

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

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03.11.2014. godine, broj 4600/11, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Efekti opioida i antagonista NMDA receptora na telesnu temperaturu i akutni
nociceptivni bol kod pacova “**

kandidata asistenta dr Katarine Savi Vujovi , 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 Dragan uri , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Miroslav Radenkovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Prof. dr Maja Tomi , profesor Farmaceutskog fakulteta u Beogradu
5. Prof. dr Dragan Milovanovi , 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 asistenta dr Katarine Savi Vujovi napisana je na 134 strane i podeljena je na sledeće poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 36 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korištenih u tekstu.

U **uvodu** je definisana uloga opioidnih analgetika i njihova klinička primena. Takođe je opisana uloga opioidnih i NMDA receptora u analgeziji, kao i u regulaciji telesne temperature. Prikazana je uloga ketamina i magnezijuma, kao NMDA antagonista u lečenju bola, kao i u regulaciji telesne temperature, kao i šta je u dosadašnjim studijama utraeno. Pokazano je da male doze NMDA antagonista, mogu povećati analgetički efekt opioida. Opioidi utiču i na telesnu temperaturu, a NMDA antagonisti je mogu menjati. U uvodu je opisana i hipotalamička regulacija telesne temperature, kao i uticaj adrenergičkog, serotonergičkog, gabaergetičkog, opioidergičkog sistema, azotnog oksida i ATP senzitivnih kanala za kalijum.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju i poređenju antinociceptivnih i hipertermičnih odgovora izmeću dve grupe agonista μ opioidnih receptora: derivata fentanila (4 anilinopiperidinski tip) i morfina (fenantrenski tip) kod pacova. Takođe, ova studija imala je za cilj ispitivanje efekata ketamina i magnezijum sulfata na telesnu temperaturu i akutni nociceptivni bol kod pacova, kao i da utvrdi tip interakcije izmeću dva leka i da ispita da li magnezijum sulfat dodat ketaminu ili kombinaciji morfin-ketamin, povećava analgetički efekt ovih lekova i njihov efekt na telesnu temperaturu. Još jedan od ciljeva bio je i ispitivanje mehanizma nastanka hipotermičnog dejstva ketamina, kao i ketamin-magnezijum sulfat kombinacije.

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 5057/2) i vodi em Internacionalnog udruženja za prou avanje bola (IASP).

Eksperimenti su ura eni na mužjacima pacova soja Wistar albino, mase 200-250 grama (Vivarijum Vojnomedicinske akademije u Beogradu). Opisan je eksperimentalni protokol izvo enja eksperimenata. Prvo je ra ena adaptacija životinja na eksperimentalne procedure. Nakon toga se pristupalo merenju kontrolnih vremena, a nakon davanja lekova ispitivana je antinocicepcija ili telesna temperatura. Za ispitivanje antinocicepcije, primenjivana je metoda potapanja repa pacova u toplu vodu (eng. *tail-immersion test*). Promene u telesnoj temperaturi pacova merene su pomo u sonde termometra koja je kroz anus uvla ena u kolon. Dejstvo na motornu aktivnost pacova registrovano je rotarod aparatom.

Precizno su navedeni na ini davanja ketamina, magnezijum sulfata, morfina i njihovih kombinacija, kako u ispitivanju antinocicepcije, tako i u ispitivanju telesne temperature. Detaljno je opisana i metodologija ispitivanja motorne koordinacije pacova, nakon davanja kombinacije morfin-ketamin-magnezijum sulfat.

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.

Zaklju ci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 200 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Istraživanje je pokazalo da fentanil, (\pm)-cis-3-metil fentanil, (\pm)-cis-3-karbometoksi fentanil, (\pm)-trans-3-karbometoksi fentanil i (\pm)-cis-3-butyl-fentanil, kao i morfin, oksikodon, tebakon i 6,14-etenomorfinan-7-metanol, 4,5-epoksi-6-fluoro-3-hidroksi-, ,17-trimetil-, (5,7) izazivali su dozno-zavisno pove anje antinocicepcije i hipertermije. Derivati morfina (fenantrenski tip) i fentanila (4-anilinopiperidinski tip) izazivali su hipertermiju kod pacova u

dozama koje su oko 2 puta niže, odnosno 6-11 puta više od njihovih srednjih antinociceptivnih doza.

Magnezijum sulfat (5 i 60 mg/kg, sc) nema uticaj ni na bazalnu telesnu temperaturu, ni na morfinsku hipertermiju. Subanestetičke doze ketamina (5-30 mg/kg), dovode do dozno-zavisnog sniženja bazalne telesne temperature, kao i morfinske hipertermije. Analizom krive doza-odgovor za efekte ketamina, kao i za kombinaciju ketamin-magnezijum sulfat, utvrđeno je da postoji sinergistička interakcija, kao i da se doza ketamina smanjuje za 5,3 puta, kada se lekovi daju u fiksnoj kombinaciji (1:1). Mala fiksna doza magnezijum sulfata (5 mg/kg) povećava sniženje bazalne temperature izazvano ketaminom (1,25-10 mg/kg) za 2,5 puta, kao i sniženje morfinske hipertermije za 5,3 puta.

Magnezijum sulfat (2,5-60 mg/kg, s.c.) i ketamin (2,5-30 mg/kg i.p.) primenjeni sami, nemaju nikakav antinociceptivni efekt. Postoji sinergistička interakcija između ketamina (2,5, 5 i 10 mg/kg) i magnezijum sulfata (5 mg/kg) u izazivanju antinocicepcije. Takođe i ketamin i magnezijum sulfat, kao i njihova kombinacija potenciraju antinociceptivne efekte morfina (2,6 mg/kg, i.p.). Veći efekt se postiže kada se ketamin primeni pre magnezijum sulfata.

Hipotermija koju izaziva ketamin, može se produbiti blokadom adrenergičkog (α_2 adrenergičkih receptora), serotonergičkog i opioidergičkog sistema, kao i blokadom ATP-senzitivnih K^+ kanala. U hipotermnom efektu ketamina ne učestvuju GABA-ergički, kao ni NO sistem.

U hipotermnom efektu kombinacije ketamin-magnezijum sulfat učestvuju i serotonergički sistem, ali ulogu ima i NO sistem. Hipotermija koju izaziva kombinacija ketamin-magnezijum sulfat, može se produbiti blokadom adrenergičkog sistema (blokadom α_2 adrenergičkih receptora). U hipotermnom efektu kombinacije ketamin-magnezijum sulfat ne učestvuju GABA-ergički ($GABA_A$ receptori), opioidergički sistem, kao ni ATP-senzitivni K^+ kanali.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Moglo bi se pretpostaviti da razlika u selektivnosti prema antinociceptivnom/temperaturnom odgovoru izme u opioidnih agonista derivata fentanila i morfina koja je otkrivena u ovom ispitivanju verovatno odražava različit afinitet i efikasnost agonista za različite podtipove opioidnih receptora (Yang i sar., 1992). Pre nekoliko decenija su rađene studije vezivanja i farmakološke studije podtipova opioidnih receptora, mada njihov značaj u pogledu termoregulacije nije bio u potpunosti proučen. Međutim, kako eliminacija jednog jedinog gena koji kodira μ -opioidne receptore dovodi do prestanka funkcije μ -receptora (kako analgezije, tako i depresije disanja), dalja klasifikacija podtipova opioidnih receptora nema smisla (Dietis i sar., 2011). Dalja ispitivanja sa eliminacijom gena kod miševa ukazuju na to da su različiti efekti agonista μ -opioidnih receptora posredovani posebnim intracelularnim signalnim putevima (Davis, 2012). Standardni agonisti i antagonisti aktiviraju ili inaktiviraju celokupnu mrežu prenošenja signala receptora. Međutim, „pristrasni” ligandi selektivno aktiviraju neke signale, izbegavaju i, ili čak inaktiviraju i druge signale posredovane istim receptorom (Rives i sar., 2012; Rivero i sar., 2012; Nozaki i sar., 2012; Pradhan i sar., 2012). Na primer, morfin pre aktivira puteve posredovane beta-arestinom 2 *in vivo*, dok fentanil i metadon mogu da aktiviraju prenošenje signala posredovano i beta-arestinom 1 i beta-arestinom 2 (Groer i sar., 2011). U tom pogledu, velika antinociceptivna i mala hipertermna jačina tj. veća selektivnost ka antinocicepciji, derivata fentanila u odnosu na morfin, otkrivena u ovom ispitivanju, može da predstavlja „pristrasni” agonizam prema μ -opioidnim receptorima.

Takođe je dokazan sinergizam izme u ketamina i magnezijum sulfata, NMDA antagonista, u modelu akutne termičke nocicepcije kod pacova. Po prvi put je dokazano da efekt kombinacije ketamin-magnezijum sulfat zavisi od redosleda primene leka; veći antinociceptivni efekt se dobija kada se ketamin primeni pre magnezijum sulfata nego kada se primeni posle. Naši rezultati su u skladu sa prethodnim studijama (McCartney i sar., 2004; Nechifor i sar., 2011). Nasuprot našim rezultatima, Gupta (2011) je pokazao da magnezijum sulfat (5 mg/kg), primenjen sam izaziva prolazno povećanje latence u *tail flick* testu kod miševa. Ove razlike su verovatno posledica korišćenja različitih testova za termičku

nocicepciju (*tail-flick vs. tail immersion test*) kao i razlike između vrste životinja koje su korišćene u eksperimentima.

Prema dostupnim literaturnim podacima, NMDA receptori imaju ulogu u akutnoj antinocicepciji izazvanoj morfinom. Lečenje opioidima dovodi do povećanja protein kinaze C (PKC) koja aktivira NMDA receptore i na taj način redukuje antinociceptivni efekt opioida (Mao, 1999). U eksperimentalnim modelima na životinjama pokazano je da dodavanje NMDA antagonista morfinu, može povećati efekte morfina u modelima termičke nocicepcije na životinjama (Allen i sar., 2003; Nemmani i sar., 2004; Fischer i sar., 2005; Grisel i sar., 2005). Postavlja se pitanje da li je razlika između naših rezultata i prethodnih studija, posledica primene različitih doza i redosleda primene ketamina i magnezijum sulfata. Naši rezultati mogu delimično objasniti zašto su prethodne studije, koje su proučavale kombinaciju ketamina i magnezijuma imale neusaglašene rezultate.

Magnezijum je nekompetitivni antagonist NMDA receptora koji blokira jonski kanal (Fawcett i sar., 1999), dok se ketamin vezuje nekompetitivno za fenciklidinsko mesto NMDA receptora (Øye i sar., 1992), blokira otvaranje kanala i smanjuje frekvencu otvaranja kanala alosteričkim mehanizmom (Orser i sar., 1997a). Kako ketamin i magnezijum blokiraju NMDA receptor različitim mehanizmima, nije iznenađujuće da postoji sinergizam između ova dva leka (Øye i saradnici, 1992). Farmakokinetska interakcija između ovih lekova izgleda manje moguća, jer nisu zabeležene farmakokinetske interakcije između sistemski datog magnezijuma i drugih lekova. Efekt ketamina na telesnu temperaturu dobijen u ovoj studiji u skladu je sa prethodnim eksperimentima (Fahim i sar., 1973; Pitsikas i Boultadakis, 2009). Kod životinja, drugi NMDA antagonisti kao što su MK-801, dekstrometorfan i LY 235959 daju blagu, ali značajnu hipotermiju, ukazuju na ulogu endogenog glutamatergičkog sistema koji dovodi do hipertermije aktivacijom NMDA receptora (Corbett i sar., 1990; Rawls i sar., 2002). Shodno činjenici da ketamin pri subanestetičkim dozama blokira NMDA receptore (Øye i sar., 1992), mehanizam kojim ketamin dovodi do hipotermije može se pripisati, bar delimično, blokadi NMDA receptora. Ketamin takođe stupa u interakcije sa kalcijumskim i natrijumskim kanalima, dopaminskim receptorima, kao i sa ponovnim preuzimanjem noradrenalina i serotonina. Takođe ketamin utiče na holinergičku transmisiju (Quibell i sar.,

2011). Dobro je poznato da agonisti μ -opioidnih receptora dovode do dozno-zavisne hipertermije (Vučković i sar., 1998; Vučković i sar., 2009; Savić Vujović i sar., 2013). Morfin u dozi 10 mg/kg dovodi do hipertermije i izaziva nishodnu regulaciju podjedinice iRNA, NMDA receptora u hipotalamusu, glavnog termoregulatornog centra u mozgu (Le Greves i sar., 1998). *In vivo* studija mikrodijalize je pokazala da akutni tretman morfinom povećava nivo glutamata u striatumu, strukturi koja ima indirektnu ulogu u termoregulaciji (Huang i sar., 1997). Ovi rezultati ukazuju da je morfinska hipertermija delimično posredovana povećanjem glutamatergičke transmisije preko NMDA receptora koji se nalaze u regionima mozga koji regulišu telesnu temperaturu.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Savić Vujović KR, Vučković S, Srebro D, Ivanović M, Došen-Milović Lj, Vučković C, Džoljić E, Prostran M. A comparison of the antinociceptive and temperature responses to morphine and fentanyl derivatives in rats. *Arch Pharm Res* 2013; 36:501-8.
2. Vučković S, Savić Vujović K, Srebro D, Medić B, Vučković , Prostran M, Prostran M. Synergistic interaction between ketamine and magnesium in lowering body temperature in rats. *Physiol Behav* 2014; 127:45-53.
3. Savić Vujović K, Vučković S, Srebro D, Medić B, Stojanović R, Vučković , Prostran M. A synergistic interaction between magnesium sulphate and ketamine on the inhibition of acute nociception in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. (prihvaćen za štampu 14.11.2014.)

E) Zaključak (obrazloženje naučnih doprinosa)

Doktorska disertacija „**Efekte opioida i antagonista NMDA receptora na telesnu temperaturu i akutni nociceptivni bol kod pacova**“ dr Katarine Savić Vujović predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uloge opioida i NMDA antagonista u analgeziji i regulaciji telesne temperature. Ovo je prvo ispitivanje kojim je pokazana razlika između dve klase opioidnih lekova u jačini izazivanja hipertermije. U ovoj studiji je pokazano da magnezijum sulfat potencira analgetički efekt ketamina i morfin-ketamin kombinacije kod

pacova u testu akutnog bola kod pacova, a veći efekt se postiže kada se ketamin primeni pre magnezijum sulfata. Ovo je prva studija kojom je pokazana sinergistička interakcija između magnezijum sulfata i ketamina u snižavanju telesne temperature i antinocicepciji, kao i statistička potvrda iste. Takođe, u ovoj studiji je objašnjen i mehanizam hipotermnog dejstva ketamina, kao i ketamin-magnezijum sulfat kombinacije. Moguće je da bi sinergizam između ketamina i magnezijum sulfata mogao biti od kliničkog značaja.

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 doktorsku disertaciju dr Katarine Savić Vujović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 21.11.2014.

lanovi Komisije:

Prof. dr Milica Prostran

Prof. dr Dragan uri

Prof. dr Miroslav Radenkovi

Prof. dr Maja Tomi

Prof. dr Dragan Milovanovi

Mentor:

Prof. dr Sonja Vu kovi
