

**NAUČNO-NASTAVNOM VEĆU
HEMIJSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 11. decembra 2014. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Ane M. Mijušković, mastera biohemičara, pod naslovom:

“Mehanizmi relaksantnog efekta natrijum-sulfida na uterus pacova *in vitro*: efektorne vrste i ciljne molekulske strukture”

Komisija je pregledala doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija Ane M. Mijušković podeljena je na osam poglavlja: Uvod (3 strane); Pregled literature (40 strana) Cilj (2 strane); Materijal i metode (26 strana); Rezultati (52 strane); Diskusija (19 strana); Zaključci (2 strane); Literatura (16 strana); Prilozi (5 strana). Ilustrovan je sa jednom slikom u Uvodu, 26 slika u poglavlju Pregled literature, 4 slike i 5 tabela u poglavlju Materijal i metode, 77 slika u poglavlju Rezultati i sadrži 288 citiranih bibliografskih jedinica. Pored navedenog, disertacija sadrži Izvod na srpskom i engleskom jeziku, Sadržaj, Listu skraćenica i akronima i Biografiju kandidata.

U poglavlju Pregled literature kandidatkinja je kroz tri celine dala pregled literature koja jasno podržava problematiku doktorske disertacije. Istaknute su biohemijske osnove kontraktilnosti, sa posebnim osvrtom na ulogu jonskih kanala. Dalje su u Uvodu objašnjene osnove redoks-regulacije i antioksidativne odbrane i veza sa kontraktilnošću. Prikazana je hemija i biohemija vodonik-sulfida i jasno je istaknuta hijerarhija njegovih bioloških odgovora koja je određena njegovom specifičnom hemijskom prirodom. Integracija ove tri celine je istaknuta u **Cilju** gde su navedeni imperativi doktorske disertacije koji se odnose na: karakterizaciju efekata sulfida na kontraktilnost uterusa, identifikaciju realnih vrsti kojim relaksira kontrakcije uterusa, kao i meta koje posreduju u ovim efektima. U poglavlju **Materijal i metode**, detaljno su opisani svi eksperimenti i eksperimentalni uslovi koji su korišćeni u radu i koji obezbeđuju informacije za lako reprodukovanje rada i nastavak istraživanja u ovoj oblasti.

U okviru poglavlja **Rezultati i Diskusija** jasno su prikazani rezultati disertacije na način koji prati ciljeve istaknute u drugom poglavlju. Rezultati su prikazani kroz devet celina. Prvih pet celina prikazuju rezultate na izolovanom organu uterusa *in vitro*: efekti sulfida na kontraktilnost različito aktiviranih uterusa, karakterizacija efekta (dozno zavisne krive), poređenje efekata sulfida sa efektima njegovih bioloških prekursora (cisteina i homocisteina) (prva celina); poređenje efekata natrijum-sulfida sa efektima metantiola – uloga tiolatnog anjona (druga celina); identifikacija posrednika relaksacije – moguće učešće polisulfida i modulatorna uloga azot(II)-oksida (treća celina); ispitivanje mehanizma kojim sulfid dovodi do relaksacije (učesće jonskih kanala i sekundarnih glasnika) (četvrta celina); efekti sulfida i ATB-346 na kontrakcije humanog miometrijuma (peta celina). Prisustvo bestrofina koji su identifikovani kao posrednici u relaksantnom efektu sulfida identifikovani su na proteinskom (šesta celina) i genskom nivou (sedma celina), kao i imunohistohemijski (osma celina). U devetoj celini su prikazani rezultati

ispitivanja redoks-osetljivosti relaksantnog efekta sulfida na uterus. Rezultati su obrazloženi u diskusiji i upoređeni sa podacima iz literature.

U okviru poglavlja **Zaključci** ukratko su izloženi dobijeni rezultati i iznet je njihov značaj.

Literatura sadrži 288 literaturnih navoda prema abecednom redosledu prezimena autora.

U okviru Prilozi data su dva publikovana rada iz ove disertacije u kojima je kandidat prvi i koresponding autor .

B. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Poslednja dekada istraživanja omogućila je razumevanje uloge gasovitih transmitera i istakla njihovu važnost kao signalnih molekula koji su od bitnog značaja za regulaciju brojnih biohemijskih procesa. Među gasovitim transmitterima najnoviji tako klasifikovan je vodonik-sulfid. Studije koje su ispitivale efekte vodonik-sulfida (egzogeni aplikacija, regulisanje endogenih nivoa, *knock-out* studije i drugo) nedvosmisleno su pokazale da je on važan regulator brojnih fizioloških funkcija. Između ostalog, pokazao se kao potentan relaksant glatkih mišića – vaskularnih i nevasularnih. Sa druge strane, neregularna kontraktilnost netrudnog uterusa je povezana sa brojnim neželjenim stanjima, od nemogućnosti začeća do dismenoreje i endometriozе. Istraživanja u svetu su usmerena ka razumevanju fiziologije uterusa – čime je i kako kontrolisana, kao i na razvoj agensa koji bi ciljano uticao na kontrakcije uterusa. Najvažniji cilj je razvoj agenasa (tokolitika) koji mogu biti upotrebljeni za sprečavanje prevremenog porođaja što je postao prepoznatljiv problem koji je doveo do otvaranja specijalizovanih ustanova koje se samo time bave.

Vodonik-sulfid (H_2S), predstavlja agens velikog potencijala, budući da su dosadašnje studije pokazale da relaksira netrudni ali i gravidni uterus. Međutim, mehanističke studije kojima bi se identifikovale glavne mete njegovog relaksantnog efekta na uterusu nisu urađene. Takođe, u literaturi se pod " H_2S " podrazumevaju sve vrste koje na fiziološkom pH postoje (od kojih su najzastupljeniji: H_2S i HS^-). Do sada u literaturi nije bilo studija koje su identifikovale značaj svake od vrsti ponaosob u ostvarivanju efekata " H_2S ".

U diskusiji je istaknuta signalna uloga sulfida, sa posebnim osvrtom na njegovu ulogu u uterusu. Takođe dat je osvrt na hemiju sulfida, koja je od suštinskog značaja za razumevanje mehanizama kojim sulfid dovodi do relaksacije uterusa, budući da su reduktivna i nukleofilna svojstva H_2S/HS^- glavne odrednice u određivanju njihovih bioloških ciljeva. Imajući u vidu različitu hemijsku prirodu H_2S i HS^- , logično je očekivati da oni moraju imati drugačije mete i mehanizme delovanja. U ovoj disertaciji je primenjen nov način analize efekata " H_2S ", poređenjem sa efektima CH_3SH . Kako se H_2S i HS^- ne mogu razdvojiti (jer su predmet kiselo-bazne ravnoteže), CH_3SH ovde je poslužio kao "imitator" efekata H_2S (pošto su u uslovima pri fiziološkom pH rastvora oba u molekulskom obliku) i pomogao u razlikovanju efekata H_2S i HS^- . Takođe, ovi rezultati su obezbedili uvid u efekte samog CH_3SH , koji u *in vivo* uslovima nastaje metilacijom H_2S , te je i predloženo da se metilacija može sa biohemijskog stanovišta posmatrati iz novog ugla – kao načina modulacije efekata " H_2S ".

Natrijum-sulfidom izazvano smanjenje amplituda, ali i frekvencija kontrakcija uterusa na revezibilan način, ne razlikujući poreklo nastanka istih, uputilo je na ulogu pejsmejker mehanizma koji je esencijalan za nastanak kontrakcija. Ovi rezultati su ohrabрили naredne korake istraživanja – ispitivanje meta relaksacije sa posebnim osvrtom na jonske kanale za koje se zna da su važni konstituenti pejsmejker mehanizma, ali i kontraktilnosti uopšte. S druge strane, važno je istaći da jonski kanali predstavljaju jednu od zajedničkih meta za sve gasovite transmitere. U ovoj disertaciji je ispitano učešće kanala iz tri grupe kanala (K^+ , Cl^- , Ca^{2+}) kao posrednika sulfidom izazvane relaksacije. Do sada su K_{ATP} kanali bili identifikovani kao glavni posrednici u relaksantom efektu sulfida (većina ovih studija je urađena na vaskularnim glatkim mišićima). Rezultati ove disertacije ukazuju na to da efekat sulfida na uterus nije posredovan K^+ kanalima, već DIDS-osetljivim hloridnim kanalom, budući da je DIDS jedini od serije testiranih

inhibitora uspeo da inhibira relaksaciju izazvanu sulfidom. Oslanjajući se na literaturne podatke u kojima je DIDS identifikovan kao modulator bestrofina (BEST, Ca^{2+} -aktivirani hloridni kanal), upravo su ovi kanali istaknuti kao važne mete u signalingu sulfida. Iako se u literaturi pominje značaj Ca^{2+} -aktiviranih hloridnih kanala kao važnih regulatora kontraktilnosti uterusa, o ulozi bestrofina nema podataka. U okviru ove disertacije prvi put je pokazano da je bestrofin eksprimiran u uterusu pacova na nivou mRNA, i na proteinskom nivou, što ukazuje da oni imaju ulogu u regulaciji kontrakcija. Imunohistohemijska analiza pokazala je da su bestrofini predominantno subcelularno lokalizovani u longitudinalnom i cirkularnom mišićnom sloju uterusa. Takođe, ovo dodatno osnažuje tezu da je sulfidom izazvana relaksacija uterusa posredovana bestrofinima. Važnost Cl^- -zavisnog mehanizma u relaksirajućem efektu sulfida pokazana je i na kontrakcijama izazvanim sa KCl, budući da je potentniji efekat uočen na faznim u odnosu na tonične kontrakcije, što može biti posledica poremećenog gradijenta Cl^- jona i interference sa HS^- . Ove razlike mogu biti posledica i učešća K^+ kanala, ali su efekti njihovih inhibitora potvrdili njihovu ograničenu ulogu u ostvarivanju efekta sulfida. Kako je poreklo toničnih kontrakcija vezano za povećanu aktivnost L-tipa kalcijumskih kanala, eksperimenti su bili dizajnirani tako da ispituju i učešće ovih kanala u efektima sulfida i pokazano je da oni nisu direktni posrednici u relaksaciji uzrokovanj sulfidima. Međutim, kandidatkinja je dala osvrt na vezu bestrofina i L-tipa kalcijumskih kanala, budući da se u literaturi navode podaci o njihovoj ko-ekspresiji i ulozi bestrofina kao regulatora L-tipa kanala.

U literaturi su polisulfidi istaknuti kao važni medijatori sulfidnog signalinga. Njihovi efekti na uterus nisu ispitivani. Takođe, poznate su kompleksne biohemijske interekcije između $\bullet\text{NO}$ i " H_2S ". S tim u vezi, u okviru disertacije je ispitano da li je efekat sulfida moduliran prisustvom polisulfida, odnosno $\bullet\text{NO}$. Pokazano je da polisulfidi nisu važni za efekte sulfida, ali se $\bullet\text{NO}$ pokazao kao potentan inhibitor relaksantnog efekta sulfida. Ovaj deo disertacije kandidatkinja je uradila na Univerzitetu u Bratislavi, u grupi dr Ondrijasa. Njen šestomesečni boravak je podržan dvema stipendijama: SAIA (Slovačka akademija nauka, Institut za molekularnu fiziologiju) kao i COST BM1005 (Gasotransmitters: from basic science to therapeutic applications (ENOG: European Network on Gasotransmitters)).

Dobro je poznato da su relaksantni efekti u uterusu posredovani i promenom količine cAMP i cGMP. Rezultati kandidatkinje ukazuju da promena količine ovih drugih glasnika nije presudna za relaksaciju uterusa izazvanu sulfidom. U okviru ove disertacije ispitivana je redoks-osetljivost efekata sulfida. Poznato je da reaktivne vrste kiseonika (ROS) mogu modulirati kontraktilnost na više načina. Efekti ROS na jonske kanale mogu biti jedan od načina kojima moduliraju kontraktilnost. U literaturi postoje podaci o hemijskim interakcijama između " H_2S " i ROS, ali važnost ovih interakcija u regulisanju kontraktilnosti uterusa, kao modela izuzetne fiziološke relevantnosti, nije ispitivana. Takođe "crosstalk" između gasovitih transmitera (primarnih glasnika), sekundarnih glasnika: cAMP i cGMP i ROS, ističe se kao važan u signalnim mrežama i jedan je od fundamentalnih mehanizama za aktivnost gasovitih transmitera. S tim u vezi, u okviru ove disertacije praćeni su efekti sulfida (sa i bez modulatora) na kontrakcije uterusa paralelno sa efektima na aktivnost antioksidativnih enzima. Relaksacija izazvana vodonik-sulfidom je redoks-osetljiva, budući vodonik-sulfid modulira aktivnost glavnih antioksidativnih enzima. Ovo može biti od velikog značaj posebno u uslovima kada je uterus izložen promenama u redoks-ravnoteži, što može dovesti do poremaćaja u kontraktilnosti.

Ovi rezultati, koji su dali uvid u mehanizme kojima sulfid modulira kontraktilnost uterusa kod pacova, ohrabрили su naredne korake istraživanja efekata sulfida (kroz primenu različitih donora sulfida) na humanom miometriju. Ovaj deo disertacije kandidatkinja je uradila na Univerzitetu u Liverpoolu, u grupi profesora Wray (FMedSci, FRCOG, MAE), direktorom centra za prevremene porođaje u Liverpoolu. Projekat je podržan od FEBS-a (The Federation of European Biochemical Societies) koji je obezbedio kandidatkinji tromesečnu stipendiju (Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe). Kandidat je pokazao da su BEST kanali prisutni i relevantni i za humani uterus. Poređeni su efekti sulfida sa efektima ATB-346, takođe donora " H_2S ", ali koji je dizajniran za tretman inflamatornih stanja. Do sada je ATB-346 ispitivan na različitim modelima inflamacije, ali ne i njegov relaksantni potencijal. Imajući u vidu

njegovu strukturu, koja se sastoji od dve farmakofore koji dovode do relaksacije: naproksena (pokazano tokolitičko dejstvo u literaturi) i HTB (koji otpušta "H₂S"), bilo je od interesa ispitati njegov efekat na kontraktlnost. Dobijeni rezultati se čine vrlo obećavajućim, posebno ukoliko se ima u vidu da prevremeni porođaji, nastali usled preuranjenih prejakih kontrakcija, mogu biti indukovani događajima posredovanim inflamacijama.

Inventivnost ove disertacije, u odnosu na postojeću literaturu, proizilazi iz jedinstvenog eksperimentalnog dizajna koji se oslanja na integrisanje važnih teorijskih aspekata: biohemijske farmakologije sulfida sa potencijalnim metama: jonskim kanalima i sekundarnim glasnicima u redoks miljeu. Pokazani mehanizmi relaksacije na uterusu pacova, zajedno sa ispitivanim efektima sulfida na humanom miometrijum, obezbeđuju osnovu za dalja ispitivanja, dizajn budućih *in vivo* studija i razvoj adekvatnog terapeutika.

C. Objavljeni rezultati koji čine deo disertacije:

(i) Objavljeni radovi:

(koji su u celini deo ove teze)

Mijuskovic A, Orescanin-Dusic Z, Nikolic-Kokic A, Slavic M, Spasic MB, Blagojevic D (2015) Chloride channels mediate sodium sulphide-induced relaxation in rat uteri. *Br J Pharmacol* 172, 3671-3686. (IF= 4,842) (M21)

Mijuskovic A, Orescanin-Dusic Z, Nikolic-Kokic A, Slavic M, Spasic MB, Spasojevic I, Blagojevic D (2014) Comparison of the effects of methanethiol and sodium sulphide on uterine contractile activity. *Pharmacol Rep* 66, 373-379. (IF=1,928) (M23)

(u kojima su objavljeni neki rezultati iz disertacije kao deo drugih saradnji i usmerenih istraživanja)

Berenyiova A, Grman M, **Mijuskovic A**, Stasko A, Misak A, Nagy P, Ondriasova E, Cacanyiova S, Brezova V, Feelisch M, Ondrias K (2015) The reaction products of sulfide and S-nitrosoglutathione are potent vasorelaxants. *Nitric Oxide* 46, 123-130. (IF=3,521) (M22)

(ii) Saopštenja:

Mijuskovic A, Tatalovic N, Orescanin-Dusic Z, Nikolic-Kokic A, Spasic M, Blagojevic D (2015). BEST channels-possible mediators of H₂S induced relaxation of rat uteri? FEBS 3+ Meeting: Molecules of life. Portoroz, Slovenia. Abstract book with final program, PI 68 – *poster presentation*.

Mijuskovic A, Tatalovic N, Orescanin-Dusic Z, Nikolic-Kokic A, Spasic M, Blagojevic D (2015) Hydrogen sulphide mediated uterine relaxation is not altered by elevated homocysteine. *Nitric Oxide* 47, S33-S33. Athens, Greece. (Meeting abstract) – *poster presentation*.

Mijuskovic A, Nikolic-Kokic A, Slavic M, Orescanin-Dusic Z, Nestorov J, Spasic M, Blagojevic D (2014) Sodium sulphide effects on antioxidant enzyme activities in rat ovaries and uteri. 3rd congress of physiological sciences of serbia with international participation, Belgrade, Serbia. Abstract book with final program, p 13 – *oral presentation*.

Mijuskovic A, Oreščanin-Dušić Z, Nikolić-Kokić A, Slavić M, Spasić M, Spasojević I, Blagojević D (2014) Sodium sulphide relaxation of rat uterus is related to calcium signaling. *Nitric Oxide* 39, S36-S37 (Meeting abstract) – *poster presentation*.

Mijuskovic A, Oreščanin-Dušić Z, Nikolić Kokić A, Slavić M, Milovanović S, Blagojvić D, Spasić MB (2013) An investigation of the mechanism of hydrogen sulphide uterine relaxation. *FEBS J* 280, 185. St Petersburg, Russia. (Meeting abstract) – *poster presentation*.

Mijuskovic A, Nikolic-Kokic A, Slavic M, Orescanin-Dusic Z, Spasic M, Blagojevic D (2013) Sodium sulphide preconditioning increased antioxidant capacity in the rat heart: possible beneficial effects. Joint meeting of national physiological societies "New frontiers in physiological research-from scientific truth via friendship to the art" Kovačica, Vojvodina, Serbia, 2013. Abstract book with final program, p 85 – *oral presentation*.

D. Zaključak

U ovoj disertaciji okarakterisana je relaksacija uterusa pacova izazvana sulfidom i ispitani mehanizmi (jonski kanali i sekundarni glasnici) koji mogu biti posrednici u relaksantnom efektu sulfida. Takođe, ispitan je efekat sulfida na redoks-homeostazu, što može biti posebno važno u stanjima kada je uterus izložen oksidativnom disbalansu. Identifikovane su molekulske strukture u uterusu (BEST kanali) kao i vrste koje posreduju, odnosno moduliraju relaksantni efekat sulfida. Značajan doprinos ove disertacije su rezultati dobijeni na humanom miometriju, koji zajedno sa izučnim fundamentalnim mehanizmima relaksacije izazvane sulfidom na uterusu pacova, obezbeđuju platformu za razvoj adekvatnog terapeuta za probleme povezane sa disfunkcionalnom kontraktilnošću.

Rezultati istraživanja, proistekli iz ove doktorske disertacije, objavljeni su u tri rada: jedan u vrhunskom međunarodnom časopisu (prvo-autorski), jedan u vodećem međunarodnom časopisu (ko-autorski) i jedan u međunarodnom časopisu (prvo-autorski).

Stoga predlažemo Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da podnetu doktorsku disertaciju Ane M. Mijušković pod naslovom "**Mehanizmi relaksantnog efekta natrijum-sulfida na uterus pacova *in vitro*: efektorne vrste i ciljne molekulske strukture**" prihvati i odobri njenu odbranu za sticanje akademskog zvanja doktora biohemijjskih nauka.

U Beogradu, 09. oktobar 2015. g.

Komisija:

Dr Ljuba Mandić, mentor
redovni profesor
Hemijski fakultet

Dr Mihajlo B. Spasić, mentor
redovni profesor, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Dr Milan Nikolić, član
docent
Hemijski fakultet