

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 18.4.2019. godine, broj 9700/03-TVU, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Efekat ibogaina na sistem antioksidativne zaštite u perifernim tkivima i kontraktilnost terminalnog ileuma kod mužjaka pacova“**

kandidata Teodore Vidonja Uzelac, zaposlene u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu. Mentor je naučni savetnik dr Duško Blagojević, a komentor prof dr Milica Bajčetić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof.dr Tatjana Simić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc.dr Janko Samardžić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Doc.dr Dragana Protić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. VNS dr Zorana Oreščanin Dušić, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu
5. Prof.dr Danijela Kojić, profesor PMF u Novom Sadu

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 Teodore Vidonja Uzelac napisana je na ukupno 109 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, cilj, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi 1 tabela i 42 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je opisana farmakokinetika i farmakodinamika ibogaina, kao i njegov efekat na enzime antioksidativne zaštite i energetske homeostazu *in vitro* i *in vivo*. Naveden je mehanizam delovanja sistema antioksidativne zaštite i pojedinačno je opisana struktura i mehanizam delovanja za svaki enzim: superoksid dismutaza 1 i 2 (SOD1 i SOD2), katalaze (KAT), glutation peroksidaze (GSH-Px), glutation reduktaza (GR), glutation S transferaza (GST).

Opisana je građa ileuma kao i mehanizam kontrakcije glatkih mišića. Posebno su opisani jonski kanali sa detaljnim osvrtom na strukturu i funkcionisanje kalijumovih kanala i to voltažno zavisnih ( $K_v$ ), kalcijum zavisnih ( $K_{Ca}$ ) i ATP zavisnih ( $K_{ATP}$ ) kalijumovih kanala.

**Ciljevi** rada su jasno definisani u dve tačke. Prvi je prikazivanje efekata ibogaina na sistem antioksidativne zaštite u perifernim tkivima nakon *in vivo* tretmana i na kontraktilnost terminalnog ileuma nakon *ex vivo* tretmana. Kao drugi cilj je navedeno utvrđivanje uloge različitih tipova kalijumovih kanala u efektu ibogaina na kontraktilnu aktivnost izolovanog terminalnog ileuma pacova kao model sistema, i molekularni mehanizmi regulacije redoks ravnoteže koji ove efekte prate.

U poglavlju **materijal i metode** detaljno je opisan dizajn *in vivo* i *ex vivo* eksperimenta. U *in vivo* eksperimentu korišćene su jednokratno *per os* doze ibogaina (1 i 20 mg/kg telesne mase) i mereni parametri nakon 6 i 24 h u tkivima (jetra, bubrezi, srce, ileum, eritrociti, pluća, slezina i testisi). U *ex vivo* eksperimentu korišćene su rastuće koncentracije ibogaina i blokatori kalijumovih kanala kao pretretmani (glibenklamid, tetraetil amonijum i 4-aminopiridin). Detaljno su opisane metode izolovanja i pripreme tkiva za biohemijske analize aktivnosti enzima, histološku analizu i određivanje koncentracije -SH grupa i tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (TBARS) u tkivima, kao i ibogaina i noribogaina u plazmi. Opisan je adekvatan metod za statističku obradu rezultata. Sve sprovedene procedure su u saglasnosti sa EEC direktivom (*eng.* EEC Directive on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes) i odobrene od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

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 117 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Jasno je pokazan poremećaj redoks homeostaze nakon primene ibogaina, kao i efekat na nivou energetskeg metabolizma. Efekat ibogaina na antioksidativnu odbranu je tkivno, dozno i vremenski specifičan.

U jetri nema promena u aktivnosti antioksidativnih enzima, ali povećana aktivnost ksantin oksidaze i koncentracije TBARS govori o postojanju povećanog metabolizma adenozina i umerenog oksidativnog stresa na nivou lipidnih peroksida. Efekat ibogaina na energetskeg metabolizam je izražen. Nakon 6 h od primene ibogaina (1 mg/kg t.m.) dolazi do pada u količini glikogena u jetri, i na tom nivou ostaje i posle 24 h. Ibogain izaziva pad u količini glikogena i pri većoj dozi (20 mg/kg t.m.), 6 h posle primene, a najveća glikogenolitička aktivnost u hepatocitima je zabeležena 24 h nakon primene velike doze. U bubrezima zabeležena je povećana aktivnost enzima SOD1 6 i 24 h nakon primene niže doze ibogaina (1 mg/kg t.m.) u odnosu na netretirane kontrole kao i smanjenje aktivnosti enzima GR u svim grupama tretiranim ibogainom, a u odnosu na kontrolne životinje. Histološka analiza pokazala je promene na nivou epitelnih ćelija proksimalnih tubula. Povećan je volumen epitelnih ćelija, jedra su slabije vidljiva ili fokalno odsutna, a citoplazma dobija granulirani izgled, usled uvećanja mitohondrija. Promene su najizraženije 24 h nakon primene veće doze ibogaina (20 mg/kg t.m.). U srcu zabeleženo je smanjenje aktivnosti enzima SOD2 i GST 6 h nakon primene veće doze ibogaina (20 mg/kg t.m.), dok je 6 h nakon primene male doze ibogaina (1 mg/kg t.m.) došlo do povećanja koncentracije TBARS, a smanjenja ukupnih –SH grupa. Histološka analiza pokazala je da nema histopatoloških promena, ali da postoji povećanje količine glikogena u miocitima životinja tretiranih ibogainom, doza 20 mg/kg t.m., u obe vremenske tačke. U ileumu su zabeležene promene 6 h nakon primene 1 mg/kg t.m. ibogaina, smanjena je aktivnost KAT, dok je povećana aktivnost GSH-Px. Takođe smanjena je koncentracija TBARS 24 h nakon primene 20 mg/kg t.m. ibogaina. U slezini i eritrocitima nema promena u ispitivanim parametrima, dok u plućima jedino je izmereno smanjenje aktivnosti KAT 6 h nakon primene 20 mg/kg t.m. ibogaina. U testisima dolazi do povećanja aktivnosti SOD1, SOD2 i KAT 24 h nakon primene 1 mg/kg t.m. ibogaina, kao i do povećanja aktivnosti SOD1 24 h nakon primene veće doze ibogaina.

Izmerene su koncentracije ibogaina i noribogaina (metabolit ibogaina koji je takođe aktivan) u plazmi 6 i 24 h nakon obe primenjene doze. Nakon 6 h ibogain je prisutan u plazmi posle aplikacije veće doze, dok je noribogain prisutan nakon obe doze. Nakon 24 h posle male doze nisu detektovani ni ibogain ni noribogain, dok nakon veće doze ima samo noribogaina. Izmerene koncentraciju su izražene u ng/ml.

Ibogain na dozno zavisian način inhibira tonične kontrakcije ileuma izazvane 60 mM KCl, kao i kontrakcije izazvane električnom stimulacijom. Za potpunu inhibiciju toničnih kontrakcija bilo je potrebno 478  $\mu$ M ibogaina, dok je za inhibiciju kontrakcija izazvanih električnom stimulacijom bila dovoljna 3,5 x manja koncentracija ibogaina (130  $\mu$ M). Pretretman glibenklamidom kod toničnih kontrakcija smanjuje, dok kod električnih stimulacija pojačava inhibični efekat ibogaina. U aktivnosti antioksidativnih enzima pokazano je povećanje aktivnosti ukupne SOD nakon tretiranja izolovanog ileuma rastućim koncentracijama ibogaina, a efekat je izraženiji kod električnih stimulacija. Nakon pretretmana glibenklamidom kod električnih stimulacija aktivnost SOD je i dalje povećana dok je kod toničnih kontrakcija u nivou kontrolnih vrednosti. Aktivnost KAT je povećana, kod tonično kontrahovanih terminalnih ileuma, nakon tretiranja izolovanog ileuma rastućim koncentracijama ibogaina i taj efekat je još izraženiji nakon pretretmana glibenklamidom. Aktivnost GSH-Px je smanjena, kod ileuma kontrahovanih električnom stimulacijom, nakon tretiranja izolovanog ileuma rastućim koncentracijama ibogaina.

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

Ibogain je alkaloid koji se koristi za olakšavanje simptoma apstinencionog sindroma (1-25 mg/kg) (Popik i sar., 1995). Doze ibogaina (1 i 20 mg/kg t.m., p.o.) koje su korišćene u ovom eksperimentu su u skladu sa dozama koje su primenjivane *in vivo*, literaturno su opisane i preko alternativne prakse prikazane u priručniku za upotrebu ibogaina protiv zavisnosti (Popik i sar., 1995; Alper i sar., 2008; Sheppard 1994). Nakon *per os* primene ibogain se metaboliše u jetri pomoću enzima citohrom P-450(2D6) i prelazi u noribogain (Obach i sar., 1998; Baumann i sar., 2001). Izmerene koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi su u skladu sa podacima iz literature (Kubiliene i sar., 2017) i poznatom farmakokinetikom ibogaina. Naime pokazano je da noribogain ostaje u plazmi duže vreme u odnosu na ibogain (Mash i sar., 1995), što je ovim rezultatima potvrđeno.

Ibogain je postuliran kao pro-antioksidant na osnovu *in vitro* (Paškulin i sar. 2010) i *ex vivo* (Nikolić-Kokić i sar., 2015) eksperimenata. U *in vivo* istraživanjima pacovi su tretirani iboganom (doza 20 mg/kg t.m., i.p.), a nakon 24 i 72 h analizirana je količina proteina u mozgu. Pokazano je povećanje količine enzima glikolitičkog i TCA ciklusa (Paškulin i sar., 2006). Na kvascu je *in vitro* potvrđeno povećanje količine ovih enzima, i pokazano je povećanje količine SOD1, 5 h nakon izlaganja ibogainu, koncentracije 1 mg/l (Paškulin i sar., 2010). U istom eksperimentu je pokazano da ibogain dovodi do povećanja ROS unutar ćelija kvasca, nakon 1 h od izlaganja, zatim sledi izraziti pad u narednih sat vremena, da bi nakon 5 h ROS bile na kontrolnom nivou. Na humanim eritrocitima je potvrđeno povećanje aktivnosti SOD1 i GR, a pokazano je i otpuštanje ATP-a u ekstraćelijski prostor (Nikolić-Kokić i sar., 2015). Takođe pokazano je, pomoću DPPH testa, da sam ibogain nema antioksidativna svojstva (Paškulin i sar., 2012).

Iako je radovima *in vitro* generalno postuliran mehanizam brze aktivacije antioksidativnih enzima, prvenstveno SOD1, posle delovanja ibogaina (Paškulin i sar., 2010; Nikolić-Kokić i sar., 2015), rezultati prikazani ovde ne pokazuju tako brz i znatan efekat na sistem antioksidativne zaštite. Promene u eritrocitima nisu nađene ni posle 6 ni posle 24 h, ni za jednu primenjenu dozu. Ibogain *in vitro* oslobađa ATP iz eritrocita, posle 1 h inkubacije, što je praćeno povećanjem aktivnosti SOD1 i za više doze, GR, ukazujući na brz odgovor antioksidativnih enzima i prisustvo posttranslacionih mehanizama regulacije aktivnosti (Nikolić-Kokić i sar., 2015). Eksperimenti *in vitro* su rađeni sa višestruko višim dozama ibogaina nego upotrebljenim *in vivo* u ovom eksperimentu i verovatnije je da oksidativni pritisak *in vivo* nije bio dovoljno jak da bi se antioksidativni sistem aktivirao.

Rezultati dobijeni u jetri i srcu su potvrdili njegov efekat na nivou energetskeg metabolizma. U jetri dolazi do potrošnje glikogena i njegove restitucije, koja je i dozno i vremenski zavisna, dok u srcu 24 h od aplikacije ibogaina, dolazi do povećanja količine glikogena, što je u saglasnosti sa uticajem koji ibogain ima na energetskeg metabolizam. Poznato je da i drugi alkaloidi mogu dovesti do povećanja količine glikogena u srcu (Stegelmeier i sar., 1995), a kod pacijenata sa poremećajem abnormalno visokog skladištenja glikogena razvija se srčana aritmija i kardiomiopatija (Austin i sar., 2011) praćena poremećajem QT talasa (Bharati i sar., 1982). Ibogain usporava repolarizaciju akcionih potencijala u srcu, što može dovesti do produžavanja QT intervala i srčanih aritmija (Rubi i sar., 2017), za koje je i pokazano da su uzroci smrtnog ishoda ljudi koji su konzumirali ibogain (Alper i sar., 2012; Hoelen i sar., 2009). Rezultati ove disertacije jasno ukazuju na prisustvo oksidativnog stresa u srcu nakon

ingestije ibogaina, što može dovesti do oksidativnih oštećenja i biti jedan od kasnijih faktora rizika nastanka zastoja srčanog ritma i fatalnih ishoda.

Ibogain i noribogain se ekskretuju iz organizma preko bubrega i gastrointestinalnog trakta (Alper, 2001; Papadodima i sar., 2013). Bubrezi su skloni akutnom oštećenju usled promena u funkcionisanju mitohondrija i nastanku ROS-a (Ralto i Parikh, 2016). U ovom eksperimentu nema promena u aktivnosti GST, na nivou bubrega, što znači da ibogain nije značajno promenio njihovu opštu detoksifikacionu aktivnost, kao i da ibogain nije izazvao ekstremne uslove u ovom ćelijskom sistemu koji bi doveli do nastanka oksidativnog stresa ovim putem. Međutim, promene aktivnosti SOD1 i GR ukazuju na postojanje oksidativno narušene redoks ravnoteže u bubrezima. Histološka analiza pokazala je promene oblika lumena proksimalnih tubula i uvećanje volumena njihovih epitelnih ćelija, sa acidofilnim granulama u citoplazmi. Opisane morfološke promene su u saglasnosti sa pretpostavljenim povećanjem produkcije ROS-a i izmerenim povećanjem aktivnosti SOD1. Ćelije proksimalnih tubula zahtevaju intenzivnu potrošnju ATP radi reapsorpcije putem aktivnog transporta. ATP je važan za aktivnost ATPaze na ćelijskoj površini što sprečava bubrenje ćelija usled pasivnog ulaska jona natrijuma i vode. Ako ibogain prazni rezerve ATP (ili ga zasad nedefinisanim mehanizmom „troši“), očekivano je narušavanje regularne jonske homeostaze i aktivacija mitohondrija u cilju ponovnog uspostavljanja energetske stabilnosti dodatnom produkcijom ATP. Morfologija mitohondrija zavisi od ćelijskih energetskih zahteva i različito energetsko stanje i stanje mitohondrija su jasno povezane sa nastankom akutnih povrede i oštećenja bubrega (Ralto i Parikh, 2016).

Ibogain ostvaruje svoje efekte i preko kalijumovih kanala (Zhang i Cuevas, 2005), te su za ispitivanje uloge pojedinih klasa signalnih puteva u efektima ibogaina za pretretmane izabrani blokatori  $K_v$  kanala (4-aminopiridin),  $K_{Ca}$  kanala (tetraetil amonijum) i  $K_{ATP}$  kanala (glibenklamid). Rezultati ove distertacije su pokazali da ibogain svoje dejstvo ostvaruje samo preko  $K_{ATP}$ -zavisnih kalijumovih kanala od ispitanih, jer se njegovo dejstvo smanjuje u prisustvu glibenklamida. Ovi efekti su praćeni promenama u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, što jasno ukazuje na dvostruku ulogu ibogaina, kao 1) direktnog farmakološkog agensa i 2) agensa koji menja redoks ravnotežu.

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

*Vidonja Uzelac Teodora, Tatalović Nikola, Mijović Milica, Koželj Gordana, Nikolić-Kokić Aleksandra, Oreščanin-Dušić Zorana, Bresjanac Mara, Blagojević Duško. Effects of ibogaine*

**per os application on redox homeostasis in rat liver and erythrocytes.** Archives of Biological Sciences (2019) 71(1):133-44.

Vidonja Uzelac Teodora, Tatalović Nikola, Mijović Milica, Nikolić-Kokić Aleksandra, Oreščanin-Dušić Zorana, Bresjanac Mara, Blagojević Duško. **Effects of ibogaine per os treatment on redox homeostasis in rat kidney.** Archives of Biological Sciences <https://doi.org/10.2298/ABS190208006V>

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

Doktorska disertacija „Efekat ibogaina na sistem antioksidativne zaštite u perifernim tkivima i kontraktilnost terminalnog ileuma kod mužjaka pacova“ Teodore Vidonja Uzelac predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizma delovanja ibogaina, preko njegovog uticaja na sistem antioksidativne zaštite u perifernim tkivima i na energetske metabolizam. Pokazano je da ibogain na dozno, vremenski i tkivno specifičan način remeti energetske metabolizam i utiče na tkivnu redoks ravnotežu. Ibogain najveće efekte ostvaruje na visoko metaboličkim (jetra, bubrezi) i kontraktilnim tkivima (srce, ileum). Ibogain u primenjenim dozama pokazuje glikogenolitičku aktivnost u jetri, dok u srcu smanjuje količinu proteinskih -SH grupa i time narušava redoks ravnotežu, što može dovesti do promena u srčanom radu. Ibogain svoje dejstvo ostvaruje delimično preko  $K_{ATP}$  zavisnih kanala. Ne postoji klasična dozna zavisnost, što može biti posledica višestrukih ćelijskih signalnih mesta na koje ibogain deluje. U *in vivo* sistemu nema jasno profilisano pro-antioksidativno delovanje, iako je takav efekat jasno pokazan u *in vitro* i *ex vivo* eksperimentima.

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 veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Teodore Vidonja Uzelac i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 14.5.2019.

Članovi Komisije:

Akad Prof. dr Tatjana Simić

---

Doc.dr Janko Samardžić

---

Doc.dr Dragana Protić

---

VNS dr Zorana Oreščanin Dušić

---

Prof.dr Danijela Kojić

---

Mentor:

N. Sav. dr Duško Blagojević

---

Komentor:

Prof.dr Milica Bajčetić

---