

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КРАГУЈЕВАЦ**

1. Одлука Изборног већа

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-4387/4-2 од 23.6.2010. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата мр пх Јелене Кордић Бојиновић, под називом:

„Значај модулације калијумских канала и азот монооксида (NO) у механизму релаксантног ефекта пинацидила и пентоксифилина”

Чланови комисије су:

1. проф. др Слободан Јанковић, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација

2. проф. др Слободан Миловановић, члан, редовни професор Медицинског факултета у Фочи за ужу научну област Фармакологија и токсикологија

3. проф. др Драган Миловановић, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија са токсикологијом

2.1 Кратка биографија кандидата

Мр пх Јелена К. Кордић – Бојиновић је рођена 17.06.1977. године у Котору, Црна Гора. Током 2005. Године завршила је Фармацеутски факултет, Универзитета у Београду. Положила је стручни испит 31.01.2007. године у Министарству здравља. Од 2007. године је студент Докторских студија на смеру Експериментална и клиничка фармакологија, на Медицинском Факултету Универзитета у Крагујевцу. Од 2007. године је запослена на Високој Медицинској Школи „Милутин Миланковић“ у Београду.

2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Значај модулације калијумских канала и азот монооксида (NO) у механизму релаксантног ефекта пинацидила и пентоксифилина”

Предмет: Испитивање утицаја модулатора калијумских канала (пинацидила), али и неких познатих вазодилататора (пентоксифилина, протамин- сулфата и др.) који у свом механизму дејства укључују калијумске канале и/или азот- монооксид (NO) на мотилитет глатког мишића утеруса пацова.

Хипотезе:

- Пинацидил, отварач K^+ -канала (ОКК) доводи до релаксације глатке мускулатуре утеруса пацова, без обзира на начин активације и тип контракција, модификујући функцију K^+ -канала. У овај процес релаксације укључени су K_{ATP} канали.
- Пентоксифилин у свом механизму деловања укључује отварање калијумских канала и/или сигналне путеве NO.

2.3 Подобност кандидата

Кандидаткињи је прихваћен један рад у целини за штампу у домаћем часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

- **Кордић-Бојиновић Ј**, Јокановић Д, Станковић Д, Јанковић С, Миловановић Д. Influence of modulators of relaxant effect of pentoxifylline in isolated rat uterus. SJ CER 2010, in press. M52 1 бод.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Предмет ове докторске дисертације је проучавање улоге модулятора калијумских канала и NO у механизму релаксантног ефекта пинацидила и пентоксифилина на различите типове активности изолованог утеруса пацова. Данас се лекови из групе модулятора K^+ -канала примењују у лечењу кардиоваскуларних обољења и дијабетеса. Испитивање утицаја модулятора калијумских канала, али и неких познатих вазодилатора (попут пентоксифилина, натријум-нитропрусида) који у свом механизму укључују калијумске (K^+)-канале и/или азот-моноксид (NO) на ткиво утеруса је значајно за проналажење нових терапијских концепта у лечењу поремећаја контрактилности утеруса јер досадашњи токолитици нису сасвим решили проблем спречавања превременог порођаја или побачаја. Актуелна су истраживања ради идентификације нових места на које би могле да делују супстанце које модификују контрактилност утеруса. Такође, изнети су чврсти докази који подржавају становиште да јонски канали могу бити место за деловање различитих токолитика. K^+ канали су богато заступљени у глаткој мускулатури органа, укључујући и утерус. Они имају широку дистрибуцију у свим проучаваним типовима ћелија и представљају основу многих целуларних процеса. Једна од главних њихових функција је одржавање ћелијске екситабилности, тако што се деполаризујућим стимулусима супроставља излазна калијумска струја проузрокујући хиперполаризацију или реполаризацију, омогућавајући постизање мембранског потенцијала мировања, што обезбеђује поновно генерисање акционог потенцијала. Сада се са сигурношћу зна да поремећаји функције K^+ -канала доприносе патогенези многих болести, између којих и дисфункцији миоетријске екситабилности, која је најчешћи узрок превременог порођаја или побачаја, као и дисменореје.

Један од најбоље проучених типова, доминантан у глаткој мускулатури утеруса, јесте велики калцијум зависни калијумски канал. Током гестационог периода њихов значај се још више увећава, а нарочито током порођаја јер се њиховом инхибицијом обезбеђује повећани ниво интрацелуларног Ca^{2+} , неопходног за порођајне контракције. Значајна је улога АТФ-зависних калијумских (K_{ATP}) канала који чине

спону између метаболичког стања ћелије и побуђености ћелије, односно контрактилности. K_{ATP} канал у свом саставу има сулфониуреа рецептор за који се везују деривати сулфониурее (глибенкламид и толбутамид) и селективни су за овај тип канала. Поред ових типова регистровани су и други субтипови K^+ - канала.

Подтип, експресија, дистрибуција и функција K^+ - канала у утерусу су променљиви и зависе од метаболизма ћелије, гестационог периода, порођаја, старосног доба и др. Промене K^+ каналске експресије и активности имају апсолутни значај за контролу утерусне контрактилности.

Са детаљним упознавањем K^+ - канала, јавио се и огроман фармацеутски интерес који је утицао на синтезу и развој селективних модулатора K^+ - канала, као и ре-евалуација постојећег избора лекова и супстанци са утицајем на пропустљивост ћелијске мембране глатког мишића за K^+ - јоне (посебно вазодилатори са ткс. директним деловањем: миноксидил, пентоксифилин, диазоксид). Изнети су подаци да пинацидил, отварач K^+ - канала (ОКК), поред релаксације васкуларног глатког мишића, може да доводе и до инхибиције контрактилности утеруса, вероватно модификујући делом и функцију K_{ATP} канала.

Најновији резултати показују да неки познати снажни вазодилатори ,попут натријум- нитропрусида (донор NO), миноксидила или пентоксифилина, у свом механизму деловања укључују отварање калијумских канала, директно или посредством NO Раније смо показали да пентоксифилин проузрокује снажнију релаксацију изоловане мезентеричне артерије пацова у присуству ендотела због ослобађања NO. Ови резултати су значајни јер имплицирају на могућу примену пентоксифилина као токолитика. Раније смо показали и да калцијумски антагонисти (посебно никардипин) могу да буду потенцијални лекови за спречавање превременог побачаја и порођаја. У механизму релаксантног деловања калцијумских антагониста вероватно су делом укључени калијумски канали, али и сигнални путеви NO. У светлу ових сазнања, испитивање утицаја модулатора калијумских канала и њихове интеракције са NO на ткиво утеруса је од великог значаја, јер је он главни неуротрансмитер који иницира сигналну каскаду која обухвата протеинску фосфорилацију и узрокује релаксацију глатких мишића. NO се ослабађа из нитроглицерина, натријум-нитропрусида, натријум-нитрата и натријум-азида, за сада још недовољно разјашњеним механизмом. Недавно је показано да је хемијска реактивност азот-моноксида (NO), у односу на реактивне врсте киосеоника (РВК), значајан фактор који може утицати на интерпретацију добијених резултата. Наиме, у реакцији NO и супероксида као продукт се јавља пероксинитрит који има изразите токсичне ефекте и смањује учинак NO у погледу релаксације. Евентуалне интеракције NO донора, РВК и антиоксидативног система (АОС) могу да утичу на ефекте NO и модулаторе калијумских канала.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Циљеви. Ова докторска теза има следеће циљеве:

1. Утврдити утицај АТП-сензитивног отварача калијумских канала (пинацидила) и пентоксифилина на различите типове активације изолованог утеруса пацова

- (електричка стимулација, ацетилхолин, окситоцин), као и утицај на спонтану ритмичку активност изолованог утеруса пацова.
2. Утврдити да ли постоји селективност и разлика у афинитету отварача калијумских канала и пентоксифилина за различите типове активације глатког мишића утеруса.
 3. Испитати ефекат глибенкламида, селективног блокатора K_{ATP} канала, на контрактилност глатке мускулатуре утеруса индуковане електричном стимулацијом и окситоцином, као и утицај на спонтану ритмичку активност.
 4. Испитати да ли постоји антагонизам између пинацидила и пентоксифилина и блокатора калијумских канала (глибенкламида).
 5. Испитати да ли постоји антагонизам између пинацидила и пентоксифилина и других блокатора калијумских канала: Тетраетиламонијум (ТЕА) и 4-аминопиридин (4-АП) ради утврђивања врсте калијумских канала који учествује у механизму релаксантног дејства пинацидила и пентоксифилина.
 6. Утврдити да ли је релаксација изазвана пинацидилом код свих наведених типова активације изолованог утеруса пацова временски зависна, односно да ли се испољава толеранција.
 7. Испитати утицај температуре у медијуму са изолованим утерусом на релаксантни ефект пинацидила и пентоксифилина.
 8. Испитати да ли донор NO (натријум-нитропрурид) и пентоксифилин проузрокује релаксацију глатког мишића утеруса активирањем калијумских канала или укључивањем сигналних путева NO.
 9. Утврдити утицај пинацидила и пентоксифилина на контрактилност изолованог утеруса пацова у присуству њихових инхибитора/симулатора: метиленског плавила (инхибитор солубилне форме гванилатне циклазе), L(+)-аргинина (прекурсор у синтези NO), индометацина, протамин- сулфата, као и условима блокаде NO синтезе са L-NAME.
 10. Урадити контролне експерименте за све серије експеримената, без присуства агониста и антагониста, и контролу утицаја растварања на утерусни мишић.

Значај. Испитивање утицаја модулятора калијумских канала, али и неких познатих вазодилатора (попут пентоксифилина, натријум-нитропрусида, протамин-сулфата) који у свом механизму укључују калијумске канале и/или азот-моноксид (NO) на ткиво утеруса је значајно, како за испитивање физиологије и патофизиологије утеруса, тако и за проналажење нових терапијских концепата у лечењу поремећаја контрактилности утеруса, али и васкуларне дисфункције. Како су ограничења релативно малог броја регистрованих токолитика бројна, јасно је да би модулатори функције калијумских канала, пинацидил или пентоксифилин, били изузетно корисни у лечењу превремених контракција гравидног утеруса.

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

У досадашњим истраживањима кандидаткиња је показала да пентоксифилин проузрокује снажнију релаксацију изоловане мезентеричне артерије пацова у присуству ендотела због ослобађања NO. Такође је доказала релаксантни ефекат калцијумских антагониста (посебно никардипина), што указује да они могу да буду

потенцијални лекови за спречавање превременог побачаја и порођаја. У механизму релаксантног деловања калцијумских антагониста вероватно су делом укључени калијумски канали, али и сигнални путеви NO. У посебној серији испитивања кандидаткиња је показала и да спонтана ритмичка активност изолованог утеруса пацова, као и контракције индуковане калијумом/калцијумом, електричном стимулацијом и окситоцином, представљају погодан модел за испитивање релаксантног учинка модулятора калијумских канала и NO донора.

2.7 Методе истраживања

Експериментални модел систем

С обзиром да активност утеруса варира драстично, у зависности од тренутних функционалних потреба јединке, утерус је поред велике физиолошке улоге и изузетно значајан модел за фармаколошка испитивања. У испитивањима биће коришћен изоловани утерус непарених женки пацова соја Wistar, телесне масе од 180 до 220 грама. Животиње ће бити држане у стандардним лабораторијским условима (4-8 животиња у кавезу, при собној температури, дневно-ноћном ритму осветљења, уз појење и храну *ad libitum*. Животиње које се користе за експерименте морају бити у истој фази сексуалног циклуса. Све животиње се морају жртвовати на исти начин и без употребе средстава за омамљивање или усмрћивање. Сви прописи за коришћење пацова су одобрени од стране локалног етичког комитета за експерименте на животињама, који строго прати међународне прописе.

Фармаколошке методе

Након изоловања утерус се поставља у купатило за изоловане органе (Ugo Basile), волумена 30 ml, које је испуњено De Jalon-овим раствором, на температури од 30°C или 37°C. Овај раствор се аерише мешавином сачињеном од 97% кисеоника и 5% угљендиоксида. Инкубација изолованог утеруса траје најмање 30 min. Контракције изолованог утеруса пацова се региструју помоћу трансдјусера "Ugo Basile" и преносе на писач. Претходно оптерећење препарата је око 1 g. Регистроваће се спонтана ритмичка активност, а одређени препарати ће бити активирани помоћу калцијума, окситоцина, ацетилхолина (1mcg) и електричном стимулацијом.

За симулацију норадренергичких импулса користиће се електрична стимулација (електродом од паладора: 30% паладијум и 70% сребра) следећих параметара: фреквенција 50 Hz, напон 80 V, трајање импулса 0.3 msec, трајање пакета 5 sec. За разматрање релаксантног утицаја пинацидила на контрактилност побуђену хормонским путем користиће се окситоцин у концентрацији 0.2 nM или изражено у интернационалним јединицама 0.0001 IU. Ради проучавања утицаја отварача калијумских канала (ОКК) и њихове интеракције са донорима NO, на контрактилност глатког мишића утеруса пацова, користиће се пинацидил (10^{-8} - 10^{-4} M) и пентоксифилин (10^{-6} - 10^{-4} M), како код спонтаних контракција глатког мишића утеруса, тако и код контракција индукованих електричном стимулацијом, ацетилхолином, окситоцином и калцијумом. Током извођења различитих типова активације изолованог утеруса пацова биће испитиван механизам релаксантног ефекта различитих вазодилатора, са или без

присуства њихових потенцијалних инхибитора/синергиста (пропранолол, Л-аргинин, метиленско плаво, Л-НАМЕ, тетраетиламонијум (ТЕА), глибенкламид и 4-аминопиридин (4-АП), индометацин, протамин-сулфат и Л-НАМЕ).

Статистичка обрада података

За све ефекте експеримента у којима се примењују отварачи калијумских канала и пентоксифилин урадиће се концентрацијски-зависне криве. Вредност средње ефективне концентрације (EC_{50}) се рачуна за сваки експеримент линеарном интерполацијом између две концентрације које су проузроковале ефекте најближе ефектима 50% од максимума. Тип антагонизма се тестира „Schild“ -овом анализом. Резултати ће се изражавати као средње вредности \pm средња стандардна грешка. За тестирање значајности разлике користиће се Студентов т-тест. Вероватноћа (P) мања од 0.05 ће се сматрати статистички значајном.

2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

Ова докторска теза ће имати следеће очекиване резултате :

Растуће концентрације пинацидила проузроковаће концентрацијски зависну инхибицију спонтане ритмичке активности и контракције изолованог утеруса пацова изазване ацетилхолином, калцијумом, окситоцином и електричком стимулацијом. Степен инхибиторног ефекта пинацидила вероватно ће, за разлику од калцијумских антагониста, мање зависити од типа активације. Пинацидил ће најјачи инхибиторни ефекат испољити на контракцијама изолованог утеруса пацова изазваним ацетилхолином, јер у овом типу активације блокада калцијум зависних канала игра значајнију улогу. За очекивање је да остале типове активације пинацидил инхибише у подједнаком степену. Од блокатора калијумских канала, глибекламид у најјачем степену антагонизује релаксантно дејство пинацидила (блокирањем АТП-зависних калијумских канала). Л-аргинин, прекурсор синтезе NO, вероватно не мења инхибиторни ефект пинацидила. Пентоксифилин у вишим концентрацијама од пинацидила инхибише различите типове активације изолованог утеруса. У механизму релаксантног дејства пентоксифилина, вероватно значајнију улогу играју калијумски канали и активација гванилатне циклазе.

2.9 Оквирни садржај дисертације

Калијумски канали који могу бити место за деловање нових токолитика су богато заступљени у глаткој мускулатури органа, укључујући и утерус. Поремећаји функције калијумских канала доприносе патогенези многих болести, између којих и дисфункцији миометријске ексцитабилности, која је најчешћи узрок превременог порођаја или побачаја, као и дисменореје. Најновији резултати показују да неки познати снажни вазодилататори, попут натријум-нитропрусида (донор NO), миноксидила или пентоксифилина, у свом механизму деловања укључују отварање калијумских канала. Раније је показано да калцијумски антагонисти (посебно никардипин) могу да буду потенцијални лекови за спречавање превременог побачаја и порођаја.

У светлу ових сазнања, испитивање утицаја модулатора калијумских канала (пинацидила), али и неких познатих вазодилататора (попут пентоксифилина или протамин- сулфата) који у свом механизму укључују калијумске канале и/или азот-моноксид (NO) на глатки мишић утеруса је значајно, како за испитивање физиологије и патофизиологије утеруса, тако и за проналажење нових терапијских концепта у лечењу поремећаја контрактилности утеруса.

У испитивањима биће коришћен изоловани утерус непарених женки пацова соја Wistar, телесне масе од 180 до 220 грама, који је након изоловања постављен у купатило за изоловане органе (30 ml), у De Jalon-овом раствору, на температури од 30°C, уз оксигенирање мешавином од 97% кисеоника и 3% угљендиоксида. Контракције изолованог утеруса регистроваће су помоћу трансдјусера “Ugo Basile” и преносити на писач. Механизам релаксантног ефекта различитих вазодилататора (пинацидил, пентоксифин), са или без присуства њихових потенцијалних инхибитора/синергиста (L-аргинин, метиленско плаво, L-НАМЕ, тетраетиламонијум (ТЕА), глибенкламид и 4-аминопиридин (4-АП), индометацин, протамин-сулфат и L-НАМЕ), испитиваће се на спонтаној ритмичкој активности, али и на другим типовима активације изолованог утеруса пацова.

Растуће концентрације пинацидила и пентоксифилина проузроковаће концентрацијски зависну инхибицију спонтане ритмичке активности и контракције изолованог утеруса пацова изазване калцијумом, електричком стимулацијом и ацетилхолином. Степен инхибиторног ефекта пинацидила и пентоксифилина ће зависити од типа активације утеруса. У механизму релаксантног дејства пинацидила, као и пентоксифилина, вероватно значајну улогу играју калијумски канали и активација гванилатне циклазе.

2.10 Научна област дисертације

Медицина. Ужа област фармакологија и токсикологија.

2.11 Научна област чланова комисије

- 1. проф. др Слободан Јанковић**, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација
- 2. проф. др Слободан Миловановић**, члан, редовни професор Медицинског факултета у Фочи за ужу научну област Фармакологија и токсикологија
- 3. проф. др Драган Миловановић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија са токсикологијом

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег успеха на докторским студијама и публикованих радова, **мр пх Јелена К. Кордић – Бојиновић** испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно

постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу, где се испитују ефекти модулятора калијумских канала на релаксанти ефекат пинацидила и пентоксифилина.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза **мр пх Јелене К. Кордић – Бојиновић** бити од великог научног и практичног значаја, да се свеобухватно сагледају ефекти модулятора калијумских канала на релаксанти ефекат пинацидила и пентоксифилина на утерусу пацова.

4. Комисија предлаже Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидаткиње **мр пх Јелене К. Кордић – Бојиновић** под следећим називом „**Значај модулације калијумских канала и азот монооксида (NO) у механизму релаксантног ефекта пинацидила и пентоксифилина**” и одобри њену израду.

проф. др Слободан Јанковић, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија са токсикологијом и Клиничка фармација

проф. др Слободан Миловановић, члан, редовни професор Медицинског факултета у Фочи за ужу научну област Фармакологија и токсикологија

проф. др Драган Миловановић, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија са токсикологијом

У Крагујевцу, 9.7.2010.