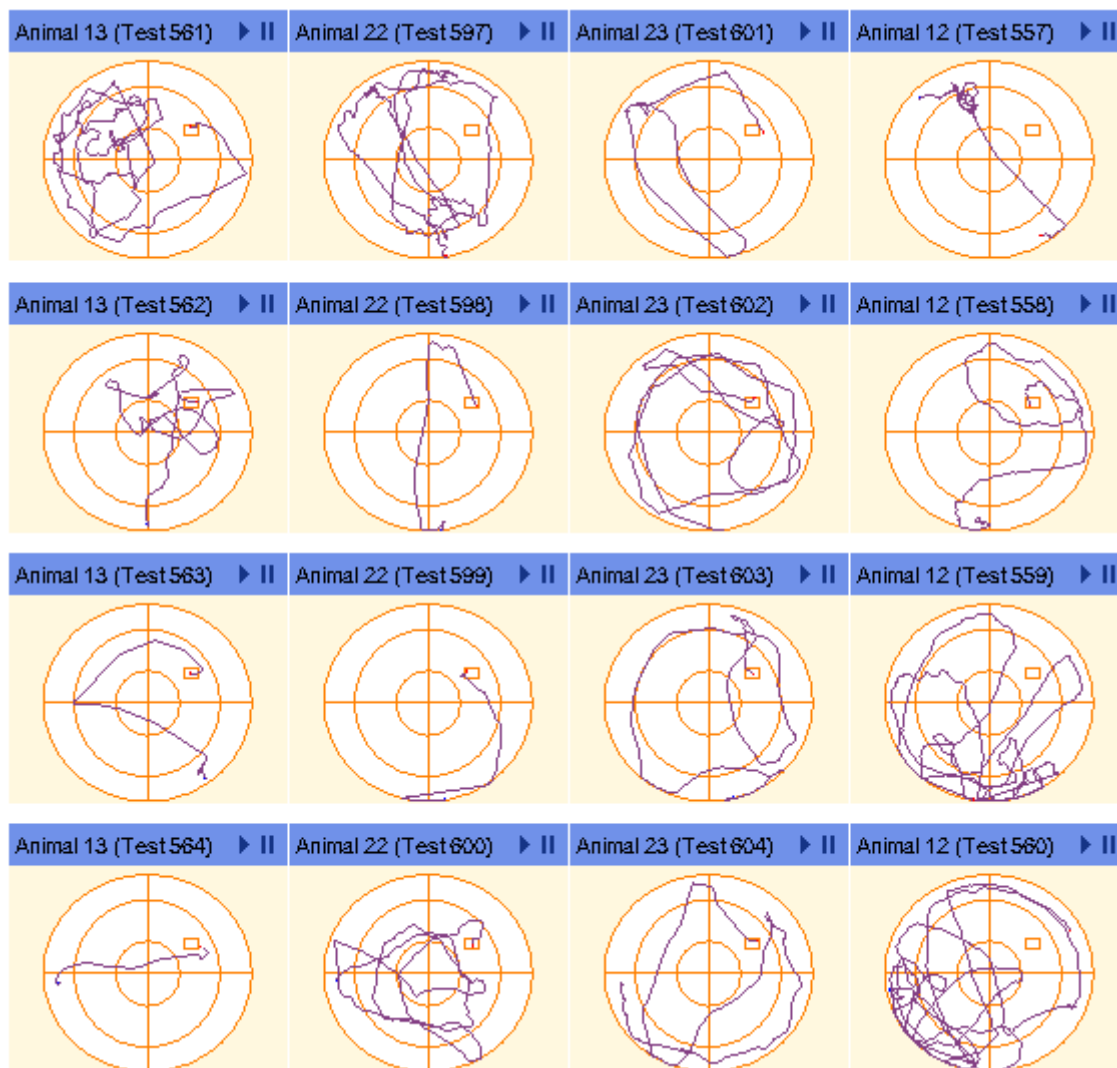
SOL

ZOL 0,5

ZOL 1

ZOL 2

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 9. Primeri putanja iz a) četiri plivanja poslednjeg dana treninga i b) testa pozivanja memorije, za po jednu životinju iz grupa koje su primale rastvarač (SOL) ili JY-HXe-053 (5, 20 ili 40 mg/kg).

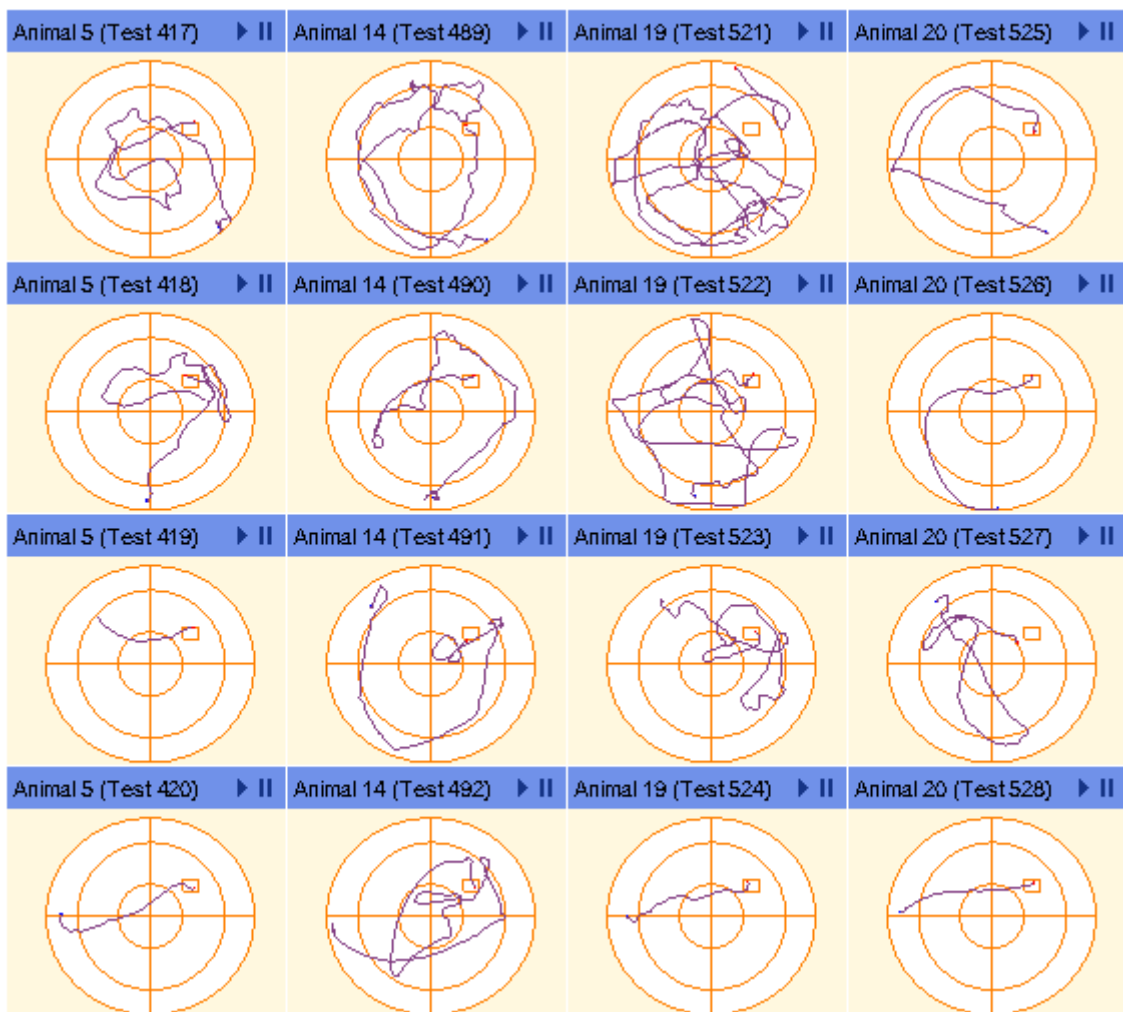
SOL

JY-HXe-053 5

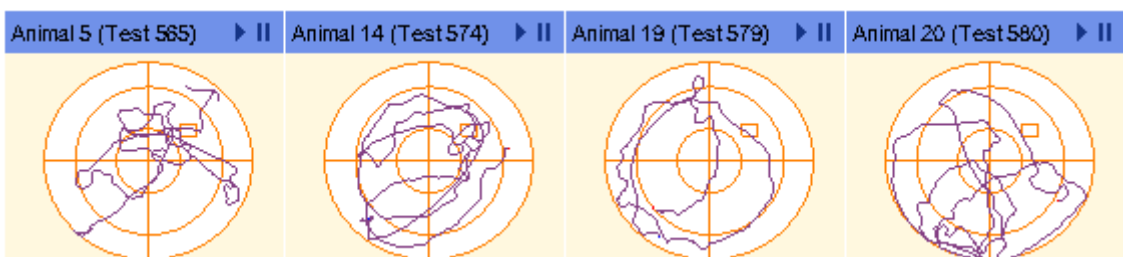
JY-HXe-053 20

JY-HXe-053 40

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 10. Primeri putanja za a) četiri plivanja poslednjeg dana treninga i b) tokom testa pozivanja memorije, za grupe koje su primale rastvarač (SOL), SH-053-S-CH3-2'F, SH-053-2'N ili SH-053-S-CH3-2'F, u dozama od 30 mg/kg.

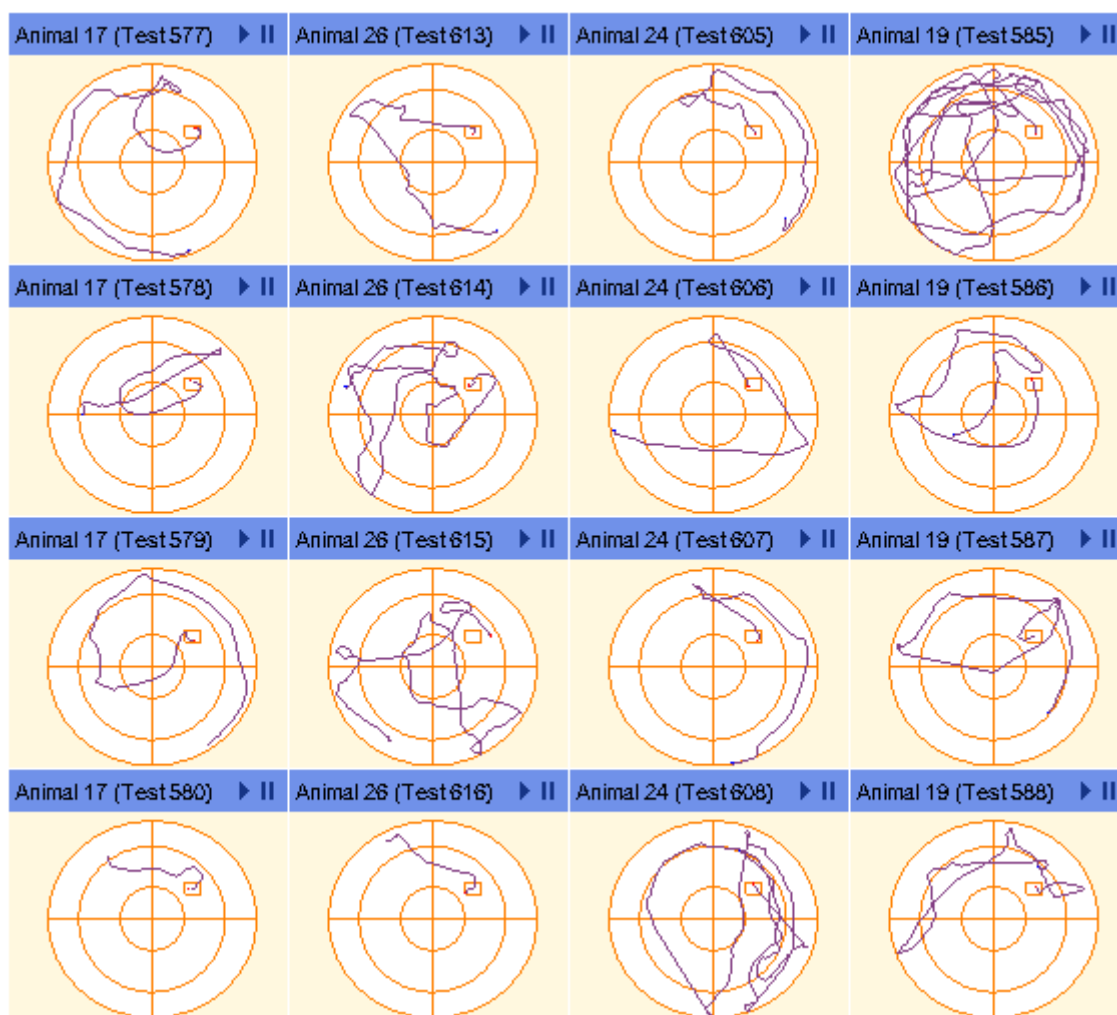
SOL

SH-053-S-CH3-2'F 30

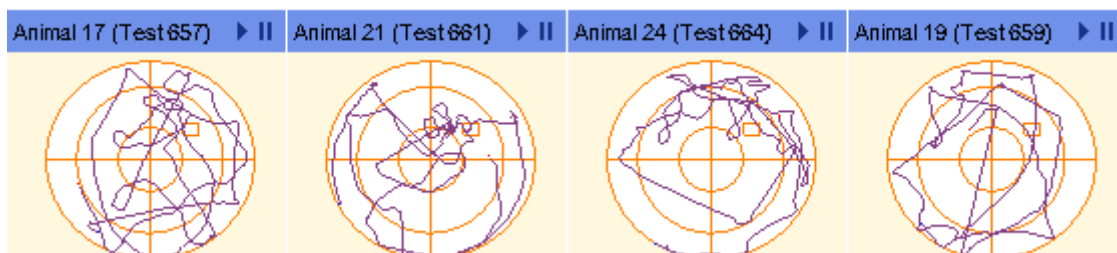
SH-053-R-CH3-2'F 30

SH-053-2'N 30

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 11. Primeri putanja tokom a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednu životinju iz grupa koje su primale rastvarač (SOL), diazepam (DZP 1,5) i kombinaciju diazepam + XLI093 10 ili XLI093 20 mg/kg.

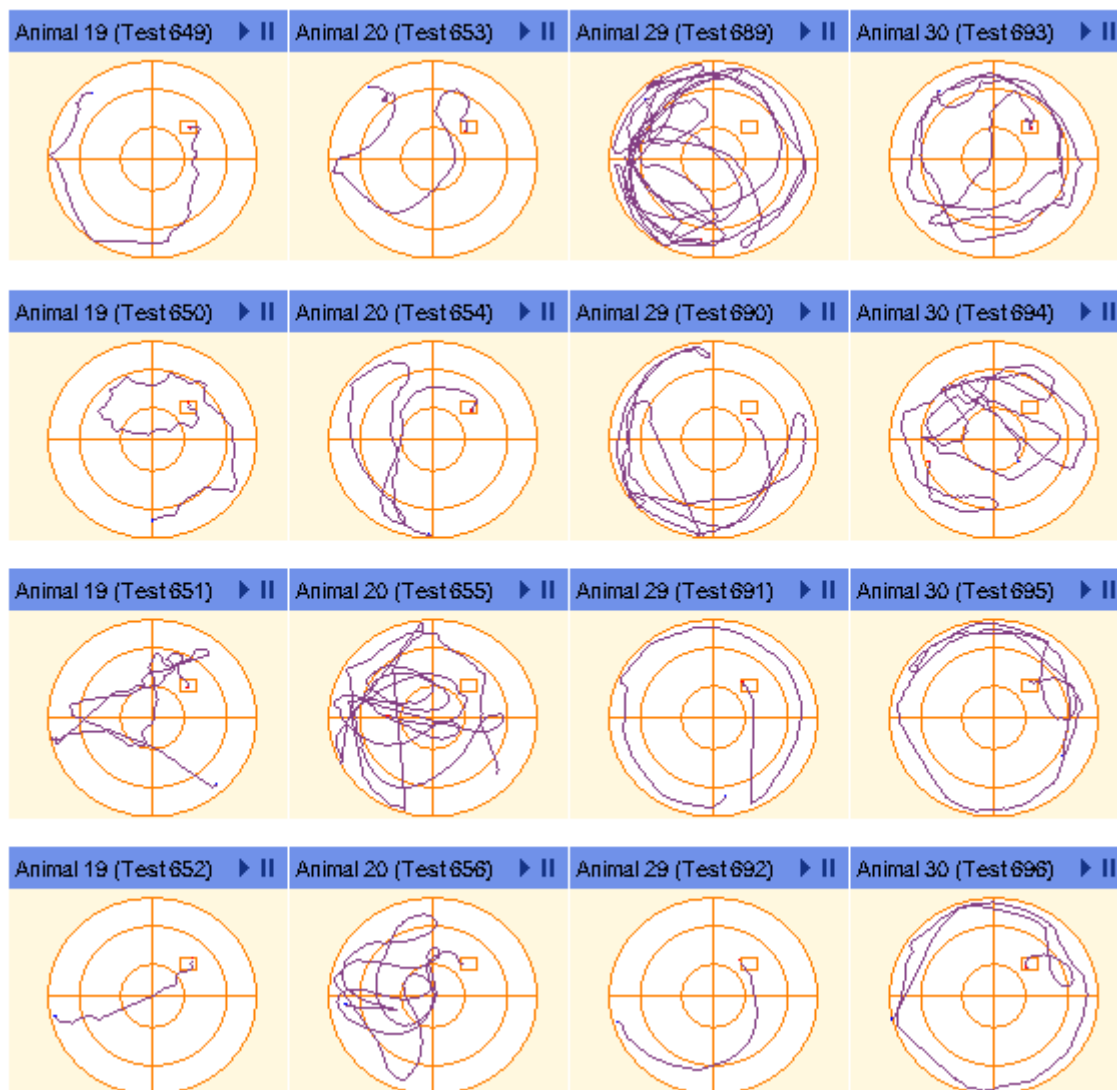
SOL

DZP 1,5

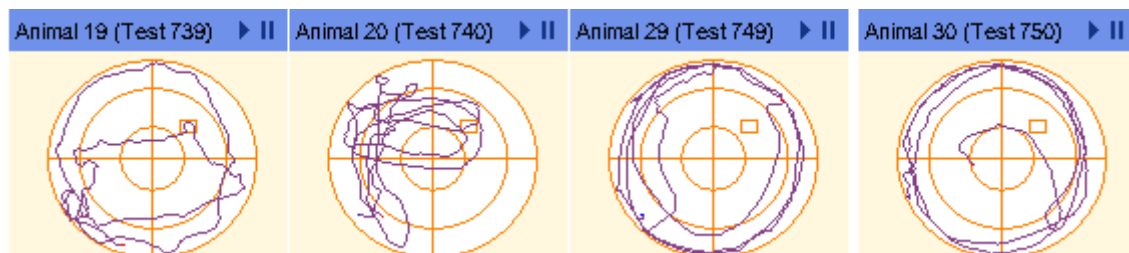
DZP 1,5 + XLI093 10

DZP 1,5 + XLI093 20

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



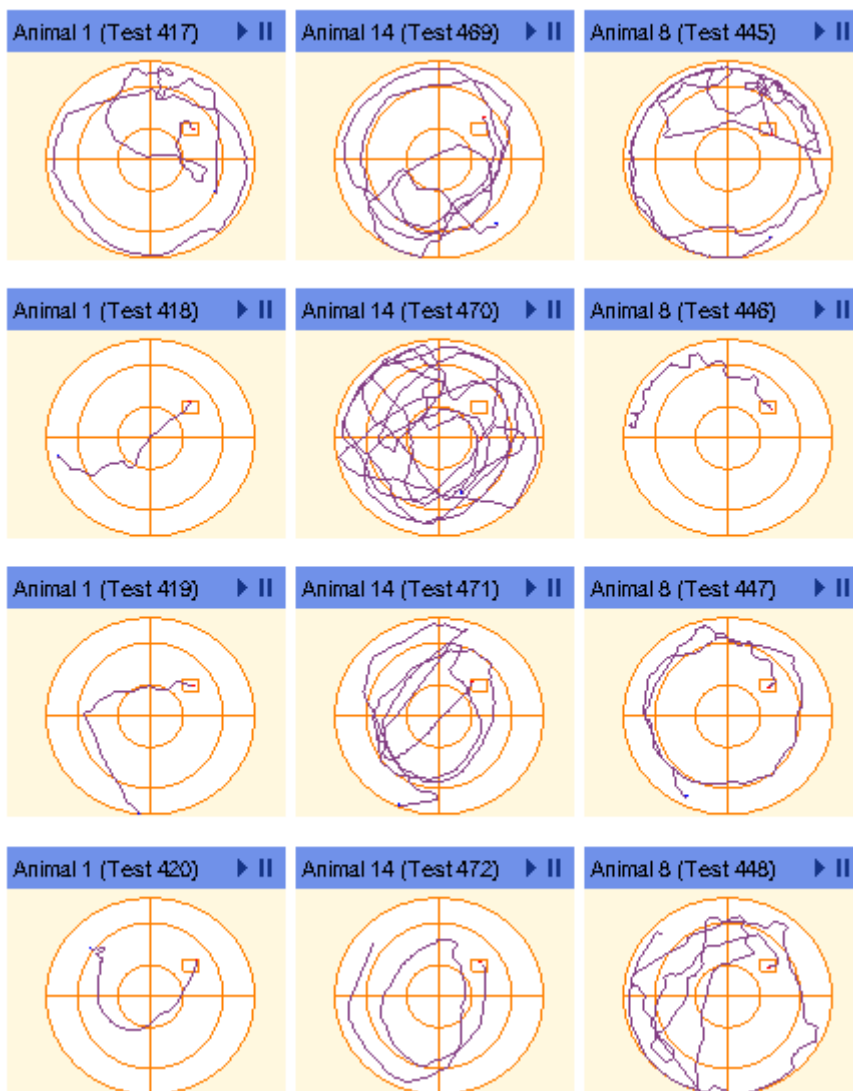
PRILOG 12. Primeri putanja iz a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednu životinju iz grupa koje su primale rastvarač (SOL), diazepam 2 mg/kg (DZP 2) i kombinaciju 2 mg/kg diazepama + 20 mg/kg XLi093.

SOL

DZP 2

DZP 2 + XLi093 20

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 13. Primer putanja iz a) III bloka treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednog pacova iz grupa koje su primale rastvarač (SOL) i XLI356 (5, 20 i 40 mg/kg).

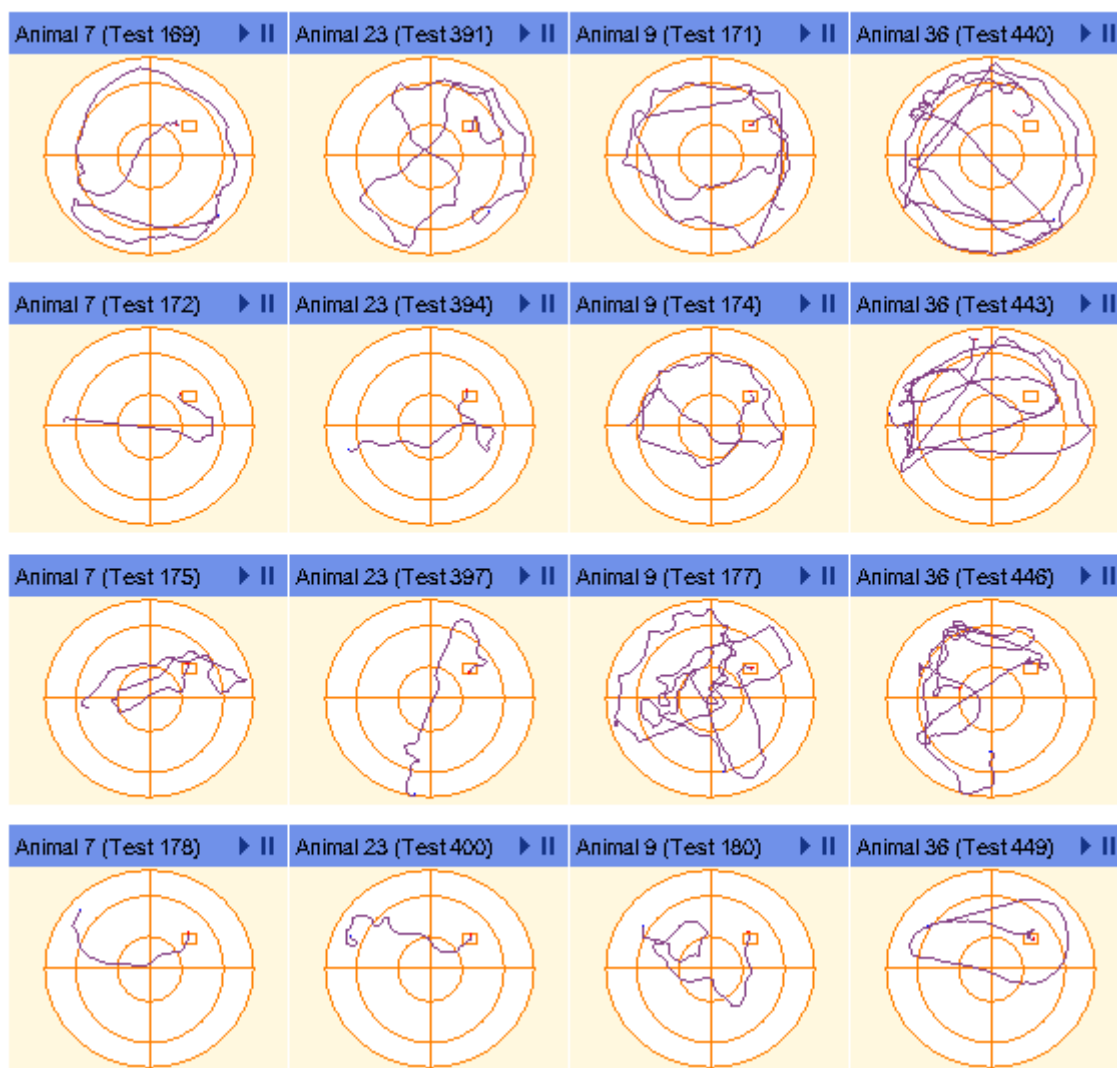
SOL

XLi356 5

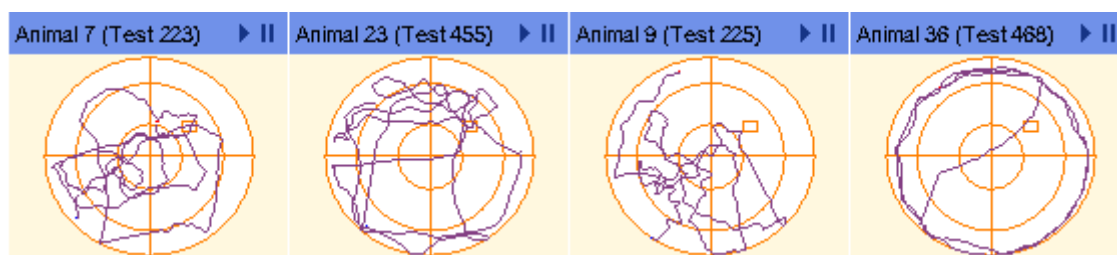
XLi356 10

Xli356 20

a) III blok treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 14. Primeri putanja iz a) V dana treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednog pacova iz grupa koje su primale rastvarač (SOL) ili PWZ029 (5, 10 ili 15 mg/kg).

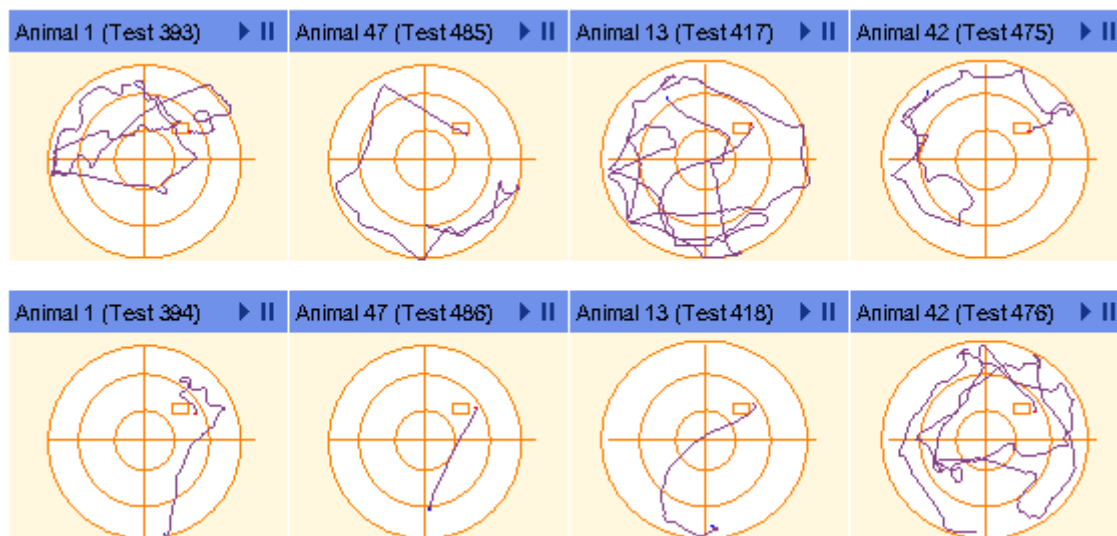
SOL

PWZ029 5

PWZ029 10

PWZ029 15

a) V dan treninga



b) test pozivanja memorije



PRILOG 15. Primeri putanja iz) III bloka treninga i b) testa pozivanja memorije za po jednu životinju iz grupa koje su primale rastvarač (SOL) ili PWZ029 (5, 15 ili 30 mg/kg).

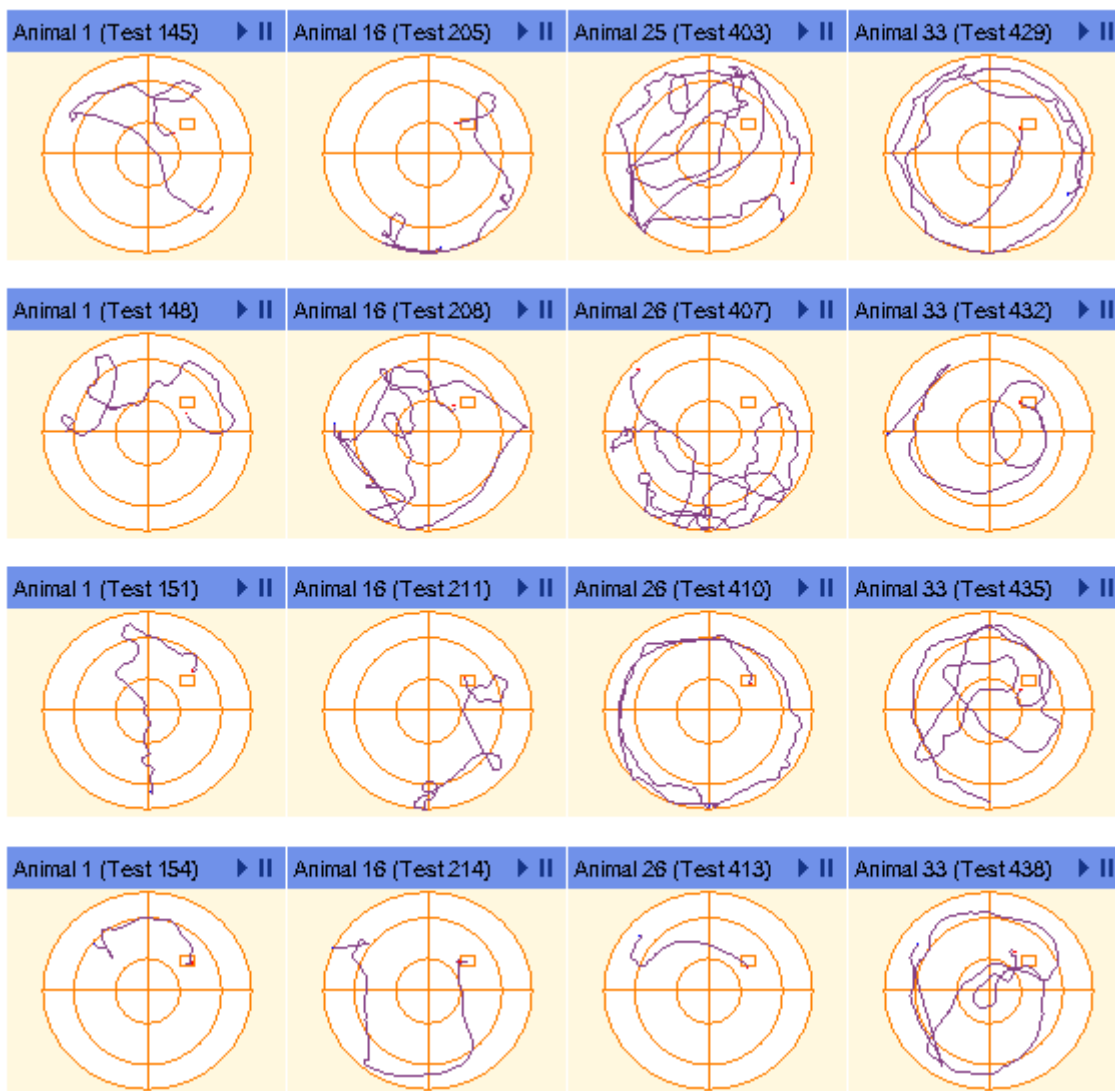
SOL

PWZ029 5

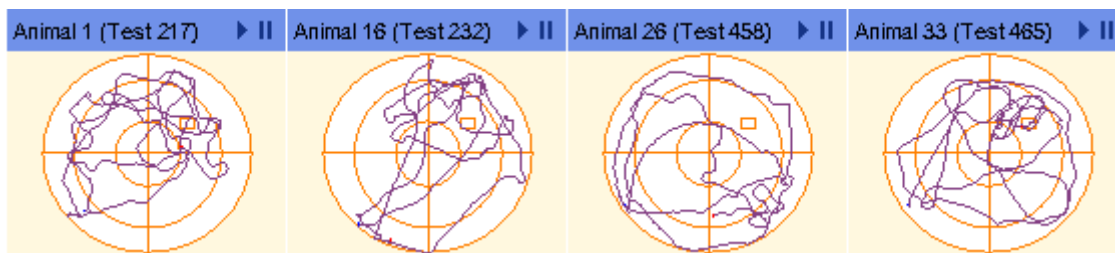
PWZ029 15

PWZ029 30

a) III blok treninga



b) test pozivanja memorije



BIOGRAFIJA

Marija Milić (rođ. Milinković) rođena je 1982. godine u Priboju, Republika Srbija. Na Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut, upisala se školske 2001/02. godine, a diplomirala maja 2007. sa srednjom ocenom 9,33. Dobitnik je više nagradnih stipendija (Fondacija „Hemofarm“, „Fondacija za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka“ Ministarstva prosvete Republike Srbije) kao i nagradnog putovanja za 200 najboljih studenata u Srbiji za 2006. godinu u organizaciji „Evropskog pokreta u Srbiji“ i Ambasade Republike Austrije.

Po obavljenom jednogodišnjem pripravničkom stažu za farmaceute položila je stručni ispit decembra 2008. godine. Na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu upisala je doktorske akademske studije školske 2007/08. godine, i iste godine zaposlila se kao saradnik u nastavi na Katedri za farmakologiju. U zvanje asistenta za užu naučnu oblast Farmakologija izabrana je 2009. godine. Učestvuje u realizaciji praktične nastave za studente osnovnih studija iz farmakologije i farmakoterapije. Član je komisije za odbranu diplomskih radova i mentor studentskih naučno-istraživačkih radova.

Asistent dipl. farm. Marija Milić uključena je u naučnoistraživački rad na Katedri za farmakologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Tokom 2010. godine angažovana je kao saradnik na projektu osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije „Bihejvioralna karakterizacija novosintetisanih supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora“ (projekat br. 145022). Od 2011. godine angažovana je na projektu „Bihejvioralni efekti ponavljane primene novosintetisanih supstanci selektivnih za pojedine podtipove benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora: poređenje sa standardnim psihofarmakološkim lekovima“ (projekat br. 175076).

Koautor je udžbenika za studente osnovnih studija *Farmakoterapija za farmaceute* (glavni urednik Ugrešić N, Beograd: Farmaceutski fakultet, 2011).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Милић

број индекса 28/07

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај супстанци селективних за поједине подтипове бензодиазепинског места везивања ГАБА_A рецептора на понашање пацова у Морисовом воденом лавиринту

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.09.2013.

Марија Милић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Милић

Број индекса 28/07

Студијски програм Фармакологија

Наслов рада Утицај супстанци селективних за поједине подтипове бензодиазепинског места везивања ГАБА_A рецептора на понашање пацова у Морисовом воденом лавиринту

Ментор проф. др Мирослав Савић

Потписани/а Марија Милић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.09.2013.

Марија Милић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај супстанци селективних за поједине подтипове бензодиазепинског места везивања ГАБА_A рецептора на понашање пацова у Морисовом воденом лавиринту

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 09.09.2013.

Марија Мимић