

**UNIVERZITET U BEOGRADU - FARMACEUTSKI FAKULTET**  
**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**  
**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE**

**Predmet: Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Marije Marinko**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 07.05.2020. godine, Odlukom broj 660/1 imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije, kandidata diplomiranog farmaceuta Marije Marinko (rođene Pavlović), pod naslovom:

**„Vazodilatatorno delovanje donora azot monoksida i vodonik-sulfida na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni čoveka: uloga kalijumovih kanala“.**

Komisija u sastavu:

1. Dr Aleksandra Novaković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr Radica Stepanović-Petrović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr Nina Japundžić Žigon, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

## **IZVEŠTAJ**

### **A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija diplomirang farmaceuta Marije Marinko, pod nazivom „Vazodilatatorno delovanje donora azot monoksida i vodonik-sulfida na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni čoveka: uloga kalijumovih kanala“, napisana je na 82 strane sa proredom 1 i organizovana u sledećih 7 celina: Uvod (22 strane), Ciljevi istraživanja (1 strana), Materijal i metode (3 strane), Rezultati (23 strane), Diskusija (13 strana), Zaključci (1 strana) i Literatura (19 strana). Na početku, doktorska disertacija sadrži i sažetak na

srpskom i engleskom jeziku i sadržaj poglavlja i potpoglavlja, a na kraju spisak radova i saopštenja proisteklih iz doktorske disertacije, kratku biografiju kandidata i potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju doktorske disertacije. Disertacija je napisana jasnim i preglednim stilom i sadrži 22 slike i 19 tabela. Pregled literature sadrži 293 navoda.

**Uvod** sadrži pregledno izložene podatke iz relevantnih literaturnih izvora koji predstavljaju teorijsku osnovu za istraživanja sprvedena u okviru ove doktorske disertacije. U prvom delu uvoda predstavljena je strukturna klasifikacija kalijumovih ( $K^+$ ) kanala, njihova uloga u regulaciji vaskularnog tonusa, karakteristike najvažnijih vaskularnih  $K^+$  kanala, kao i trenutni dokazi, primarno iz studija na ljudima ili na izolovanim humanim krvnim sudovima, o promenama njihove strukture/funkcije koji se povezuju sa poremećajem vaskularne reaktivnosti u različitim patološkim stanjima. U drugom i trećem delu detaljno je opisan proces sinteze i distribucija enzima koji sintetišu endogene gasovite medijatore proučavane u disertaciji, azot monoksid (NO) i vodonik-sulfid ( $H_2S$ ). U četvrtom delu istaknute su poznate činjenice o ulozi ovih gasotransmitera u regulaciji vaskularnog tonusa i trenutna saznanja o ulozi  $K^+$  kanala u njihovom dejstvu. U petom delu je istaknut značaj promene nivoa NO i  $H_2S$  u razvoju vaskularne disfunkcije u različitim kardiovaskularnim bolestima, kao i trenutni i potencijalni terapijski značaj donora NO i  $H_2S$ . U poslednjem delu su izloženi najbitniji razlozi upotrebe humanih bajpas graftova kao modela za ispitivanje u ovoj doktorskoj disertaciji.

**Cilj istraživanja** ove doktorske disertacije bio je da se ispituju mehanizmi vazodilatatornog delovanja nikorandila, kao donora NO, i natrijum-hidrogensulfida, kao donora  $H_2S$ , na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni čoveka, posredstvom aktivacije različitih tipova  $K^+$  kanala. U svrhu realizacije glavnog cilja, jasno su definisani podciljevi koji su obuhvatili: 1) ispitivanje zavisnosti vazodilatatornog delovanja donora NO, odnosno  $H_2S$ , od prisustva endotela krvnih sudova; 2) definisanje tipova  $K^+$  kanala posredstvom kojih deluju donori NO, odnosno  $H_2S$ , kao i ispitivanje da li ovi gasoviti medijatori deluju vazodilatatorno posredstvom istih tipova  $K^+$  kanala na izolovanu unutrašnju torakalnu arteriju i venu safenu; 3) ispitivanje da li donori NO i  $H_2S$  deluju direktno na  $K^+$  kanale i/ili indirektno, aktivirajući signalni put cikličnog gvanozin-monofosfata (cGMP), i 4) mogućnost potencijalne interakcije između NO i  $H_2S$  na ispitivanim krvnim sudovima. Ciljevi istraživanja su dobro postavljeni.

Poglavlje **Materijal i metode** daje detaljan opis pripreme tkiva (neiskorišćenih segmenata humane unutrašnje torakalne arterije i vene safene) i korišćenog eksperimentalnog protokola. Ispitivanje je rađeno u *in vitro* uslovima u sistemu za izolovane organe. Tokom istraživanja upotrebljeno je 188 arterijskih i 176 venskih segmenata uzetih od 280 pacijenata tokom bajpas operacija. Upotreba neiskorišćenih segmenata humanih arterijskih i venskih bajpas graftova odobrena je od strane Etičkog Odbora Instituta za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“.

Dobijeni segmenti krvnih sudova su u laboratoriji, nakon uklanjanja masnog i vezivnog tkiva, pažljivo isecani na prstenove širine oko 3 mm. U cilju ispitivanja uloge endotela u vazorelaksantnom dejstvu ispitivanih supstanci, endotel nekih prstenova je mehanički uklanjan. Postupak postavljanja prstenova krvnih sudova u kupatilo za izolovane organe ispunjeno Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom, njihova ekvibracija i podešavanje izometrijske tenzije preparata je detaljno opisan.

Eksperimentalni protokol je podrazumevao upotrebu izolovanih krvnih sudovima sa i bez endotela. Nakon perioda ekvibracije, prstenovi krvnih sudova su kontrahovani fenilefrinom, a kada je kontrakcija dostigla stabilan plato (oko 10-15 min.), u vodeno kupatilo je dodavan

acetilholin u cilju ispitivanja prisustva endotela. Brza relaksacija krvnog suda ukazivala je na prisustvo, a izostanak relaksacije na odsustvo endotela. Nakon ispiranja preparata svežim Krebs-Ringerovim bikarbonatnim rastvorom tokom narednih sat vremena, preparat je ponovo kontrahovan fenilefrinom. Kada je ova fenilefrinska kontrakcija dostigla svoj plato, kumulativno su dodavane rastuće koncentracije nikorandila (0,001-300  $\mu$ M) ili natrijum-hidrogensulfida (1  $\mu$ M–3 mM) i konstruisane koncentracijski-zavisne krive relaksacije.

U cilju ispitivanja uloge različitih  $K^+$  kanala i komponenti cGMP signalnog puta u mehanizmu dejstva nikorandila i natrijum-hidrogensulfida, u posebnim serijama eksperimenata su, nakon konstrukcije prve kumulativne koncentracijski-zavisne krive relaksacije i ispiranja preparata narednih sat vremena, u vodeno kupatilo dodavani različiti blokatori/inhibitori ili njihove kombinacije. Dat je detaljan prikaz korišćenih blokatora/inhibitora, njihovih uloga i koncentracija, kao i način rastvaranja svih upotrebljenih supstanci.

Za statističko poređenje kumulativnih koncentracijski-zavisnih krivih relaksacije pod različitim tretmanom (sa i bez blokatora/inhibitora) korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjima i Bonferroni testom za *post hoc* poređenja. Za ispitivanje značajnosti razlika između maksimalnih vrednosti relaksacije i srednjih efektivnih koncentracija ( $EC_{50}$ ) različitih grupa, korišćen je Studentov t-test. Statistički značajnom je smatrana vrednost  $p < 0,05$ . Za statističke analize korišćen je kompjuterski program SPSS (version 10.0; International Business Machines Corp, Armonk, NY), a za crtanje grafika program Sigma Plot (version 11.0; Systat Software, Inc.).

Primenjena metodologija je adekvatno odabrana i omogućila je dobijanje jasnih i pouzdanih rezultata i realizaciju postavljenih ciljeva.

**Rezultati** istraživanja prikazani su pregledno i predstavljeni tekstualno i grafički, korišćenjem 16 slika i 14 tabela. Grupisani su u dve osnovne celine: 1) Vazodilatatorni efekat donora NO, nikorandila i 2) Vazodilatatorni efekat donora  $H_2S$ , natrijum-hidrogensulfida.

**Diskusija** obuhvata detaljnu analizu rezultata dobijenih istraživanjem u cilju donošenja odgovarajućih zaključaka, a uz osvrt na relevantne nalaze drugih autora iz dostupnih literaturnih izvora. Poglavlje Diskusija organizovano je u tri celine: 1) Vazodilatatorni efekat nikorandila, donora NO; 2) Vazodilatatorni efekat natrijum-hidrogensulfida, donora  $H_2S$ ; i 3) Osnovne razlike u vazodilatatornom dejstvu donora NO i  $H_2S$  na humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakanoj arteriji.

Poglavlje **Zaključci** sadrži sažeto prikazane najvažnije zaključke proistekle iz rezultata istraživanja i njihove analize, a koji su u skladu sa sa postavljenim ciljevima istraživanja.

U poglavlju **Literatura** navedene su 293 reference koje su korišćene u doktorskoj disertaciji.

## **B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

Rezultati ove doktorske disertacije logično su podeljeni u dve osnovne celine shodno predmetu ispitivanja koji obuhvata donore dva gasotransmitera, NO i  $H_2S$ .

U **prvom delu** prezentovani su rezultati ispitivanja vazodilatatornog efekta donora NO, nikorandila. Pokazano je da nikorandil koncentracijski-zavisno relaksira prstenove humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije sa i bez endotela. Nije bilo statističke značajnosti u

osetljivosti i maksimalnoj efikasnosti nikorandila između preparata sa i bez endotela (na oba krvna suda), kao ni među krvnim sudovima (između vene i arterije). Zbog pokazanog endotel-nezavisnog delovanja nikorandila, dalja ispitivanja mehanizma dejstva rađena su na preparatima bez endotela.

Prilikom ispitivanja uloge  $K^+$  kanala u vazorelaksantnom efektu nikorandila, testiran je uticaj različitih blokatora  $K^+$  kanala: glibenklamida (selektivnog blokatora ATP-zavisnih  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) kanala), tetraetilamonijuma (neselektivnog blokatora  $Ca^{2+}$ -zavisnih  $K^+$  ( $K_{Ca}$ ) kanala), iberiotoksina (selektivnog blokatora  $K_{Ca}$  kanala velike provodljivosti ( $BK_{Ca}$ )), 4-aminopiridina (neselektivnog blokatora voltažno-zavisnih  $K^+$  ( $K_V$ ) kanala) i margatoksina (selektivnog blokatora  $K_V1.3$  kanala). Poređenje kumulativnih krivih relaksacije za nikorandil pokazalo je da na veni safeni postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa glibenklamidom i 4-aminopiridinom, dok nije bilo značajne razlike nakon inkubacije sa tetraetilamonijumom, iberiotoksinom i margatoksinom u odnosu na kontrolu. Na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, pokazana je statistički značajna razlika nakon inkubacije sa glibenklamidom, tetraetilamonijumom i iberiotoksinom, kao i da nema značajne razlike nakon inkubacije sa 4-aminopiridinom i margatoksinom u odnosu na kontrolu.

Rezultati ispitivanja uloge cGMP-a u mehanizmu vazodilatatornog dejstva nikorandila na izolovanoj humanoj veni safeni i unutrašnjoj torakalnoj arteriji korišćenjem ODQ, inhibitora solubilne gvanilat ciklaze (GC), pokazali su da postoji statistički značajna inhibicija relaksantnog efekta nikorandila u prisustvu ODQ na oba krvna suda u odnosu na kontrolu.

Shodno rezultatima prethodnih serija eksperimenata, urađena su ispitivanja uloge cGMP-a kao sekundarnog glasnika u aktivaciji  $K^+$  kanala izazvanoj nikorandilom, korišćenjem ODQ u kombinaciji sa blokatorima  $K^+$  kanala za koje je pokazano da značajno inhibiraju relaksaciju izazvanu nikorandilom. Rezultati su pokazali da je u odnosu na prisustvo samo ODQ, nikorandilom prouzrokovana relaksacija bila značajno više inhibirana u prisustvu kombinacije ODQ plus glibenklamid (na oba krvna suda) i ODQ plus iberiotoksin (na unutrašnjoj torakalnoj arteriji), dok nije bilo značajne razlike nakon inkubacije sa kombinacijom ODQ plus 4-aminopiridin (na veni safeni).

U **drugom delu** prikazani su rezultati ispitivanja vazodilatatornog efekta donora  $H_2S$ , natrijum-hidrogensulfida. Rezultati su pokazali da natrijum-hidrogensulfid izaziva koncentracijski-zavisnu relaksaciju prstenova izolovane vene safene i unutrašnje torakalne arterije sa endotelom, dok je relaksantni efekat bio značajno smanjen nakon uklanjanja endotela. Shodno pokazanom endotel-zavisnom relaksantnom efektu, dalja ispitivanja mehanizma dejstva natrijum-hidrogensulfida vršena su na preparatima sa endotelom. Poređenje osetljivosti i maksimalne efikasnosti natrijum-hidrogensulfida između izolovane vene safene sa endotelom i unutrašnje torakalne arterije sa endotelom, kao i među preparatima ova dva krvna suda bez endotela, nije pokazalo statistički značajne razlike.

U rezultatima ispitivanja uloge različitih  $K^+$  kanala u vazorelaksantnom efektu natrijum-hidrogensulfida, pokazan je uticaj sledećih blokatora  $K^+$  kanala: kombinacije apamina (selektivnog blokatora  $K_{Ca}$  kanala male provodljivosti ( $SK_{Ca}$ )) i TRAM-34 (selektivnog blokatora  $K_{Ca}$  kanala srednje provodljivosti ( $IK_{Ca}$ )), iberiotoksina, glibenklamida, 4-aminopiridina i margatoksina. Poređenje kumulativnih krivih relaksacije za natrijum-hidrogensulfid pokazalo je da, na veni safeni, postoji statistički značajna razlika nakon inkubacije sa kombinacijom apamin/TRAM-34, kao i da nema značajne razlike nakon tretmana iberiotoksinom, glibenklamidom i 4-aminopiridinom (u odnosu na kontrolu). Dodatna analiza je pokazala da iberiotoksin i glibenklamid značajno blokiraju efekte samo najvećih koncentracija

natrijum-hidrogensulfida. Na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, pokazana je statistički značajna razlika kumulativnih krivih relaksacije za natrijum-hidrogensulfid nakon inkubacije sa svim korišćenim blokatorima u odnosu na kontrolne krive.

Rezultati ispitivanja uloge NO/cGMP/PKG (protein kinaza G) signalnog puta u vazorelaksantnom delovanju natrijum-hidrogensulfida pokazali su da je došlo do značajnog antagonizovanja relaksacije oba krvna suda u prisustvu svih ispitivanih inhibitora ovog signalnog puta: L-NAME (inhibitora endotelne NO sintaze), ODQ, sildenafil (selektivnog inhibitora fosfodiesteraze 5) i KT5823 (selektivnog inhibitora PKG), s tim da je uticaj ODQ na relaksaciju unutrašnje torakalne arterije bio značajan samo u visokim koncentracijama natrijum-hidrogensulfida.

Dobijeni rezultati bili su osnova daljeg ispitivanju uloge NO i cGMP-a u aktivaciji  $K^+$  kanala izazvanog natrijum-hidrogensulfidom. U uslovima inhibirane sinteze i oslobađanja NO i prostaciklina iz endotela, rezultati su pokazali dodatnu značajnu redukciju relaksacije vene safene u prisustvu apamin/TRAM-34 kombinacije, iberiotoksina i glibenklamida. Na unutrašnjoj torakalnoj arteriji došlo je do dalje redukcije relaksacije dodatkom apamin/TRAM-34 kombinacije i glibenklamida, dok nije bilo značajnog efekta dodatkom iberiotoksina, 4-aminopirimidina i margatoksina. U uslovima blokirane sinteze cGMP-a, došlo je do dalje redukcije relaksacije oba krvna suda izazvane natrijum-hidrogensulfidom dodatkom svih ispitivanih blokatora  $K^+$  kanala, odnosno dodatkom apamin/TRAM-34 kombinacije, iberiotoksina i glibenklamida na veni safeni i apamin/TRAM-34 kombinacije, iberiotoksina, glibenklamida, 4-aminopiridina i margatoksina na unutrašnjoj torakalnoj arteriji.

### **C. UPOREDNA ANALIZA POSTIGNUTIH REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE**

Procenom efekata nikorandila na arterijskim i venskim graftovima iz prethodnih studija uočava se njihova varijabilnost u zavisnosti od farmakološkog agensa korišćenog za izazivanje kontrakcije. Nikorandil je relaksirao humanu unutrašnju torakalnu arteriju, venu safenu i radijalnu arteriju koje su kontrahovane fenilefrinom, kalijum-hloridom i analogom tromboksana A<sub>2</sub>, U46619 (Ding i sar., 2008; Jesuthasan i sar., 2003; Sadaba i sar., 2000; Tanaka i sar., 2004). U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da nikorandil efikasno relaksira fenilefrinom kontrahovane segmenate vene safene i unutrašnje torakalne arterije i da je taj efekat endotelnezavisan. Nikorandil je izazvao potpunu relaksaciju i njegova potentnost je uporediva sa prethodno publikovanim rezultatima (Ding i sar., 2008).

Mehanizam vazodilatatornog dejstva nikorandila na humanim bajpas graftovima, sa posebnim osvrtom na ulogu različitih tipova  $K^+$  kanala, po prvi put je ispitivan u ovoj doktorskoj disertaciji. Danas je dobro poznato da nikorandil dovodi do vazorelaksacije dvostrukim mehanizmom dejstva: oslobađanjem NO, slično nitratima, i hiperpolarizacijom preko aktivacije  $K_{ATP}$  kanala (Attaran i sar., 2008; Sadaba i sar., 2000). Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju da  $K_{ATP}$  kanali jesu uključeni u mehanizam kojim nikorandil dovodi do relaksacije vene safene i unutrašnje torakalne arterije. Pored toga, postoje sugestije da vazorelaksacija indukovana nikorandilom uključuje i aktivaciju  $K_{Ca}$  kanala (Kajioka i sar., 1990; Zhou i sar., 1995). U disertaciji je pokazano je da su  $BK_{Ca}$  kanali delimično uključeni u relaksaciju unutrašnje torakalne arterije, ali da, s druge strane, nemaju značaja u relaksaciji vene safene

indukovanoj nikorandilom, što korelira sa publikovanim rezultatima na izolovanim vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama (Davie i sar., 1998).

Bitno učešće 4-aminopiridin-senzitivnih  $K^+$  kanala u relaksaciji humane vene safene izazvanoj nikorandilom po prvi put je pokazano u ovoj disertaciji. Istovremeno, uloga ovih kanala u relaksaciji unutrašnje torakalne arterije nije dokazana. U vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama  $K_V$  kanali su široko eksprimirani. Tako je ekspresija  $K_V1.5$  kanala pokazana na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji (Smirnov i sar., 2003), dok su  $K_V1.3$  i  $K_V1.5$  kanali detektovani u humanoj veni safeni (Bonnet i sar., 2009; Cheong i sar., 2011). Studije pokazuju da  $K_V1.3$  kanali učestvuju u proliferaciji humanih vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i da pozitivno utiču na ćelijsku migraciju, što može rezultovati neointimalnom hiperplazijom, fenomenom od posebnog značaja zbog tendencije da izazove okluziju bajpas graftova (Cheong i sar., 2011; Jackson, 2010). Međutim, rezultati disertacije isključuju mogućnost da su  $K_V1.3$  kanali deo mehanizma vazorelaksantnog dejstva nikorandila na ispitivanim krvnim sudovima.

U rezultatima disertacije pokazano je da je aktivacija cGMP puta važan mehanizam kojim nikorandil relaksira venu safenu, kao i da delimično doprinosi dejstvu nikorandila na unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Ovakav nalaz je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da relativni doprinos svakog od mehanizama vazodilatatornog dejstva nikorandila, aktivacije  $K^+$  kanala, i povećanja nivoa cGMP-a stimulacijom GC, zavisi od eksperimentalnog protokola i vrste ispitivanih preparata (Perez-Vizcaíno i sar., 1998). Istovremeno, poznato je da je vazodilatacija izazvana nitratima dominantna u venskoj cirkulaciji (Mackenzie and Parratt, 1977; Taira, 1989).

Prikazane razlike u mehanizmu vazorelaksantnog dejstva nikorandila između humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije koreliraju sa dobro dokumentovanom tkivnom-specifičnošću dejstva nikorandila.

Prethodne studije sa nikorandilom su pokazale da su otvaranje  $K_{ATP}$  kanala i stimulacija GC nezavisni putevi koji doprinose relaksaciji izolovanih krvnih sudova (Holzmann i sar., 1992; Meisheri i sar., 1991; Perez-Vizcaíno i sar., 1998). Suprotno, izvesni podaci su sugerisali moguću uključenost cGMP-a u aktivaciji  $K_{ATP}$  kanala dejstvom nikorandila (Davie i sar., 1998). Rezultati disertacije pokazuju da nikorandil verovatno ima direktno stimulatorno dejstvo na  $K_{ATP}$  kanale glatkih mišićnih ćelija vene safene, ali i na moguću ulogu cGMP puta u aktivaciji  $K_{ATP}$  kanala izazvanoj nikorandilom na unutrašnjoj torakalnoj arteriji što korelira sa navedenim literaturnim nalazima.

Dejstvom nitrovazodilatatora ili endogenog NO u različitim krvnim sudovima, može doći do otvaranja  $BK_{Ca}$  kanala kao posledica aktivacije cGMP/PKG puta. Ipak, rastući broj dokaza iz literature ukazuje da je aktivacija  $BK_{Ca}$  kanala nezavisna od cGMP/PKG puta (Bolotina i sar., 1994; Bonaventura i sar., 2007; Wang i sar., 2012), a sa njima su u saglasnosti i rezultati iz disertacije koji pokazuju da nikorandil može na unutrašnjoj torakalnoj arteriji da otvori  $BK_{Ca}$  kanale cGMP-nezavisnim mehanizmom, odnosno da ova dva puta deluju paralelno.

U disertaciji je prvi put sugerisano da nikorandil na humanoj veni safeni aktivira  $K_V$  kanale cGMP-zavisnim mehanizmom, što korelira sa literaturnim podacima na humanim krvnim sudovima koji podržavaju ulogu  $K_V$  kanala u cGMP-zavisnim efektima (Cairrão i sar., 2010; Sobey i Faraci, 1999; Zhao i sar., 1997). Analizom proteina  $K_V$  kanala prisutnih u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, nađeno je da  $K_V1.5$  i  $K_V\beta_1$  poseduju mesta za fosforilaciju PKG-om, koja mogu biti odgovorna za aktivaciju  $K_V$  kanala ovom kinazom (Cox, 2005). S obzirom da je u disertaciji isključena uloga  $K_V1.3$  kanala, postoji mogućnost da je aktivacija  $K_V1.5$  kanala

cGMP-zavisnim mehanizmom barem delimično uključena u relaksaciju humane vene safene izazvanu nikorandilom.

Pregled relevantne literature ukazuje da efikasnost i potentnost H<sub>2</sub>S u različitim studijama varira u zavisnosti od korišćenog krvnog suda, korišćene vrste i od eksperimentalnih uslova. U disertaciji je prvi put pokazan vazorelaksantni efekat natrijum-hidrogensulfida na humanoj veni safeni, a jedan je od malobrojnih nalaza na humanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Endotelna zavisnost delovanja natrijum-hidrogensulfida pokazana na ovim krvnim sudovima korelira sa određenim podacima iz literature (Jackson-Weaver i sar., 2013; Materazzi i sar., 2017). Takođe, poređenje dobijenih rezultata sa dostupnim analizama ljudske plazme, gde je pokazano je da se koncentracija H<sub>2</sub>S kreće kod zdravih ispitanika u rasponu od 35-80 µM (Chen i sar., 2007; Hyspler i sar., 2002; Jiang i sar., 2005; Li i sar., 2005), i da u septičkom šoku može da poraste do 150 µM (Li i sar., 2005), ukazuje da u fiziološkim koncentracijama H<sub>2</sub>S verovatno može izvršiti merljiv uticaj na vaskularni tonus vene safene i unutrašnje torakalne arterije.

U dosadašnjim studijama su predloženi različiti mehanizmi vazodilatatornog efekta H<sub>2</sub>S, među kojima su otvaranje K<sup>+</sup> kanala, kao i uticaj na NO/cGMP/PKG signalni put, ali nema podataka ili su retki za humane bajpas graftove. Literaturni podaci sadrže suprotstavljene rezultate o interakcijama NO i H<sub>2</sub>S. Rezultati ove disertacije pokazuju da aktiviranje celokupnog NO/cGMP/PKG signalnog puta barem delimično posreduje u relaksaciji humane vene safene i unutrašnje torakalne arterije izazvanoj H<sub>2</sub>S donorem, natrijum-hidrogensulfidom. Opisani rezultati su u skladu sa prethodnim ispitivanjima gde je sugerisan sinergistički efekat NO i H<sub>2</sub>S, činjenicom da se poslednjih godina uglavnom H<sub>2</sub>S posmatra kao pojačivač vaskularnog NO/cGMP puta na različitim nivoima (Bucci i sar., 2012; Coletta i sar., 2012; Hosoki i sar., 1997; Szabo, 2017; Wang i sar., 2008). Pored toga, značaj NO signalnog puta zabeležen je i u angiogenom (Coletta i sar., 2012) i kardioprotektivnom dejstvu H<sub>2</sub>S (King i sar., 2014; Sojitra i sar., 2012).

Aktivacija endotelnih SK<sub>Ca</sub> i IK<sub>Ca</sub> kanala dovodi do hiperpolarizacije endotelnih ćelija, koja se dalje može preneti na susedne glatke mišićne ćelije, ali i favorizovati ulazak Ca<sup>2+</sup> u endotelne ćelije što doprinosi aktivaciji Ca<sup>2+</sup>-zavisnih enzima, kao što je eNOS (Félétou, 2016). Rezultati disertacije ukazuju da, na veni safeni, natrijum-hidrogensulfid aktivira SK<sub>Ca</sub> i IK<sub>Ca</sub> kanale, verovatno rezultirajući kako proizvodnjom vazoaktivnih faktora iz endotela, tako i endotel-zavisnom hiperpolarizacijom. U skladu sa ovim je i nalaz da je samo blokator IK<sub>Ca</sub> kanala inhibirao hiperpolarizaciju humanih endotelnih ćelija posredovanu H<sub>2</sub>S-om, dok su blokatori BK<sub>Ca</sub> i K<sub>ATP</sub> kanala bili bez efekta (Mustafa i sar., 2011). S druge strane, rezultati pokazuju da SK<sub>Ca</sub> i IK<sub>Ca</sub> kanali imaju ulogu i u efektu natrijum-hidrogensulfida na unutrašnjoj torakalnoj arteriji, ali u manjoj meri nego na veni. Na unutrašnjoj torakalnoj arteriji natrijum-hidrogensulfid otvara endotelne SK<sub>Ca</sub> i IK<sub>Ca</sub> kanale, ali to ne doprinosi (ili doprinosi u maloj meri) aktivaciji NO signalnog puta.

BK<sub>Ca</sub> kanali se uglavnom nalaze na vaskularnim ćelijama glatkih mišića gde je pokazano da su uključeni u vazorelaksaciju indukovanu sa dva gasotransmitera, NO-om i ugljen-monoksidom (Hu i Zhang, 2012). U disertaciji je prvi put sugerisano postojanje direktne interakcije trećeg gasotransmitera H<sub>2</sub>S sa BK<sub>Ca</sub> kanalima na humanoj veni safeni, koja se verovatno događa modulacijom redoks statusa kritičnih sulfhidrilnih grupa (Sitdikova i sar., 2010), ali je njen značaj pokazan samo u visokim koncentracijama H<sub>2</sub>S. Suprotno ovome, pokazano je da na unutrašnjoj torakalnoj arteriji BK<sub>Ca</sub> kanali značajno doprinose relaksaciji, kao i da natrijum-hidrogensulfid otvara BK<sub>Ca</sub> kanale indirektno posredstvom NO/cGMP-signalnog

puta. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim nalazima gde je sugerisana indirektna aktivacija BK<sub>Ca</sub> kanala usled sekundarne stimulacije NO puta (Archer i sar., 1994).

U disertaciji je pokazana značajna uloga K<sub>ATP</sub> kanala u delovanju natrijum-hidrogensulfida na unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima u kojima je upravo K<sub>ATP</sub> kanal najčešće bio prepoznat kao specifičan cilj dejstva H<sub>2</sub>S (Al-Magableh i Hart, 2011; Cheng i sar., 2004; Materazzi i sar., 2017; Webb i sar., 2008; Zhao i sar., 2001). Dodatnim ispitivanjima, po prvi put je pokazano da je na unutrašnjoj torakalnoj arteriji aktivacija K<sub>ATP</sub> kanala natrijum-hidrogensulfidom posledica kako direktne aktivacije kanala, tako i indirektnog dejstva posredstvom NO, moguće delimično cGMP-zavisnim mehanizmom. Sa druge strane, rezultati su ukazali na direktnu aktivaciju K<sub>ATP</sub> kanala na veni safeni, ali samo u visokim koncentracijama natrijum-hidrogensulfida, što korelira sa nalazima studija u kojima je blokada K<sub>ATP</sub> kanala samo delimično uticala ili nije uticala na relaksaciju izazvanu H<sub>2</sub>S-om (Kiss i sar., 2008; Martelli i sar., 2013).

U literaturi postoji mali broj studija koji je sugerisao ulogu K<sub>V</sub> kanala u vazorelaksantnom delovanju H<sub>2</sub>S (Al-Magableh i Hart, 2011; Cheang i sar., 2010). Ova doktorska disertacija po prvi put ukazuje na potencijalni značaj K<sub>V</sub>1.3 kanala u delovanju H<sub>2</sub>S na nivou vaskularnog tkiva. Pokazano je da mehanizam vazorelaksantnog efekta natrijum-hidrogensulfida na unutrašnjoj torakalnoj arteriji uključuje indirektnu aktivaciju 4-aminopiridin-senzitivnih, verovatno podtip K<sub>V</sub>1.3 kanala putem NO, a delimično i cGMP-zavisnim mehanizmom. Istovremeno, ovi kanali nemaju ulogu u relaksaciji vene safene izazvane natrijum-hidrogensulfidom.

Sve do sada navedene razlike u mehanizmu relaksantnog delovanja natrijum-hidrogensulfida na humanom arterijskom i venskom graftu ukazuju da delovanje ovog donora H<sub>2</sub>S pokazuje značajnu tkivnu specifičnost saglasno nalazima iz relevantne literature.

#### **D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

##### ***Naučni radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)***

1. **Marinko M**, Novakovic A, Nenezic D, Stojanovic I, Milojevic P, Jovic M, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He GW. Nicorandil directly and cyclic GMP-dependently opens K<sup>+</sup> channels in human bypass grafts. *J Pharmacol Sci.* 2015;128(2):59-64. IF = 2,360
2. Novakovic A, **Pavlovic M**, Stojanovic I, Milojevic P, Babic M, Ristic S, Ugrešić N, Kanjuh V, Yang Q and He GW. Different K<sup>+</sup> channels are involved in relaxation of arterial and venous graft induced by nicorandil. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;58(6):602-608. IF = 2,826

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

1. **Pavlovic M**, Novakovic A, Peric M, Babic M, Kanjuh V, Misovic M, Bukarica Gojkovic Lj. The vasorelaxant effects of nicorandil in isolated human saphenous vein and internal mammary artery. Abstracts der wissenschaftlichen Beiträge zur 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung e.V. March 18-20 2010, Blaubeuren, Germany. *Perfusion* 2010;23(1):p43.



2. Novakovic A, **Pavlovic M**, Peric M, Babic M, Stojanovic I, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He GW. Relaxation of Venous Graft Induced by Nicorandil. 10<sup>th</sup> Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, 26-29 June 2011, Budapest, Hungary. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2011;109(Suppl1):P148.
3. Novakovic A, **Pavlovic M**, Vranic A, Milojevic P, Babic M, Stojanovic I, Jovic M, Nenezic D, Ugresic N, Yang Q, He GW. Different potassium channels are involved in relaxation of arterial graft induced by nicorandil. Frontiers in Cardiovascular Biology, London, UK, 30th March -1st April 2012; Cardiovascular Research 2012;93(Suppl. 1) PP151,S31
4. Novakovic A, **Marinko M**, Milojevic P, Babic M, Stojanovic I, Jovic M, Nenezic D, Ugresic N, Yang Q, He GW. Relaxation of arterial graft induced by nicorandil. Poster Presentations From the World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2012: Dubai, United Arab Emirates 18-21 April 2012. Circulation 2012;125(19), PP 839, p184.
5. **Marinko M**, Novakovic A, Stojanovic I, Milojevic P, Jovic M, Nenezic D, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He G.-W. Nicorandil induced endothelium-independent relaxation of arterial bypass graft. 11th Conference of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, 28-31 August 2013, Geneva, Switzerland. Clinical Therapeutics 2013;35(8, Suppl.):e47:PP098

***Saopštenja na skupovima nacionalnog značaja sa međunarodnim učešćem (M64)***

1. **Pavlović M**, Novaković A, Perić M, Babić M, Ćirković M, Ristić S, Bukarica Gojković Lj. Vazorelaksantni efekat nikorandila na izolovanoj humanoj unutrašnjoj mamilarnoj arteriji. V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 13-17. oktobar 2010. Arh farm 2010;60:656-657.  
(II nagrada, Sekcija za Farmakoinformatiku)
2. **Marinko M**, Novaković A, Nenezić D, Stojanović I, Milojević P, Jović M, Ugrešić N, Kanjuh V, Yang Q, He G.W. Mehanizam vazorelaksacije humanih bajpas graftova izazvane nikorandilom. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, 15-19. oktobar 2014. Beograd. Zbornik sažetaka, str. 259-260.
3. **Marinko M**, Novakovic A, Nenezic D, Stojanovic I, Milojevic P, Jovic M, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He G.W. Role of cyclic GMP in K<sup>+</sup> channel activation by nicorandil in human bypass grafts. 3rd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation, October 29-31 2014, Belgrade, Serbia. Abstract book, p 134.

**E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Gasoviti signalni molekuli, poput NO i H<sub>2</sub>S, regulacijom jonskih kanala, posebno K<sup>+</sup> kanala, ostvaruju deo svojih uticaja na organizam, kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim uslovima (Yu i sar., 2018). Stoga lekovi koji menjaju sintezu/nivoje samih gasovitih transmitera ili utiču na njihove signalne puteve predstavljaju atraktivne farmakološke agense. Rezultati prikazani u okviru disertacije dipl. farm. Marije Marinko prvi put su pokazali vazodilatatorne osobine donora H<sub>2</sub>S, natrijum-hidrogensulfida na izolovanoj humanoj veni safeni, dok je ovo

jedna od malobrojnih studija koja je ispitivala njegov efekat na unutrašnjoj torakalnoj arteriji. Takođe, ovo je prva studija koja se bavila mehanizmima vazodilatatornog dejstva nikorandila i natrijum-hidrogensulfida na humanim bajpas graftovima, sa posebnim osvrtom na ulogu različitih tipova K<sup>+</sup> kanala. Dodatno, koliko je poznato iz dostupnih izvora, do sad nije pokazano postojanje međusobne interakcije NO i H<sub>2</sub>S na nivou njihovih efekata na humanu venu safenu i unutrašnju torakalnu arteriju.

Verujemo da se doprinos ove disertacije ogleda i u činjenici da može ukazati na nove terapijske ciljeve u lečenju spazma arterijskih i venskih bajpas graftova, i potencijalno dati farmakološku osnovu za razvoj novih vazodilatatornih lekova. Vazospazam bajpas graftova je problem koji je odavno prepoznat (Jones i sar., 1989; Sarabu i sar., 1987). Određeni antispastički protokoli su klinički razvijeni tokom prethodnih decenija (Ding i sar., 2008; Formica i sar., 2006; He, 1999; He i sar., 1989, 1994, 2000; He i Yang, 1995, 1996; Sanders i Newman, 2005; Zabeeda i sar., 2001), ali uprkos tome, spazam se i dalje javlja u kliničkim uslovima. U svetlu kompleksnih mehanizama koji leže u osnovi spazma, mehaničke, fizičke i farmakološke prirode, prevencija i reverzija spazma i dalje predstavljaju izazov, a određene istraživačke grupe kontinuirano rade na pronalaženju najbolje metode za njegovo prevazilaženje i ispituju antispastički potencijal različitih vazodilatatornih agenasa.

## **Citirana literatura**

Ding R, Feng W, Li H, Wang L, Li D, Cheng Z, Guo J, Hu D. A comparative study on in vitro and in vivo effects of topical vasodilators in human internal mammary, radial artery and great saphenous vein. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;34(3):536-41.

Jesuthasan B, Angus JA, Rosenfeldt FL. In vitro comparison of glyceryl trinitrate-verapamil with other dilators of human saphenous vein. *ANZ J Surg.* 2003;73(5):313-20.

Sadaba JR, Mathew K, Munsch CM, Beech DJ. Vasorelaxant properties of nicorandil on human radial artery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000;17(3):319-24.

Tanaka KA, Szlam F, Katori N, Tsuda A, Levy JH. In vitro effects of antihypertensive drugs on thromboxane agonist (U46619)-induced vasoconstriction in human internal mammary artery. *Br J Anaesth.* 2004;93(2):257-62.

Attaran S, John L, El-Gamel A. Clinical and potential use of pharmacological agents to reduce radial artery spasm in coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg.* 2008;85(4):1483-9.

Kajioka S, Oike M, Kitamura K. Nicorandil opens a calcium-dependent potassium channel in smooth muscle cells of the rat portal vein. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;254(3):905-13.

Zhou Q, Satake N, Shibata S. The inhibitory mechanisms of nicorandil in isolated rat urinary bladder and femoral artery. *Eur J Pharmacol.* 1995;273(1-2):153-9.

Davie CS, Kubo M, Standen NB. Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 1998;125(8):1715-25.

Bonnet S, Paulin R, Sutendra G, Dromparis P, Roy M, Watson KO, Nagendran J, Haromy A, Dyck JR, Michelakis ED. Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodelling through the inhibition of the akt/gsk3- $\beta$ /nfat axis. *Circulation.* 2009;120(13):1231-40.

Cheong A, Li J, Sukumar P, Kumar B, Zeng F, Riches K, Munsch C, Wood IC, Porter KE, Beech DJ. Potent suppression of vascular smooth muscle cell migration and human neointimal hyperplasia by  $K_v1.3$  channel blockers. *Cardiovasc Res*. 2011;89(2):282-9.

Smirnov SV, Tammaro P, Hutchings SR, Smith AL. Role of voltage-gated  $K^+$  ( $K_v$ ) channels in vascular function. *Neurophysiology*. 2003;35(3/4):262-75.

Jackson WF.  $K_v1.3$ : a new therapeutic target to control vascular smooth muscle cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(6):1073-4.

Mackenzie JE, Parratt JR. Comparative effects of glyceryl trinitrate on venous and arterial smooth muscle in vitro; relevance to antianginal activity. *Br J Pharmacol*. 1977;60:155-160.

Perez-Vizcaíno F, Cogolludo AL, Villamor E, Tamargo J. Role of  $K^+$  channel opening and stimulation of cyclic GMP in the vasorelaxant effects of nicorandil in isolated piglet pulmonary and mesenteric arteries: relative efficacy and interactions between both pathways. *Br J Pharmacol*. 1998;123:847-54.

Taira N. Nicorandil as a hybrid between nitrates and potassium channel activators. *Am J Cardiol*. 1989;63:18J-24J.

Meisheri KD, Cipkus-Dubray LA, Hosner JM, Khan SA. Nicorandil-induced vasorelaxation: functional evidence for  $K^+$  channel-dependent and cyclic GMP-dependent components in a single vascular preparation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991;17(6):903-12.

Holzmann S, Kukovetz WR, Braida C, Pösch G. Pharmacological interaction experiments differentiate between glibenclamide-sensitive  $K^+$  channels and cyclic GMP as components of vasodilation by nicorandil. *Eur J Pharmacol*. 1992;215:1-7.

Bonaventura D, de Lima RG, Vercesi JA, da Silva RS, Bendhack LM. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. *Vascul Pharmacol*. 2007;46:215-22.

Bolotina VM, Najjibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994;368:850-3.

Wang ZQ, Xu JF, Wang JP, Zhao WJ, Zeng M. Involvement of guanylate cyclase and  $K^+$  channels in relaxation evoked by ferulate nitrate in rat aorta artery. *J Pharmacol Sci*. 2012;118:521-30.

Cairrão E, Santos-Silva AJ, Verde I. PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Eur J Pharmacol*. 2010;640:94-101.

Sobey CG, Faraci FM. Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1999;126:1437-43.

Zhao YJ, Wang J, Rubin LJ, Yuan XJ. Inhibition of  $K_v$  and  $K_{Ca}$  channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. *Am J Physiol*. 1997;272:H904-12.

Cox RH. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys*. 2005;42(2):167-95.

Jackson-Weaver O, Osmond JM, Riddle MA, Naik JS, Gonzalez Bosc LV, Walker BR, Kanagy NL. Hydrogen sulfide dilates rat mesenteric arteries by activating endothelial large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels and smooth muscle  $Ca^{2+}$  sparks. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(11):H1446-54.

Materazzi S, Zagli G, Nassini R, Bartolini I, Romagnoli S, Chelazzi C, Benemei S, Coratti A, De Gaudio AR, Patacchini R. Vasodilator activity of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) in human mesenteric arteries. *Microvasc Res*. 2017;109:38-44.

- Chen L, Ingrid S, Ding YG, Liu Y, Qi JG, Tang CS, DU JB. Imbalance of endogenous homocysteine and hydrogen sulfide metabolic pathway in essential hypertensive children. *Chin Med J (Engl)* 2007;120:389-93.
- Hyspler R, Tichá A, Indrová M, Zadák Z, Hysplerová L, Gasparic J, Churáček J. A simple, optimized method for the determination of sulphide in whole blood by GC-MS as a marker of bowel fermentation processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;770:255-9.
- Jiang HL, Wu HC, Li ZL, Geng B, Tang CS. Changes of the new gaseous transmitter H<sub>2</sub>S in patients with coronary heart disease. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2005;25(8):951-4.
- Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J* 2005;19:1196-8.
- Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Zaid A, Giannogonas P, Cantalupo A, Dhayade S, Karalis KP, Wang R, Feil R, Cirino G. cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. *PLoS One.* 2012;7(12):e53319.
- Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módis K, Panopoulos P, Asimakopoulou A, Gerö D, Sharina I, Martin E, Szabo C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(23):9161-6.
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237:527-31.
- Szabo C. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2017;312:C3-15.
- Wang YF, Mainali P, Tang CS, Shi L, Zhang CY, Yan H, Liu XQ, DU JB. Effects of nitric oxide and hydrogen sulfide on the relaxation of pulmonary arteries in rats. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:420-3.
- Sojitra B, Bulani Y, Putchá UK, Kanwal A, Gupta P, Kuncha M, Banerjee SK. Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide induced cardioprotection in mice. *Mol Cell Biochem.* 2012;360:61-9.
- King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK, Bradley JM, Islam KN, Calvert JW, Tao YX, Dugas TR, Kelley EE, Elrod JW, Huang PL, Wang R, Lefler DJ. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(8):3182-7.
- Félétou M. Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Endothelial Dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2016;67(5):373-87.
- Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R, Amzel LM, Berkowitz DE, Snyder SH. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res.* 2011;109:1259-68.
- Hu XQ, Zhang L. Function and regulation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today.* 2012;17(17-18):974-87.
- Sitdikova GF, Weiger TM, Hermann A. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflugers Arch.* 2010;459(3):389-97.
- Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7583-7.

Al-Magableh MR, Hart JL. Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2011;383(4):403-13.

Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(5):H2316-23.

Cheang WS, Wong WT, Shen B, Lau CW, Tian XY, Tsang SY, Yao X, Chen ZY, Huang Y. 4-aminopyridine-sensitive K<sup>+</sup> channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery. *Vascul Pharmacol.* 2010;53:94-8.

Webb GD, Lim LH, Oh VM, Yeo SB, Cheong YP, Ali MY, El Oakley R, Lee CN, Wong PS, Caleb MG, Salto-Tellez M, Bhatia M, Chan ES, Taylor EA, Moore PK. Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324:876-82.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K<sub>ATP</sub> channel opener. *EMBO J.* 2001;20(21):6008-16.

Martelli A, Testai L, Breschi MC, Lawson K, McKay NG, Miceli F, Tagliatela M, Calderone V. Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacol Res.* 2013;70:27-34.

Kiss L, Deitch EA, Szabó C. Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition. *Life Sci.* 2008;83(17-18):589-94.

Yu W, Jin H, Tang C, Du J, Zhang Z. Sulfur-containing gaseous signal molecules, ion channels and cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol.* 2018;175(8):1114-25.

Sarabu MR, McClung JA, Fass A, Reed GE. Early postoperative spasm in left internal mammary artery bypass grafts. *Ann Thorac Surg.* 1987;44:199-200.

Formica F, Ferro O, Brustia M, Corti F, Colagrande L, Bosisio E, Paolini G. Effects of papaverine and glycerylnitrate-verapamil solution as topical and intraluminal vasodilators for internal thoracic artery. *Ann Thorac Surg.* 2006;81:120-4.

He GW, Buxton BF, Rosenfeldt FL, Angus JA, Tatoulis J. Pharmacologic dilatation of the internal mammary artery during coronary bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;107:1440-4.

He GW, Fan KY, Chiu SW, Chow WH. Injection of vasodilators into arterial grafts through cardiac catheter to relieve spasm. *Ann Thorac Surg* 2000;69:625-8.

He GW, Rosenfeldt FL, Buxton BF, Angus JA. Reactivity of human isolated internal mammary artery to constrictor and dilator agents. Implications for treatment of internal mammary artery spasm. *Circulation* 1989;80:1141-50.

He GW. Arterial grafts for coronary artery bypass grafting: biological characteristics, functional classification, and clinical choice. *Ann Thorac Surg.* 1999;67(1):277-84.

He GW, Yang CQ. Use of verapamil and nitroglycerin solution in preparation of radial artery for coronary grafting. *Ann Thorac Surg* 1996;61:610-4.

He GW, Yang CQ, Starr A. Overview of the nature of vasoconstriction in arterial grafts for coronary operations. *Ann Thorac Surg.* 1995;59(3):676-83.

Sanders LH, Newman MA. Intractable postoperative internal thoracic artery spasm managed with angiographic intraluminal papaverine. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130:938-40.

Zabeeda D, Medalion B, Jakobshvilli S, Ezra S, Schachner A, Cohen AJ. Comparison of systemic vasodilators: effects on flow in internal mammary and radial arteries. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:138-41.

## F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu pregleda doktorske disertacije dipl. farm. Marije Marinko pod nazivom „**Vazodilatatorno delovanje donora azot monoksida i vodonik-sulfida na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni čoveka: uloga kalijumovih kanala**“ može se zaključiti da je kandidat ispunio postavljene ciljeve i da rezultati prikazani u disertaciji predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos, što je potvrđeno njihovim objavljivanjem u međunarodnim časopisima.

Komisija, stoga, predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan Izveštaj i nakon dobijanja saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu odobri dipl. farm. Mariji Marinko javnu odbranu doktorske disertacije.

Beograd, 28.05.2020. god.

### Članovi Komisije:

---

Dr Aleksandra Novaković, redovni profesor, mentor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Radica Stepanović-Petrović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Nina Japundžić Žigon, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

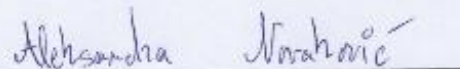
## OCENA IZVEŠTAJA O PROVERI ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Vazodilatatorno delovanje donora azot monoksida i vodonik-sulfida na izolovanoj unutrašnjoj torakalnoj arteriji i veni safeni čoveka: uloga kalijumovih kanala“, autora Marije J. Marinko, konstatujem da je utvrđeno 459 podudaranja teksta sa 296 izvora. Preklapanje teksta sa svim izvorima je manje od 1%. Detaljnim uvidom u materijal utvrđeno je da je podudarnost posledica bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, ličnih imena, opštih mesta u vezi sa temom doktorske disertacije, korišćenih mernih jedinica i skraćenica, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja koji su proistekli iz njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. Stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izjavljujem da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije, te se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

Beograd, 15.05.2020. god.

Mentor



Dr Aleksandra Novaković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet