

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-4869/3-4, од 29. 05. 2013. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Мр мед сци др Катарине Илле, под називом:

„Ефекти инхибиције индуцибилне циклооксигеназе-2 на кардиоваскуларни систем пацова: фокус на улогу L-аргинин-NO система и оксидативни стрес“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, председник, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
2. **Проф. др Наташа Петронијевић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија и
3. **Доц. др Иванка Зелен**, члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија.

2. Извештај комисије о подобности теме

2.1. Кратка биографија кандидата

Мр мед сци др Катарина Илле је рођена 19. јануара 1969. године у Подгорици, Република Црна Гора. Медицински факултет Универзитета у Београду је уписала 1988. године и завршила га 1996. године са просечном оценом 9.03. Положила стручни испит за доктора медицине 1997. године. Године 2001. одбранила магистарску тезу под називом „Идентификација и карактеризација глутатион S трансфераза у бубрегу човека“ на Медицинском факултету Универзитета у Београду. Годину дана касније је положила специјалистички испит из клиничке биохемије на Медицинском факултету Универзитета у Београду са одличним успехом.

Обавила је приправнички стаж на Медицинском факултету Универзитета у Београду 1996.-1997. године. У периоду 1998.-2002. године радила је као асистент приправник на предмету биохемија на Медицинском факултету Универзитета у Београду. Учествовала у тиму проф. Др Јасмине Мимић Ока који се бавио истраживањем глутатион S трансфераза што је захтевало савладавање техника протеинске хемије (хроматографије, хроматофокусирање, електрофореза, кинетске студије ензима). Од 2002.-2005. године је била руководилац у биохемијској лабораторији Завода за лабораторијску дијагностику “Hexalab” и задужена за организовање и контролисање исправности рада запослених. Такође, задужена за увођење, развој и примену система контроле квалитета и друге сложене послове у лабораторији. У периоду 2005.-2006. године ради као одговорни

биохемичар-специјалиста у огранку Дунавски Венац у Дому здравља “Др Милутин Ивковић” у Београду. Након тога, од 2007. до 2010. године била је начелник Службе за лабораторијску дијагностику у Дому здравља “Др Милутин Ивковић” у Београду. Задужена за целокупно организовање и контролисање исправности рада запослених. Такође, задужена за увођење, развој и примену система контроле квалитета и друге сложене послове у лабораторији. Од 2011. године је шеф одељења за одређивање хормона и туморских маркера у КБЦ “Звездара” у Београду.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Ефекти инхибиције индуцибилне циклооксигеназе-2 на кардиоваскуларни систем пацова: фокус на улогу L-аргинин-NO система и оксидативни стрес“

Предмет: Пратиће се ефекат инхибитора COX-2 на параметре кардиоваскуларног система пацова у току три месеца.

Хипотеза: Основна хипотеза студије јесте да хронична употреба инхибитора индуцибилне COX-2 има протромботско и прохипертензивно дејство те штетан ефекат на изоловано срце код пацова, посебно у условима исхемија/реперфузија. Претпоставља се да инхибитор индуцибилне COX-2 своје штетно дејство остварује тако што доводи до нагомилавања 20-НЕТЕ што делује вазоконстрикторно, супримира активност L-аргинин-NO система и погоршава оксидативни стрес. Такође, хипотеза студије је да се негативна дејства хроничне употребе инхибитора COX-2 на кардиоваскуларни систем могу превазићи истовременом употребом инхибитора синтезе 20-НЕТЕ.

2.3. Подобност кандидата

Кандидату је објављен један рад у целини за штампу у рецензираном часопису, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Илле К. Поређење имунохемијских метода за одређивање концентрације срчаног тропонина И код два анализатора. Медицински часопис (Крагујевац) 2013; 47(2): 76-81
M53=1 бод

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Рофекоксиб је снажан инхибитор циклооксигеназе-2 који је после неколико година примене у својству антиреуматика повучен 2004. године због сумње у безбедност за кардиоваскуларни систем те се од тада користи у истраживањима ефеката селективне инхибиције COX-2. Познато је да регулација циркулације подразумева сложену интеракцију многих контролних механизма. Међу важне факторе који регулишу циркулацију спадају и метаболити сва три метаболичка пута арахидонске киселине: циклооксигеназног, липооксигеназног и цитохром P-450 зависног. Главни метаболити циклооксигеназног пута су простаглицин (PGI₂) и тромбоксан (TXA₂). Они су присутни у физиолошким условима у квантитативном односу 2,5:1 и при томе остварују антагонистички утицај на васкуларну резистенцију, артеријски проток и тромбоцитну активност. Доминантна теорија понуђена да се објасне нежељени кардиоваскуларни ефекти рофекоксиба је истицала да инхибиција COX-2 има за последицу смањену производњу простаглицина док истовремено продукција тромбксана у тромбоцитима није промењена чиме се ремети равнотежа између ова два аутокоида.

Међутим, недавно је спроведено испитивање у коме је праћена концентрација великог броја аутокоида у плазми при хроничној употреби рофекоксиба код мишева. Показано је

да хронична употреба инхибитора COX-2 доводи до драстичног скраћења времена крварења и коагулације. Такође, показано је да концентрације метаболита простацikliна и тромбоксана у плазми животиња третираних инхибитором COX-2 нису биле различите у односу на контролну групу. Истовремено, у групи мишева третираној рофекоксибом показан је изражен пораст концентрације 20-хидрокситетраенске киселине, метаболита арахидонске киселине који настаје под утицајем ω -хидроксилазе. Ово повећање концентрације је приписано смањеном деградативном метаболизму 20-НЕТЕ за који је потребна циклооксигеназа-2. Сазнање има посебан значај у светлу чињеница које су већ познате о 20-НЕТЕ. Показано је да је 20-НЕТЕ јак вазоконстриктор, пре свега, у микроциркулацији. Своје дејство остварује инхибицијом Ca^{2+} активисаних K^+ канала и активацијом Ca^{2+} канала L-типа у глатким мишићним ћелијама. У кардиомиоцитима 20-НЕТЕ активира Ca^{2+} канале L-типа истовремено повећавајући производњу реактивних кисеоничких врста (ROS) пореклом од NADPH оксидазе.

У експериментима на изолованом срцу је показано да док егзогена администрација 20-НЕТЕ повећава величину инфаркта миокарда, претретман изолованог срца инхибитором синтезе 20-НЕТЕ смањује величину инфаркта. Недавно је показано да је повећана продукција 20-НЕТЕ у крвним судовима повезана са ендотелном дисфункцијом и повећаним васкуларним тонусом који доприносе настанку хипертензије у анималним моделима. При томе, 20-НЕТЕ повећава васкуларну експресију NADPH оксидазе, утиче на ендотелну синтезу азот монооксида (eNOS) у смислу смањења продукције азот монооксида и директно доводи до повећаног стварања супероксид анион радикала. Утицај 20-НЕТЕ на eNOS је од посебног значаја с обзиром да је познато колико је ендотелни азот монооксид (NO) важан регулатор циркулације.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Познато је да регулација циркулације подразумева сложену интеракцију многих контролних механизма. Од посебног су значаја метаболити циклооксигеназног пута, простациклин (PGI_2) и тромбоксан (TXA_2) присутни у физиолошким условима у квантитативном односу 2,5:1 и при томе са антагонистичким утицајем на васкуларну резистенцију, артеријски проток и тромбоцитну активност. Доминантна теорија понуђена да се објасне нежељени кардиоваскуларни ефекти рофекоксиба је истицала да инхибиција COX-2 има за последицу смањену производњу простацikliна док истовремено продукција тромбоксана у тромбоцитима није промењена.

Показано је, међутим, да хронична употреба инхибитора COX-2 доводи до изразитог скраћења времена крварења и коагулације при чему концентрације метаболита простацikliна и тромбоксана у плазми животиња третираних инхибитором COX-2 нису биле различите у односу на контролну групу. Са друге стране, у кардиомиоцитима 20-НЕТЕ активира Ca^{2+} канале L-типа истовремено повећавајући производњу реактивних кисеоничких врста (ROS) пореклом од NADPH оксидазе.

С обзиром на наведено, поставља се питање даљег расветљавања механизма дејства COX-2 инхибитора посебно са аспекта могућег утицаја (преко 20-НЕТЕ) на L-аргинин-NO систем и интеракцију са оксидативним стресом. Централно питање јесте да ли, у којој мери и на који начин повећана концентрација 20-НЕТЕ до које доводи хронична употреба инхибитора COX-2 доприноси настанку нежељених ефеката од стране кардиоваскуларног система. Будући да су синтетисани бројни специфични инхибитори ω -хидроксилазе (један

од њих који се често користи у истраживањима је НЕТ0016), могуће је утицати на синтезу 20-НЕТЕ. На пример, недавно је показано да је у експерименталном моделу хипертензије изазване применом андрогена 20-НЕТЕ кључни медијатор, а убрзо затим и да је могуће спречити настанак хипертензије изазване андрогенима спречавањем синтезе 20-НЕТЕ користећи инхибитор НЕТ0016.

Циљ и хипотезе студије

Главни циљ истраживања је да се испитају ефекти и механизми дејства СОХ-2 инхибитора рофекоксиба на кардиоваскуларне и кардиодинамске параметре и коронарну ауторегулацију, посебно са аспекта интеракције L-аргинин-NO система, циклооксигеназног система и оксидативног стреса код пацова. Од посебног интереса за ово истраживање јесте даље расветљавање механизма дејства инхибитора СОХ-2 на крвни притисак и параметре коагулације код пацова и евентуална модулација ефекта инхибитора СОХ-2 помоћу инхибитора синтезе 20-НЕТЕ.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Недавно је спроведено испитивање у коме је праћена концентрација великог броја аутакоида у плазми при хроничној употреби рофекоксиба код мишева. Показано је да хронична употреба инхибитора СОХ-2 доводи до драстичног скраћења времена крварења и коагулације. Такође, показано је да концентрације метаболита простациклина и тромбосана у плазми животиња третираних инхибитором СОХ-2 нису биле различите у односу на контролну групу. Истовремено, у групи мишева третираној рофекоксибом показан је изражен пораст концентрације 20-хидрокситетраенске киселине, метаболита арахидонске киселине који настаје под утицајем ω -хидроксилазе. Ово повећање концентрације је приписано смањеном деградативном метаболизму 20-НЕТЕ за који је потребна циклооксигеназа-2. Сазнање има посебан значај у светлу чињеница које су већ познате о 20-НЕТЕ. Показано је да је 20-НЕТЕ јак вазоконстриктор, пре свега, у микроциркулацији. Своје дејство остварује инхибицијом Ca^{2+} активисаних K^+ канала и активацијом Ca^{2+} канала L-типа у глатким мишићним ћелијама. У кардиомиоцитима 20-НЕТЕ активира Ca^{2+} канале L-типа истовремено повећавајући производњу реактивних кисеоничких врста (ROS) пореклом од NADPH оксидазе.

У експериментима на изолованом срцу је показано да док егзогена администрација 20-НЕТЕ повећава величину инфаркта миокарда, претретман изолованог срца инхибитором синтезе 20-НЕТЕ смањује величину инфаркта. Недавно је показано да је повећана продукција 20-НЕТЕ у крвним судовима повезана са ендотелном дисфункцијом и повећаним васкуларним тонусом који доприносе настанку хипертензије у анималним моделима. При томе, 20-НЕТЕ повећава васкуларну експресију NADPH оксидазе, утиче на ендотелну синтезу азот монооксида (eNOS) у смислу смањења продукције азот монооксида и директно доводи до повећаног стварања супероксид анјон радикала.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Експериментална студија.

Популација која се истражује

Планирано истраживање би обухватило 60 пацова (Wistar albino сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе 250 ± 50 г) груписаних у следеће експерименталне групе: а) контролна група, б) група животиња којима се даје инхибитор COX-2 у дози од 10 mg/kg телесне тежине, в) група животиња којима се дају истовремено инхибитор COX-2 у дози од 10 mg/kg телесне тежине и HET0016 у дози од 10 mg/kg телесне тежине и г) група животиња којима се после седам дана давања инхибитора COX-2 у дози од 10 mg/kg телесне тежине од осмог дана уз инхибитор COX-2 даје и HET0016 у дози од 10 mg/kg телесне тежине (ради испитивања реверзибилности очекиваних кардиоваскуларних промена).

Материјал и методе

Експерименталне групе би биле: а) контролна група, б) група животиња којима се даје инхибитор COX-2 у дози од 10 mg/kg телесне тежине, в) група животиња којима се дају истовремено инхибитор COX-2 у дози од 10 mg/kg телесне тежине и HET0016 у дози од 10 mg/kg телесне тежине и г) група животиња којима се после седам дана давања инхибитора COX-2 у дози од 10 mg/kg телесне тежине од осмог дана уз инхибитор COX-2 даје и HET0016 у дози од 10 mg/kg телесне тежине (ради испитивања реверзибилности очекиваних кардиоваскуларних промена).

Након праћења крвног притиска, времена крварења, фактора коагулације, крвне слике, биохемијских параметара, параметара оксидативног стреса: индекса липидне пероксидације (мерен као TBARS), супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) и водоник пероксида (H_2O_2) те количине ослобођеног NO (мереног у облику нитрита) као маркера L-аргинин-NO система у периоду од три месеца, животињама би се изоловало срце и перфундовало методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) при константном коронарном перфузионом притиску од $70\text{cmH}_2\text{O}$. Планирано је да буду упоређене вредности кардиодинамских параметара код различитих група експерименталних животиња ($dp/dt \max$ - максимална вредност промене притиска у левој комори, $dp/dt \min$ - минимална вредност промене притиска у левој комори, SLVP - систолни притисак у левој комори, DLVP - дијастолни притисак у левој комори, срчана фреквенца, средњи перфузиони притисак и опсег коронарне ауторегулације при задатим вредностима перфузионог притиска). У узорцима коронарног венског ефлуента би се одређивали параметри оксидативног стреса као и количина ослобођеног NO (мереног у облику нитрита) као маркера L-аргинин-NO система.

Све експерименталне процедуре ће се радити у складу са прописаним актима (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципима етике.

Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета Медицинских Наука Универзитета у Крагујевцу.

Подаци ће се представити аритметичком средином (\bar{X}), као мером централне тенденције, а стандардном девијацијом (SD) и стандардном грешком (SE) као мерама варијабилитета у групама. За статистичку обраду података била би коришћена двофакторска анализа варијансе са поновљеним мерењима, као и Студентов Т-тест за везане узорке. Статистичка значајност разлике била би постављена на нивоу од $p < 0.05$. За

мерење јачине линеарног односа између две варијабле користиће се Пирсонов тест линеарне корелације.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да ће добијени резултати допринети бољем разумевању интеракције циклооксигеназног са L-аргинин-NO системом и оксидативним стресом у кардиоваскуларном систему. Централно питање којим ће се бавити истраживање јесте да ли и у којој мери 20-НЕТЕ доприноси настанку нежељених кардиоваскуларних ефеката који настају приликом блокирања циклооксигеназе-2. Истраживање има за циљ и да покуша да покаже могући начин за превазилажење негативних кардиоваскуларних ефеката употребе инхибитора циклооксигеназе-2 путем модулације синтезе 20-НЕТЕ.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Коронарна ауторегулација је под контролом више механизма при чему су доминантни метаболички и миогени механизам чија интеракција још није потпуно испитана. Рофекоксиб је снажан инхибитор циклооксигеназе-2 који је после неколико година употребе у својству антиреуматика повучен због сумње у безбедност за кардиоваскуларни систем. Недавно је показано да хронична употреба рофекоксиба код мишева доводи до изразитог пораста концентрације у плазми једног метаболита арахидонске киселине, 20-хидрокситетраенске киселине (20-НЕТЕ) уз истовремено скраћење времена крварења и коагулације. С обзиром на чињенице које су познате о 20-НЕТЕ поставља се питање да ли и у којој мери повећање њене концентрације доприноси нежељеним кардиоваскуларним ефектима рофекоксиба.

Главна хипотеза овог истраживања је да хронична употреба инхибитора индуцибилне СОХ-2 има протромботско и прохипертензивно дејство, те штетан ефекат на изоловано срце код пацова, посебно у условима исхемија/реперфузија. Претпоставља се да инхибитор индуцибилне СОХ-2 своје штетно дејство остварује тако што доводи до нагомилавања 20-НЕТЕ што делује вазоконстрикторно, супримира активност L-аргинин-NO система и погоршава оксидативни стрес. Такође, хипотеза је да се негативна дејства хроничне употребе инхибитора СОХ-2 на кардиоваскуларни систем могу превазићи истовременом употребом инхибитора синтезе 20-НЕТЕ.

2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Проф. др Владимир Јаковљевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Експериментална физиологија.

2.12. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, председник, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
2. **Проф. др Наташа Петронијевић**, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија,
3. **Доц. др Иванка Зелен**, члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове Мр сци мед др Катарине Илле комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита ефекте и механизам дејства СОХ-2 инхибитора рофекоксиба на кардиоваскуларне и кардиодинамске параметре и коронарну ауторегулацију, посебно са аспекта интеракције L-аргинин-NO система, циклооксигеназног система и оксидативног стреса код пацова. Од посебног интереса за ово истраживање јесте даље расветљавање механизма дејства инхибитора СОХ-2 на крвни притисак и параметре коагулације код пацова и евентуална модулација ефекта инхибитора СОХ-2 помоћу инхибитора синтезе 20-НЕТЕ.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза Мр сци мед др Катарине Илле бити од великог научног и практичног значаја у смислу проучавања нежељених ефеката инхибитора циклооксигеназе-2.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Мр сци мед др Катарине Илле под називом „**Ефекти инхибиције индуцибилне циклооксигеназе-2 на кардиоваскуларни систем пацова: фокус на улогу L-аргинин-NO система и оксидативни стрес**“ и одобри њену израду.

Проф. др Владимир Јаковљевић, председник, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија

Проф. др Наташа Петронијевић, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија

Доц. др Иванка Зелен, члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија

У Крагујевцу, 25. 06. 2013.