

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Odlukom Nastavno-nau nog ve a Medicinskog fakulteta, koja je doneta na sednici održanoj 03.11.2014. godine, broj 4600/11, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata mr Radmile Novakovi , istraživa a saradnika na Institutu za farmakologiju, klini ku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod nazivom: „**Uticao polifenola prirodnog porekla i sintetskih otvara a kalijumovih kanala na kontraktilnost izolovanog uterusa**“. Mentor je prof. dr Ljiljana Gojkovi -Bukarica, komentor je dopisni lan SANU prof. dr Nebojša Radunovi .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dragan Obradovi , profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Milica Baj eti , profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. Nau. save. dr Melita Vidakovi , nau ni savetnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stankovi ", Univerziteta u Beogradu

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 mr Radmile Novakovi napisana je na 136 strana i podeljena je na slede a poglavlja: I Uvod, II Ciljevi rada, III Materijal i metode, IV Rezultati, V Diskusija, VI Zaklju ci, VII Literatura, VIII Dodatak, IX Prilozi. U disertaciji se nalazi ukupno 25 slika i etiri tabele. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skra enica koriš enih u tekstu.

U **Uvodu** je definisana gra a i funkcija uterusa kao organa, prikazana je klasifikacija kalijumskih kanala, njihova zastupljenosti i uloga u kontraktilnosti miometrijuma. Dat je pregled najzna ajnijih sintetskih otvara a kalijumskih kanala. Istaknut je zna aj aberantne kontraktilnosti uterusa u poreme ajima kao što su dismenoreja i prevremeni poro aj i ozna eno je mogu e

mesto modulatora kalijumskih kanala u njihovoj prevenciji i le enju. Podvu en je zna aj *in vitro* oplodnje, opisan proces. U delu o prirodnim polifenolima dat je temeljan prikaz aktuelnih literaturnih podataka koji se odnose na opis prirodnih polifenola, njihovu klasifikaciju i identifikaciju njihovog farmakološkog svojstva. Poseban osvrt je u injen na rezveratrol i naringenin. Navedena je eventualna uloga rezveratrola i naringenina u terapiji hroni nih oboljenja u kojima bi njihov uticaj na membranske kalijumske kanale mogao biti i osnovni mehanizam njihovog dejstva.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Ispitivao se uticaj rezveratrola i naringenina na više modela kontrakcija animalnog negravidnog i humanog gravidnog uterusu. Definisale su se uloge kalijumskih kanala u mehanizmu dejstva rezveratrola, kao i njihova ekspresija u navedenim tkivima.

U poglavlju **Materijal i metode** opisan je model *in vitro* eksperimenata u kupatilu za izolovane organe uz detaljan opis pripreme animalnih i humanih uzoraka. Precizno je navedena eksperimentalna procedura, dat je pregled koriš enih supstanci i rastvora. Temeljno su objašnjene metode western blot i imunohistohemijsko bojenje specifi nim antitelima koje su koriš ene za detekciju i identifikaciju kalijumskih kanala u glatkoj muskulaturi uterusu. Objašnjena je obrada podataka i primenjena statisti ka analiza. Eksperimenti su sprovo eni u skladu sa eti kim principima i smernicama za brigu o životinjama odobrenim od strane Eti ke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja i Eti kog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno, grafi ki i tekstualno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

U poglavlju **Diskusija** kandidatkinja je na sveobuhvatan i detaljan na in povezala svoje rezultate sa postoje im rezultatima drugih autora i na osnovu toga donela odgovaraju e zaklju ke.

U poglavlju **Zaklju ci** sažeto su navedeni najzna ajniji nalazi koji su doneti na osnovu rezultata eksperimentalnog rada, a u skladu sa postavljenim ciljevima.

U poglavlju **Literatura** navedeno je 202 reference koje su citirane vankuverskim stilom.

Poglavlje **Dodatak** sadrži liste tabela i ilustracija koji dopunjuju rezultate ove doktorske disertacije, spisak radova publikovanih iz ove disertacije i biografiju autora.

## **B. Kratak opis postignutih rezultata**

Ovo istraživanje je pokazalo u okviru farmakološke analize efekata rezveratrola i naringenina, da su oni vrlo jaki inhibitori spontanih i indukovanih kontrakcija negravidnog pacovskog i gravidnog humanog miometrijuma pacijentkinja iz programa vantelesne oplodnje. Na in indukcije kontrakcija miometrijuma uticalo je razli ito na efekat rezveratrola, ali ne i na efekat naringenina. Ostvareni antagonizam rezveratrola sa primenjenim blokatorima kalijumskih kanala, ukazuje na u eš e ATP- zavisnih ( $K_{ATP}$ ), kalcijum–zavisnih ( $BK_{Ca}$ ) i voltažno-zavisnih ( $Kv$ ) kalijumskih kanala u mehanizam dejstva i rezveratrola kod faznog tipa kontrakcija gravidnog i negravidnog miometrijuma. Me utim, kada se rezveratrol primenjuje u visokim koncentracijama, ali kod toni nog tipa kontrakcija, rezveratrol ima dodatne mehanizme delovanja koji su nezavisni od kalijumskih kanala. Pokazan je odnos ekspresije proteina  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$ ,  $Kv$  kanala u tkivu glatke muskulature negravidnog uterusa pacova i gravidnog uterusa porodilja iz programa vantelesne oplodnje. Pokazano je da postoji razlika u ekspresiji raznih tipova  $K$  kanala u zavisnosti od fiziološkog stanja uterusa, odnosno negravidnog i gravidnog stanja. Ovo je prva studija koja je pokazala prisustvo proteina  $Kv2.1$  podtipa  $Kv$  kanala i protein  $Kir6.1$  i  $Kir6.2$  subjedinica  $K_{ATP}$  kanala u tkivu glatke muskulature negravidnog uterusa pacova, kao i  $Kv4.2$  u tkivu gravidnog humanog miometrijuma.

Naringenin inhibira spontane i indukovane kontrakcije negravidnog i gravidnog uterusa.

Rezveratrol znatno potentnije inhibira kontraktilnost uterusa od naringenina. Pore enjem efekata rezveratrola sa sintetskim otvara ima kalijumskih kanala, pinacidilom i NS1619 pokazano je da ovaj polifenol nema profil « klasi nog » sintetskog otvara a kalijumskih kanala.

Rezveratrol ima veliki potencijal da se koristi u prevenciji i le enju abnormalne i nepoželjne kontraktilnosti uterusa kao u slu aju dismenoreje, i prevremenih poro aja.

## **C. Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Polifenoli su sastavni deo mnogih biljnih namirnica koje se koriste u ishrani oveka. Rezveratrol se nalazi u žiži kako nau ne, tako i šire javnosti poslednjih deset godina. Za to vreme broj radova koji su ispitivali dejstvo rezveratrola na razli itim modelima u *in vitro* i klini kim

ispitivanjima *in vivo* je porastao na približno 7000. Prvi radovi koji su pokazali njegovo vazorelaksantno dejstvo proizašli su iz naše laboratorije. Međutim, pored ovakve brojnosti radova, relaksantni efekti rezveratrola na glatku muskulaturu negravidnog pacovskog uterusa je opisan samo u jednom radu (Hsia i sar., 2011). Prema nama dostupnoj literaturi, ova studija je prva koja ispituje dejstvo ovog polifenola na kontraktilnost humane gravidne materice.

Studija je pokazala da rezveratrol značajno smanjuje amplitudu i frekvenciju faznih kontrakcija izazvanih niskom dozom oksitocina (0.2 nM) sa srednjom efektivnom koncentracijom ( $EC_{50}$ ) 29  $\mu$ M i spontanih ritmičkih kontrakcija sa  $EC_{50}$  23  $\mu$ M. U studiji Hsia i sar. (2011) kontrakcije izazvane oksitocinom su bile manje osetljive na rezveratrol nego što je ovde pokazano, tako 100  $\mu$ M rezveratrola prouzrokovalo samo 40 % inhibicije kontrakcija. Uo čeno je da su tonične kontrakcije izazvane većom koncentracijom oksitocina (20 nM) tri puta manje osetljive na rezveratrol ( $EC_{50}$  je 87  $\mu$ M). Slično ovome, publikovano je da su fazne kontrakcije negravidnog uterusa miša izazvane malom koncentracijom oksitocina osetljivije na verapamil u odnosu na njihovu toničnu komponentu (Kawamata i sar., 2007). Naši nalazi su u skladu sa podacima dobijenim na eksperimentalnom modelu žuće kese zamorca gde je rezveratrol mnogo potentnije inhibirao fazne kontrakcije u odnosu na bazalnu tenziju (Wang i sar., 2008). Sa druge strane, ako posmatramo relaksaciju toničnih kontrakcija aorte i arterije mezenterike pacova rezveratrol je bio mnogo potentniji ( $EC_{50} = 10 \mu$ M, oba), ali osetljivost mamilarne arterije je bila slična kao u ovoj studiji ( $EC_{50} = 30 \mu$ M) (Novakovic i sar., 2006 a,b, Gojkovic-Bukarica i sar., 2008). Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da postoje određene razlike u osetljivosti na rezveratrol među tipovima kontrakcija, tkivima i vrstama. Ovaj zaključak je u skladu sa istraživanjima na modelu glatkih mišića žuće kese zamorca (Wang i sar., 2008).

Posebni doprinos je i to što se ispitivanja iz ove teze odnose na grupu porodilja iz programa *in vitro* fertilizacije (IVF), jer su neželjeni ishodi, kao prevremeni porođaj, mnogo češći i u ovoj populaciji u odnosu na porodilje sa spontanom graviditetom (Van Voorhis, 2007). Sagledavajući i dosad dostupnu literaturu može se reći da je ovo prva studija koja prikazuje inhibitorne efekte rezveratrola na kontraktilnost ljudske gravidne materice. Pokazano je da rezveratrol statistički značajno smanjuje amplitudu faznih kontrakcija izazvanih oksitocinom IVF gravidnog humanog miometrijuma. Osetljivost gravidnog humanog miometrijuma na rezveratrol bila je slična kao osetljivost faznih kontrakcija indukovanih oksitocinom kod

negravidnog uterusa pacova, ali i arterije *uterine* (Novakovi i sar., 2013, Naderali i sar., 2000). Postoje razlike izme u  $EC_{50}$  vrednosti rezveratrola dobijene ovde i  $EC_{50}$  vrednosti dobijene na modelima različitih vrsta humanih i pacovskih krvnih sudova (Novakovi i sar., 2006b, Gojkovi -Bukarica i sar., 2008, Nagaoka i sar., 2007) i glatkih mišića žužne kese (Wang i sar., 2008). Prikazana razlika u dobijenim rezultatima na različitim eksperimentalnim modelima sugerira tkivnu selektivnost rezveratrola.

Farmakološka analiza supstancama za koje se zna da imaju sposobnost otvaranja tj. aktiviranja, odnosno blokiranja kalijumskih kanala, pokazala je da su  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  i  $K_v$  kanali uključeni u dejstvo rezveratrola. Ranije je isto pokazano i na eksperimentalnim modelima krvnih sudova (Novakovi i sar., 2006, Gojkovic-Bukarica i sar., 2008, Nagaoka i sar., 2007). Takođe, uočeno je i parcijalno dejstvo rezveratrola nezavisno od kalijumskih kanala što je u skladu sa nalazima Hsia i sar., (2011). Poređenje sa sintetskim otvaračima kalijumskih kanala je ukazalo na razlike između njih i rezveratrola u farmakološkim osobinama, tako da se može reći da rezveratrol nije klasičan otvarač kalijumskih kanala.

Kada se razmatra ekspresija kalijumskih kanala u prisutnoj literaturi, uočeno je da su  $K_{ATP}$  i  $BK_{Ca}$  kanali prisutni u negravidnom i gravidnom humanom i animalom miometrijumu (Karl i sar., 2002, Chanrachakul i sar., 2003, Lovasz i sar., 2011). Podaci u literaturi o miometrijskim  $K_v$  kanalima su retki. Nedavno, pokazano je na animalnom modelu prisustvo proteina podjedinica koje formiraju poru  $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$ ,  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$ ,  $K_v1.5$ ,  $K_v1.6$ ,  $K_v4.2$  i  $K_v4.3$  kanala u miometrijumu miša. Za sada ne postoje nalazi molekularne ekspresije proteina  $K_v4.x$  kanala u glatkoj muskulaturi humane materice. Takođe, ovo je prva studija koja je pokazala prisustvo proteina  $K_v2.1$  podtipa  $K_v$  kanala i protein  $Kir6.1$  i  $Kir6.2$  subjedinica  $K_{ATP}$  kanala u tkivu negravidnog uterusa pacova.

Slična istraživanja sa naringeninom na glatko mišićnom tkivu uterusa, su retka. Zapravo, jedino je studija Hsia i sar. (2008) pokazala da ekstrakt biljke *Coix lachryma* koji se inače koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini za lečenje dismenoreje, sadrži naringenin koji utiče na inhibiciju kontrakcija negravidnog uterusa, kako je pokazano i u ovom radu.

## **D. Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

### Rad publikovan u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

1. **Novakovic R**, Ilic B, Beleslin-Cokic B, Radunovic N, Heinle H, Scepanovic R, Gojkovic-Bukarica L. The effect of resveratrol on contractility of non-pregnant rat uterus: the contribution of K(+)channels. J Physiol Pharmacol. 2013;64(6):795-805. (IF 2.72)

### Saopštenja sa skupa međunarodnog značaja štampana u celini (M33)

1. **Novakovic Radmila**, Protic Dragana, Radunovic Nebojsa, Heinle Helmut, Vladimir Kanjuh, Ida Leskosek-Cukalovic, Slobodan Jovic and Gojkovic-Bukarica Ljiljana. Resveratrol relaxes smooth muscles of rat uterus. Proceedings of 6th Central European Congress on Food, pp 2-3. 23-26 May 2012, Novi Sad, Serbia.

### Saopštenja sa skupa međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

1. **Novakovic Radmila**, Protic Dragana, Radunovic Nebojsa, Heinle Helmut, Cvejic Jelena, Gojkovic-Bukarica Ljiljana. Resveratrol Relaxes Smooth Muscles of Rat Uterus. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011; 109: 114-114.

2. **Novakovic R**, Protic D, Radunovic N, Kanjuh V, Gojkovic-Bukarica L. The relaxation of non-pregnant rat uterus by wine polyphenol resveratrol. Eur J Clin Invest 2012;42:86.

3. **Novakovic R**, Protic D, Radunovic NV, Heinle HH, Kanjuh VI, Gojkovic Bukarica LC. The wine polyphenol resveratrol relaxes smooth muscles of the non-pregnant rat uterus. 6th European Congress of Pharmacology - EPHAR 2012 Volume 10 - Issue 3

4. **Radmila Novakovi** , Dragana D Proti , Nebojša V Radunovi , Vladimir I Kanjuh, Ljiljana C Gojkovi -Bukarica. The relaxation of non-pregnant rat myometrium by resveratrol with participation of the NO–cGMP pathway. BMC Pharmacology and Toxicology 2012.

5. **Novakovic R**, Protic D, Radunovic N, Heinle H, Gojkovic-Bukarica L. The relaxation of non-pregnant rat uterus by wine polyphenol resveratrol. 6th Central European Congress on Food, May 23-26. 2012, Novi Sad, Serbia (abstract book pg 178).

6. **Novakovic Radmila B**, Beleslin-Cokic Bojana B, Ilic Bojana B, Radunovic Nebojsa V, Protic Dragana D, Hainle H, Scepanovic R, Gojkovic-Bukarica Ljiljana. Contribution of different K<sup>+</sup> channels in the effects of resveratrol on the phasic and tonic contractions of non-pregnant rat uterus. European journal of clinical investigation 2013;43:102-103. Portugalija April 17-20 Organizator: European Society for Clinical Investigation ESCI.
7. **Novakovic R**, Beleslin- oki B, Ili Bojana, Radunovi N, Proti D, Heinle H, Š epanovi R, Gojkovi -Bukarica L. The relaxation of pregnant human myometrium by natural polyphenol resveratrol. Humboldt-Kolleg, Resources of Danubian region: The possibility of cooperation and utilization, Belgrade, June 12-15, 2013, Book of abstracts, P71.
8. **Novakovic R**, Cirovic S, Markovic-Lipkovski J, Radunovic N, Heinle H, Gojkovic-Bukarica Lj. Polyphenol resveratrol relaxes pregnant human myometrium. European Journal of Clinical Investigation. 2014; 44:85-85. Organizator: European Society for Clinical Investigation ESCI.
9. **R. Novakovic**, B. Beleslin-Cokic, B. Ilic, N. Radunovic, H. Heinle, L. Gojkovic-Bukarica. Antiinflammatory polyphenol resveratrol has potential to be used in prevention and treatment of primary dysmenorrhea . Symposium on occasion of 30 years of “Blaubeuren Conferences” of the Tübingen Institute of Physiology with special participation from Danubian countries. Blaubeuren. April 4th-5th, 2014.

Saopštenja sa skupa nacionalnog zna aja štampana u izvodu (M62)

1. **Novakovi Radmila**, Proti Dragana, Radunovi Nebojsa, Heinle Helmut, Gojkovi -Bukarica Ljiljana, Vladimir Kanjuh. Rezveratrol relaksira glatke miši e uterusa pacova. 13. kongres farmakologa I 3. kongres klini ke farmakologije Srbije, sa me unarodnim u eš em. Pali , 05. - 08. oktobra 2011.
2. Novakovi R, Radunovi N, Markovi -Lipkovski J, irovi S, Heinle H, Gojkovi -Bukarica Lj. POLYPHENOL RESVERATROL RELAXES PREGNANT HUMAN MYOMETRIUM. Tre i kogres fiziologa Srbije sa me unarodnim u eš em. Abstract book: „Molecular, cellular and integrative basis of health, disease: transdisciplinary approach“. Beograd, Srbija. 29-31. Oct. 2014.

## **E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija **“Uticaj polifenola prirodnog porekla i sintetskih otvarača kalijumovih kanala na kontraktilnost izolovanog uterusa”** mr Radmile Novakovi predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizama dejstva rezveratrola i naringenina na kontraktilnost gravidnog i negravidnog uterusa, i uloge kalijumskih kanala u tim dejstvima. Takođe, pružene su jasne smernice za dalja istraživanja. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na zaključak da rezveratrol i naringenin imaju veliki potencijal da se koriste u prevenciji i tretmanu patološke i nepoželjne kontraktilnosti uterusa kao u slučaju dismenoreje i prevremenih porođaja.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, Komisija predlaže Naučnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj i uputi ga Vešću u naučnim oblastima medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije mr Radmile Novakovi .



U Beogradu, 02. 12. 2014.

Članovi Komisije:

Prof. dr Dragan Obradovi

---

Prof. dr Milica Bajeti

---

Naučni savetnik dr Melita Vidakovi

---

Mentor:

Prof. dr Ljiljana Gojković -Bukarica

---

Komentor:

Prof. dr Nebojša Radunović

---