

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.12.2015. godine, broj 5940/2, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

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

kandidata saradnika u nastavi dr Dragane Srebro, zaposlene na Katedri za farmakologiju, klini ku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Sonja Vu kovi .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Milica Prostran, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Radan Stojanovi , vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Slobodan Jankovi , profesor Medicinskog fakulteta u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija saradnika u nastavi dr Dragane Srebro napisana je na 178 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 54 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je definisana uloga standardnih i adjuvantnih analgetika i njihova klinička primena. Tako je opisana uloga *N*-metil-D-aspartat (NMDA) receptora, kanala za prolazne receptorske potencijale (TRP), kao i azot oksida (NO) u analgeziji. Prikazana je uloga magnezijuma i dizocilpina, kao antagonista NMDA receptora u leenju bola, kao i šta je u dosadašnjim studijama uraeno. Pokazano je da NMDA antagonisti mogu poveati analgetički efekt opioida i da samostalno primenjeni imaju analgetički efekt u neuropatskom bolu.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju i poreenju antinociceptivnog odgovora magnezijum-sulfata i dizocilpina kod pacova. Tako je, ova studija imala je za cilj ispitivanje efekata magnezijum-sulfata i dizocilpina na inflamatorni edem kod pacova. Još jedan od ciljeva bio je i ispitivanje mehanizma nastanka analgetičkog i antiinflamatornog dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpina.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da su eksperimenti odobreni od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, i u skladu su sa Zakonom o dobrobiti životinja u Republici Srbiji (dozvola broj 4946/2-2012 i 5362/2-2014) i vodi em Internacionalnog udruženja za prouavanje bola (IASP).

Eksperimenti su uraeni na mužjacima pacova soja Wistar albino, mase 220-290 grama (Vivarijum Vojnomedicinske akademije u Beogradu). Opisan je eksperimentalni protokol i izvoenja eksperimenata. Prvo je raena adaptacija životinja na pojedine eksperimentalne procedure. Nakon toga se kod odre enih eksperimenata pristupalo merenju kontrolnog praga bola na mehanički stimulus i volumena šape, a nakon davanja lekova ispitivana je antihiperalgezija i edem šape. Antihiperalgezija je ispitivana pomo u mehaničkog stimulusa metodom pritiska na šapu pacova. Promene u volumenu šape pacova merene su pletizmometrom. Kod pojedinih eksperimenata, antinocicepcija je ispitivana metodom brojanja karakterističnog bolnog ponašanja ili merenja vremena provedenog u istom. Dejstvo na motornu koordinaciju pacova registrovano je rotarod aparatom. Precizno je naveden protokol za sistemska i lokalna primena lekova. Za svaku eksperimentalnu proceduru precizno je navedena analiza rezultata.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 302 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Istraživanje je pokazalo da magnezijum-sulfat i dizocilpin smanjuju mehaničku hiperalgeziju u modelu somatskog inflamatornog bola kod pacova. Efekt magnezijum-sulfata nastaje nakon sistemske, ali ne i nakon lokalne periferne primene. Efekt nije dozno-zavisan; u manjoj dozi (5 mg/kg) magnezijum-sulfat izaziva veći i analgetički efekt nego u većoj dozi (15 i 30 mg/kg). Suprotno magnezijum-sulfatu, analgetički efekt dizocilpina je dozno-zavisan i javlja se i nakon sistemske i nakon lokalne periferne primene. Sistemski primenjen magnezijum-sulfat ima i preventivno i terapijsko dejstvo.

Magnezijum-sulfat i dizocilpin smanjuju edem koji nastaje usled zapaljenja. Antiedematozni efekt dizocilpina nastaje samo nakon sistemske primene, dok isti efekt magnezijum-sulfata nastaje i nakon sistemske i nakon lokalne periferne primene. Efekt magnezijum-sulfata nije, dok dizocilpina jeste dozno-zavisan. U manjoj dozi (5 mg/kg) magnezijum-sulfat ima profilaktičko dejstvo na inflamatorni edem, a u većoj dozi (30 mg/kg) postiže terapijsko dejstvo. Sistemski primenjeni magnezijum-sulfat i dizocilpin imaju jednako efikasno antiinflamatorno dejstvo (oko 30-50%).

Selektivni inhibitori NO sintaze na dozno-zavisan način menjaju sistemski analgetički i antiedematozni efekt magnezijum-sulfata i dizocilpina tokom somatske inflamacije, što ukazuje da NO ima modulatorno dejstvo na efekte magnezijum-sulfata i dizocilpina. Njihovo dejstvo preko NO-a zavisi od količine i uslova pod kojima je NO sintetisan.

U visceralnom inflamatornom bolu magnezijum-sulfat i dizocilpin ispoljavaju antinociceptivno dejstvo, u dozama koje ne izazivaju poremećaj motorne koordinacije pacova. I u ovom modelu bola analgeti koji imaju efekt dizocilpina jeste, a magnezijum-sulfata nije dozozavisan i ostvaruje se u manjim dozama (1-15 mg/kg). Takođe, i u ovom modelu bola magnezijum-sulfat i dizocilpin su pokazali jednaku efikasnost (30-80%). Suprotno u odnosu na somatski inflamatorni bol, u analgeti kom dejstvu magnezijum-sulfata i dizocilpina u visceralnom bolu ne postoji NO. Međutim, cGMP i ATP-senzitivni K⁺ kanali i njihova aktivacija nije zavisna od NO-a u okviru mehanizma analgeti kog dejstva dizocilpina, ali ne i magnezijum-sulfata.

Dok subkutana injekcija dizocilpina u zdravo tkivo ne izaziva bol, injekcija magnezijum-sulfata izaziva mehaničku hiperalgeziju koja traje nekoliko sati i praćena je blagim eritemom, bez pojave edema. Pronociceptivni efekt magnezijum-sulfata je dozozavisan, lokalne prirode i bez prisustva sekundarne hiperalgezije.

Pokazano je da u mehanizmu pronociceptivnog dejstva izotoničnog pH nepodešenog rastvora (pH~6) magnezijum-sulfata u okviru TRPA1, TRPV1, TRPV4 i ASIC kanali. Međutim, izotonični pH neutralni rastvor magnezijum-sulfata dovodi do lokalne mehaničke hiperalgezije u kojoj u okviru TRPA1, TRPV1 i TRPV4 kanali, ali ne i ASIC kanali. Magnezijum-sulfat lokalno izaziva bol i preko oslobađanja glutamata, aktivacije perifernih NMDA receptora i stvaranja NO-a i cGMP-a.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Poznato je da magnezijum i dizocilpin smanjuju neuropatski bol i povećavaju analgeti koji imaju efekt opioida, lokalnih i opštih anestetika (Begon i sar., 2000; Thisted i sar., 2006; Rondón i sar., 2010; Bell i sar., 2015). Podaci o dejstvu magnezijuma u inflamatornom bolu su oskudni i kontroverzni. U okviru ove disertacije magnezijum-sulfat i dizocilpin su u eksperimentima somatskog i visceralnog inflamatornog bola pokazali analgeti koji imaju efekt. Magnezijum-sulfat i dizocilpin u oba modela bola su jednako efikasni u pogledu analgezije, ali je magnezijum u odnosu na dizocilpin slabiji analgetik koji svoj efekt ostvaruje na dozoz nezavisan način nakon sistemske, ali nema efekt nakon lokalne periferne primene.

Magnezijum-sulfat se pokazao mnogo potentniji u terapiji inflamatornog, u odnosu na neuropatski bol (Begon i sar., 2000). Literaturni podaci o analgeti kom dejstvu magnezijuma tokom inflamacije su razli iti. U njima magnezijum primenjen sistemski/intratekalno ima ili nema antinociceptivni efekt (Ishizaki i sar., 1999; Takano i sar., 2000; Assi i sar., 2001; Begon i sar., 2002; Jahangiri i sar., 2013). U ura enim eksperimentima analgeti ko dejstvo magnezijum-sulfata je detektovano nakon sistemskog, ali ne i nakon lokalnog perifernog davanja što bi moglo da ukaže na centralno dejstvo. Me utim, da bi to razjasnili neophodno je intratekalno ili intracerebroventrikularno davanje magnezijum-sulfata pod istim eksperimentalnim uslovima. Dobijeni rezultati da dizocilpin nakon sistemske i lokalne primene ima analgeti ki efekt tokom somatske i visceralne inflamacije su u skladu sa literaturnim podacima (Ren i sar.,1992b; Chizh i sar., 2001; Beirith i sar., 2002; Chen i sar., Suardíaz i sar., 2007; 2010; Gong i sar., 2011). U ovom istraživanju prvi put je analgeti ki efekt dizocilpina postignut sa malim dozama dizocilpina koje ne narušavaju motornu kordinaciju pacova, što je u suprotnosti sa literaturnim podacima u kojima je dizocilpin u ve im dozama ostvario isti efekt. Pokazano je da i drugi antagonisti NMDA receptora, kao što su ketamin, memantin i dekstrometorfan mogu smanjiti akutni somatski i visceralni inflamatorni bol nakon sistemske ili lokalne primene (Bulutcu i sar., 2002; Berrino i sar., 2003; Mohammad i sar., 2012) što ukazuje na NMDA-zavisan mehanizam dejstva.

Magnezijum je mineral koji u organizmu ima brojne uloge. Pored ostalog, magnezijum je i nekompetitivni antagonist NMDA receptora koji blokira jonski kanal (Fawcet i sar., 1999), dok se dizocilpin vezuje nekompetitivno za fenciklidinsko mesto NMDA receptora, blokira otvaranje kanala i smanjuje frekvencu otvaranja kanala. Dizocilpin je potentan i visoko selektivan NMDA antagonist, zbog ega se i koristi kao istraživa ko sredstvo u farmakološkom prou avanju NMDA receptora. Zato su dobijeni rezultati dizocilpina konzistentniji sa rezultatima ketamina i drugih NMDA antagonista u inflamatornom bolu. Dobro je poznato da je aktivacija NMDA receptora u nastanku i održavanju procesa senzitivizacije koji se dešava tokom inflamatornog bola od velikog zna aja (Ren i sar., Petrenko i sar., 2003; Du i sar., 2003). Ova aktivacija vodi ka pove anoj sintezi NO-a, signalnog molekula koji ima dvostruko dejstvo na bol, i antinociceptivno i

pronociceptivno. U ovoj studiji, po prvi put je ispitan uticaj inhibitora NOS na dejstvo magnezijuma i dizocilpina u bolu. Na osnovu toga, pretpostavljeno je da NMDA- i NO-zavisani mehanizmi doprinose analgeti kom dejstvu dizocilpina i barem delimično dejstvu magnezijum-sulfata u somatskom i visceralnom inflamatornom modelu bola. Međutim, dobijeni rezultati ukazuju na blokadu NMDA receptora u oba modela bola i modulaciju NO-om u somatskom, ali ne i u visceralnom modelu bola. U skladu sa našim rezultatima, pokazano je da ketamin, takođe aktivira NO put i da na taj način ostvaruje centralno i periferno analgeti ko dejstvo (Bulutcu i sar., 2002; Romero i sar., 2011). Takođe je pokazano da dizocilpin i ketamin povećavaju sintezom NO-a izazivaju kognitivne poremećaje kod pacova (Boultadakis i Pitsikas, 2010). S druge strane, Bulutcu i sar. (2002) su pokazali da centralna aktivacija NO-cGMP puta doprinosi antinociceptivnom dejstvu ketamina u testu grčeva izazvanih sirćetnom kiselinom.

Dobijeni rezultati pokazuju da magnezijum-sulfat primenjen preventivno i sistemski ima antiedematozni efekat u vreme maksimalno razvijene inflamacije, što je u skladu sa literaturnim podacima (Nagai i sar., 2007; Mazur i sar., 2007; Almozni-Sarafian i sar., 2007). U sprovedenim eksperimentima, dizocilpin je ispoljio antiedematozni efekat nakon sistemske, ali ne i nakon lokalne periferne primene, što nije u skladu sa rezultatima drugih autora (Beirith i sar., 2002; Zanchet i Cury, 2003). Literaturni podaci o dejstvu različitih NMDA antagonista na edem u nekoliko eksperimentalnih modela zapaljenja su oskudni i neusklađeni i veći značaj pokazuju ne-NMDA receptori (Beirith i sar., 2002).

U našem istraživanju, L-NPA, selektivni inhibitor nNOS i SMT, potentan i selektivan inhibitor iNOS, antagonizovali su antiedematozne efekte magnezijum-sulfata i dizocilpina. Dobijeni rezultati ukazuju da magnezijum i dizocilpin povećavaju aktivnost NO-a i na taj način smanjuju edem šape, što nije u skladu sa podacima iz literature da su NO i magnezijum vazodilatatori (Gardiner i sar., 1992; Hughes i sar., 1990; Giraldeho i sar., 1994). Jedan od razloga za to može biti doza inhibitora NOS. I ako je NO vazodilatator, paradoksalno, inhibitori NOS mogu imati i proedematozno dejstvo.

Jedno od glavnih otkrića ove teze je da magnezijum-sulfat ubrizgan supkutano u šapu pacova ima dozno-zavisno, lokalno i periferno pronociceptivno dejstvo. Poznato je da intramuskularna, intravenska i supkutana injekcija magnezijum-sulfata kod ljudi (Agarwal i sar., 2004; Ushida i sar., 2009; Herroeder i sar., 2011) i intraperitonealna injekcija kod pacova (Gyires i Torma, 1984) izaziva lokalni osećaj bola. Za sada se samo zna da u mehanizmu pronociceptivnog dejstva magnezijum-sulfata ne učestvuju prostaglandini. Upotrebom selektivnih antagonista TRPV1, TRPV4, TRPA1 i ASIC kanala, pokazano je da lokalna (periferna) supkutana injekcija magnezijum-sulfata izaziva TRPV1-, TRPV4-, TRPA1- i ASIC-zavisnu mehaničku hiperalgeziju kod pacova. Ovi rezultati mogli bi da objasne patofiziologiju iritirajućeg bola koji nastaje posle injekcije lekova. O povezanosti TRP kanala i magnezijuma malo se zna, osim da TRP kanali tipa melastatin 6 i 7 su karakteristično permeabilni za jone magnezijuma (Schlingmann i sar., 2002; Monteilh-Zoller i sar., 2003). U sprovedenom istraživanju, dizocilpin, NMDA antagonist, je inhibirao magnezijum-sulfatom izazvanu mehaničku hiperalgeziju, iako obe supstance imaju sposobnost da blokiraju kanal u NMDA receptoru. Rezultati ukazuju da lokalno, periferno proizveden NO od strane i neuralnog i inducibilnog oblika NOS ima značajnu ulogu u magnezijum-sulfatom izazvanoj mehanici hiperalgezije šape pacova, s obzirom da inhibitori neuralne i inducibilne azot oksid sintaze blokiraju pronociceptivni efekt magnezijum-sulfata.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Vučković S, Srebro D, Savić Vujović K, Prostran M. The antinociceptive effects of magnesium sulfate and MK-801 in visceral inflammatory pain model: The role of NO/cGMP/K(+)ATP pathway. *Pharm Biol.* 2015;53(11):1621-7. (M 23; IF 1,241)
2. Srebro DP, Vučković SM, Savić Vujović KR, Prostran MŠ. TRPA1, NMDA receptors and nitric oxide mediate mechanical hyperalgesia induced by local injection of magnesium sulfate into the rat hind paw. *Physiol Behav.* 2015;139:267-73. (M21; IF 2,976)

3. Srebro DP, Vu kovi SM, Savi Vujovi KR, Prostran MS. Nitric oxide synthase modulates the antihyperalgesic effect of the NMDA receptor antagonist MK-801 on Carrageenan-induced inflammatory pain in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2014;234(4):287-93. (M23; IF 1,351)
4. Srebro DP, Vu kovi S, Vujovi KS, Prostran M. Anti-hyperalgesic effect of systemic magnesium sulfate in carrageenan-induced inflammatory pain in rats: influence of the nitric oxide pathway. *Magnes Res.* 2014;27(2):77-85. (M23; 0,766)

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Farmakodinamska ispitivanja magnezijum-sulfata i dizocilpina u modelima somatskog i visceralnog bola kod pacova**“ dr Dragane Srebro predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uloge magnezijum-sulfata i dizocilpina u analgeziji i inflamaciji. U ovom istraživanju je po prvi put pokazano da sistemski primenjen magnezijum-sulfat tokom inflamacije ima jednako efikasno analgetičko i antiedematozno dejstvo kao i dizocilpin, potentan i visoko selektivan NMDA antagonist. Po prvi put je pokazano i lokalno antiinflamatorno dejstvo magnezijum-sulfata. Ovi rezultati ukazuju da bi primena magnezijum-sulfata i NMDA antagonista kao adjuvantnih analgetika u somatskom i visceralnom inflamatornom bolu mogla biti od kliničkog značaja. Takođe, u ovoj studiji je po prvi put objašnjena i uloga NO-a u mehanizmu analgetičkog i antiinflamatornog dejstva magnezijum-sulfata i dizocilpina. Ovo je prva studija koja je pokazala da supkutana injekcija magnezijum-sulfata može izazvati bol na mestu primene koji se ostvaruje perifernom aktivacijom TRP kanala, NMDA receptora i stvaranjem NO-a.

Doktorska disertacija dr Dragane Srebro urađena je u skladu sa principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Dragane Srebro i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 14.01.2016.

lanovi Komisije:

Prof. dr Milica Prostran

Prof. dr Radan Stojanovi

Prof. dr Slobodan Jankovi

Mentor:

Prof. dr Sonja Vu kovi
