

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 09.11.2017. godine, broj 5940/13, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Farmakološko dejstvo serotonina i adenzina na izolovanoj femoralnoj arteriji pacova u eksperimentalnim modelima dijabetesa i vaskularne okluzije“

kandidata asistenta dr Marka Stojanovića, zaposlenog na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Mentor je prof. dr Miroslav Radenković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dragan Obradović, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Sonja Vučković, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Slobodan Janković, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija asistenta dr Marka Stojanovića napisana je na 112 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 15 slika i 11 tabela. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** su pregledno izložena postojeća znanja o perifernoj arterijskoj bolesti (PAB), kao i postojeći trendovi u terapiji ovog oboljenja. Takođe, opisana je značajna, ali nedovoljno ispitana uloga serotonina u nastanku i razvoju periferne arterijske bolesti, kao i potencijalna uloga izmene serotoniniskog sistema u terapiji periferne arterijske bolesti. Pored serotonina prikazana je i funkcija adenzina, tačnije protektivno dejstvo na nivou vaskularnog sistema. koje ispoljava ovaj endogeni nukleozid, kao i potencijalna uloga koju bi manipulacija adenzinskog sistema imala u terapiji periferne arterijske bolesti.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju dejstva rastućih koncentracija serotonina i adenzina na prstenovima izolovane femoralne arterije zdravih, kao i pacova sa dijabetesom sa ili bez prethodne okluzije femoralne arterije. Kako endotel često ima značajnu ulogu u kontroli vaskularnog tonusa nakon primene različitih vazoaktivnih supstanci, dodatno je ispitana uloga endotela, kao i potencijalni razvoje endotelne disfunkcije (ED) tokom dijabetesa i/ili vaskularne okluzije. Pored efekata posredovanih endotelom i endotelne disfunkcije na vaskularna dejstva serotonina i adenzina, ispitana je i uloga jona kalcijuma u efektima nastalim nakon primene serotonina, odnosno jona kalijuma u dejstvima adenzina.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da su eksperimenti sprovedeni na pacovima, na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, a u skladu sa etičkim principima i smernicama za brigu o dobrobiti eksperimentalnih životinja. Eksperimentalni protokoli su odobreni od strane Ministarstva

poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, i u skladu su sa Zakonom o dobrobiti životinja u Republici Srbiji (dozvola broj 1500/05). Eksperimenti su urađeni u *in vitro* uslovima na mužjacima pacova soja *Wistar*, telesne mase 250-320 grama. Detaljno su opisani uslovi čuvanja laboratorijskih životinja, kao i procedure kojima su bile izložene laboratorijske životinje u cilju utilizacije eksperimentalnih modela dijabetesa i/ili vaskularne okluzije. Poglavlje sadrži i detaljno opisani postupak ekstrakcije krvnih sudova, kao i process registracije promena vaskularnog tonusa. Pored pomenutih procedura, u ovom poglavlju je prikazan i postupak uzimanja uzoraka krvi (seruma i plazme) od eksperimentalnih životinja, u cilju merenja markera endotelne disfunkcije ELISA metodološkim postupkom. Posebno poglavlje je posvećeno statističkoj obradi dobijenih podataka.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su narativnim i grafičkim postupcima opisani i jasno predstavljeni svi rezultati dobijeni tokom izrade ove doktorske disertacije.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja adekvatno koreliranih sa dobijenim rezultatima doktorske disertacije.

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

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 135 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Serotonin izaziva kontrakciju femoralne arterije, koja je zavisna od koncentracije serotoninina, a kod zdravih životinja i od prisustva očuvanog endotela. Zavisnost od endotela ne postoji u patološkim stanjima dijabetesa i/ili okluzije femoralne arterije. Metabolički produkti ciklooksigenaznog puta arahidonske kiseline nisu uključeni u kontraktilne efekte serotoninina na nivou femoralne arterije. Međutim, ovaj metabolički put ima protektivnu ulogu u sprečavanju prekomerne kontrakcije femoralne arterije serotoninom nakon okluzije ovih krvnih sudova. Deo kontrakcije uzrokovane serotoninom, koji zavisi od endotela, posredovan je angiotenzinom II, koji se oslobađa iz endotela pod dejstvom serotoninina. Ekstracelularni kalcijum je neophodan za

udeo kontrakcije femoralne arterije izazvane serotoninom, koji zavisi od endotela, ali samo u grupi zdravih životinja. Nakon odstranjivanja endotela, nifedipin (blokator L-tipa kalcijumskih kanala) značajno utiče na intracelularni protok jona kalcijuma, koji je detektovan u glatkim mišićima femoralne arterije tokom dejstva serotonina. Ove promene nastaju kod zdravih, kao i kod životinja sa dijabetesom, ali ne i nakon okluzije femoralne arterije. Uabain (blokator natrijum / kalijum ATPaze) menja unutarćelijski protok kalcijumovih jona, slično nifedipinu, sa tom razlikom što kod zdravih životinja endotel ne utiče na efekte uabaina, kao što je to pokazano sa nifedipinom. Istovremena primena nifedipina i uabaina redukuje kontrakciju femoralne arterije samo u grupi zdravih životinja, dok u ostalim grupama izostaju efekti na kontrakciju serotoninom, koji su detektovani tokom pojedinačne primene ovih blokatora.

Adenozin izaziva relaksaciju femoralne arterije, koja je zavisna od primenjene koncentracije korišćenog nukleozida. Endotel ima značajnu ulogu u procesu relaksacije femoralne arterije adenozinom u grupi zdravih životinja, kao i u grupi životinja u kojoj je dodatno izvršena okluzija femoralne arterije u periodu od 45 minuta. Joni kalijuma imaju bitnu ulogu u regulaciji procesa relaksacije femoralne arterije adenozinom, što je u najvećem stepenu zabeleženo kod dijabetičnih životinja sa očuvanim endotelom.

Eksperimentalni dijabetes izazvan aloksanom dovodi do nastanka endotelne disfunkcije u vremenskom periodu od 4 nedelje. Sprovedenim eksperimentima je utvrđeno da se dijabetes izazvan aloksanom u trajanju od 4 nedelje može koristiti kao validan eksperimentalni model endotelne disfunkcije izazvane hiperglikemijom. Dijabetes kratkog trajanja (4 nedelje) izazvan aloksanom značajno utiče na unutarćelijski protok jona kalcijuma u eksperimentalnom modelu izolovanih krvnih sudova.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Prethodno pomenuti rezultati ukazuju na to da serotonin može da izazove koncentracijski- i endotel-zavisnu kontrakciju femoralne arterije zdrave životinje. Ovi rezultati su u saglasnosti sa činjenicom da endotelne ćelije imaju sposobnost produkcije različitih vazokonstriktornih

supstanci, koje dalje mogu da kontrahuju glatke mišićne ćelije krvnih sudova (Radenković et al., 2013). Ovo nisu očekivani rezultati, ukoliko se uzme u obzir činjenica da endotel, mnogo češće, ima protektivnu ulogu, kojom ograničava kontraktilne efekte serotonina na nivou vaskularnog sistema (Datté et al. 2005; Ibarra et al. 2006), ili pak uopšte ne utiče na kontrakciju indukovanu serotoninom (Radenkovic et al. 2010).

Najverovatniji razlog za postojanje razlike u efektima serotonina na krvnim sudovima zdravih životinja sa endotelom i ostalih grupa/podgrupa, leži u činjenici da u ostalim grupama/podgrupama dolazi do razvoja endotelne disfunkcije. Ovo je i dodatno potvrđeno uključivanjem dodatne kontrolne grupe, kao i ispitivanjem pokazatelja ED u plazmi. Nikotin je poznat kao supstanca koja negativno utiče na endotelnu funkciju, a njegova primena kod eksperimentalnih životinja, tokom perioda od 4 nedelje, pokazala se kao dovoljna da izazove ED (Luo et al. 2006; Balakumar et al. 2008). Iz dobijenih rezultata jasno se vidi da su vrednosti vWF, jednog od markera ED bile povećane u grupama dijabetičnih, kao i nikotinom-tretiranih životinja, u odnosu na grupu zdravih životinja. Povišen nivo vWF je bio očekivan u grupi dijabetičnih životinja pošto se zna da u toku dijabetesa može doći do razvoja difuznih oštećenja endotela (Burger & Touyz, 2012).

S obzirom na to da produkti ciklooksigenaznog puta arahidonske kiseline ne učestvuju u endotelnom delu kontrakcije izazvane serotoninom, sledeći korak je bio usmeren ka ispitivanju potencijalne uloge angiotenzina II u ovom procesu. Za angiotenzin II se zna da ima vazokonstriktorno dejstvo, kao i da endotelne ćelije mogu da ga sintetišu (Radenkovic et al. 2016). Dobijeni rezultati, nakon inkubacije blokatora angiotenzinskih AT(1) receptora, ukazuju da je angiotenzin II endotelni produkt koji u našem ispitivanju doprinosi vaskularnim efektima serotonina, i to na krvnim sudovima zdravih životinja sa očuvanim slojem endotelnih ćelija. Ovo saznanje po svom značaju prevazilazi dosadašnja saznanja o efektima serotonina na nivou krvnih sudova u PAB, pre svega uzimajući u obzir činjenicu da serotonin potencira proliferaciju glatkih mišićnih ćelija izazvanu angiotenzinom II, a što je ujedno i jedan od ključnih procesa u razvoju ateroskleroze (Watanabe et al. 2001; Watanabe et al. 2001).

Kako bi se ispitao uticaj ekstracelularnog kalcijuma u efektima serotonina na nivou femoralne arterije, Krebs-Ringerov rastvor je zamenjen sa modifikovanim Krebs-Ringerovim rastvorom u kome nije bilo jona kalcijuma. Dobijeni rezultati govore u prilog tome da je

ekstracelularni kalcijum neophodan za endotel-zavisni deo serotoninске kontrakcije. Izostanak redukcije maksimalnog kontraktalnog efekta nakon zamene hranljivog rastvora u ostalim ispitivanim grupama/podgrupama govori u prilog učešća intracelularnog kalcijuma u procesu kontrakcije femoralne arterije. Ovi rezultati su takođe u skladu sa drugim studijama u kojima serotonin dovodi do kontrakcije krvnih sudova zahvaljujući oslobađanju intracelularnog kalcijuma (Wylam et al., 1993; Hu i Dyer, 1997; Sugai et al., 1999).

U daljem radu je dodatno evaluirano učešće ekstracelularnog kalcijuma u kontrakciji izazvanoj serotoninom, odnosno ispitivan je put ulaska kalcijuma u ćeliju. U grupi zdravih životinja sa očuvanim endotelom nifedipin nije doveo do redukcije kontrakcije femoralne arterije izazvane serotoninom, kao što je to bio slučaj nakon primene rastvora bez kalcijuma. Ovi rezultati ukazuju na to da kontrakcija izazvana angiotenzinom II, koga proizvode endotelne ćelije usled dejstva serotoninina, ne zavisi od L-tipa kalcijumskih kanala. Tačnije, kalcijum u ovom slučaju ulazi nekim drugim putem u glatke mišićne ćelije femoralne arterije. Nakon odstranjivanja endotela i dodavanja nifedipina, primećena je redukcija kontrakcija femoralne arterije indukovane serotoninom. Ovaj rezultat ukazuje da nifedipin utiče na intracelularni put kalcijuma u odsustvu endotelnog sloja ćelija. Iako ovo nije bio očekivani rezultat, poznata je činjenica da nifedipin može uticati na intracelularne depoe kalcijuma, kao i na oslobađanje kalcijuma iz njih (Raicu i Florea, 2001). Još izraženija redukcija je primećena u grupi dijabetičnih životinja u odnosu na grupu zdravih životinja nakon odstranjivanja endotela.

Uabain je u ovoj disertaciji korišćen sa idejom da blokira ulazak ekstracelularnog kalcijuma u ćeliju, pošto jedna od hipoteza o njegovom delovanju govori u prilog blokade natrijum / kalijum ATPaze, posle čega se višak kalcijuma zadržava u ćeliji (Hauck et al., 2012). Dobijeni rezultati ukazuju da uabain potencijalno utiče na glatke mišićne ćelije, ali i na endotel. Takođe, dobijeni rezultati nam govore da je nakon inkubacije uabaina, isto kao i nakon inkubacije nifedipina, došlo do promena u unutarćelijskom protoku jona kalcijuma. Ovakvi rezultati nisu neočekivani, ali se zna da uabain utiče i na druge puteve ulaska kalcijuma u glatke mišićne ćelije, kao i da tačan mehanizam dejstva uabaina nije u potpunosti poznat (Hauck et al., 2012).

Primena rastućih koncentracija adenozina uzrokovala je koncentracijski-zavisnu relaksaciju prekontrahovanih femoralnih arterija, i to u svim ispitivanim grupama/podgrupama. Relaksacija je bila zavisna od endotela, izuzev u grupi dijabetičnih životinja. U prethodnim studijama u kojima je ispitivano dejstvo adenozina na nivou aorte, donje mezenterične arterije i karotidne arterije, primećeno je da adenzin izaziva koncentracijski-zavisnu i endotel-nezavisnu relaksaciju ovih krvnih sudova (Grbović et al., 2003; Radenković et al., 2005; Radenković et al., 2013). Takođe, u eksperimentima na karotidnoj arteriji pacova, dijabetes nije doveo do funkcionalnih promena endotelnih ćelija, koje bi uticale na relaksantni odgovor prema adenzinu (Radenković et al., 2013). Nasuprot ovim rezultatima, rezultati na femoralnim krvnim sudovima pacova, koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, ukazuju da endotel ima značajnu ulogu u relaksantnom odgovoru prema adenzinu, kao i da tokom dijabetesa dolazi do funkcionalnih promena endotela ovog krvnog suda. Ovo je u skladu sa većim brojem studija, koje govore u prilog činjenice da se tokom dijabetesa dešavaju promene, koje utiču na efekte različitih endogenih supstanci sa vazodilatatornim dejstvom (Abebe, 2008; Fahim et al., 2001; Shi et al., 2006; Wigg et al., 2001; Yousif et al., 2005). Takođe, rezultati ove disertacije ukazuju da u prisustvu visoke koncentracije kalijumovih jona dolazi do skoro potpune blokade relaksacije femoralne arterije u svim ispitivanim grupama/podgrupama indukovane adenzinom. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u prethodnim studijama u kojima je ispitivan transmembranski protok kalijumovih jona (Radenković et al., 2013).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Stojanović M, Prostran M, Janković R, Radenković M. Clarification of serotonin-induced effects in peripheral artery disease observed through the femoral artery response in models of diabetes and vascular occlusion: The role of calcium ions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017;44:749–759.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Farmakološko dejstvo serotonina i adenzina na izolovanoj femoralnoj arteriji pacova u eksperimentalnim modelima dijabetesa i vaskularne okluzije**“ asistenta dr Marka Stojanovića predstavlja originalni naučni doprinos u ispitivanju periferne arterijske bolesti u eksperimentalnim modelima dijabetesa i/ili vaskularne okluzije. Rezultati disertacije jasno govore u prilog tome da farmakološkom modulacijom dejstva serotonina i adenzina potencijalno možemo uticati na popravljavanje poremećenih parametara vaskularne funkcije u perifernoj arterijskoj bolesti različite etiologije (npr. dijabetesa i/ili vaskularne stenozе/okluzije). Ovo bi ujedno mogao i da bude i jedan od mogućih pravaca u kojem bi mogao da se razvija budući farmakološki pristup u tretmanu periferne arterijske bolesti.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim opšte priznatim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja. 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, imenovana komisija sa zadovoljstvom predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju asistenta dr Marka Stojanovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beogradu, 03.01.2018. god.

Članovi Komisije:

Prof. dr Dragan Obradović, predsednik komisije

Prof. dr Sonja Vučković

Prof. dr Slobodan Janković

Mentor:

Prof. dr Miroslav Radenković
