

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата дипл. фарм. Горана Јанковића

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, одржаној 18.05.2023. године, Одлуком број 553/1 именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата дипломираног фармацеута Горана Јанковића, под насловом:

„Испитивање механизма вазодилататорног дејства (-)-епикатехина и процијанидина Б2 на изолованој унутрашњој торакалној артерији и вени сафени човека“.

Комисија у саставу:

1. Др Наташа Богавац Станојевић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет,
2. Др Слађана Шобајић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
3. Др Нина Јапунцић Жигон, редовни професор, Универзитет у Београду – Медицински факултет

прегледала је приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација дипломиранг фармацеута Горана Јанковића, под називом „Испитивање механизма вазодилататорног дејства (-)-епикатехина и процијанидина Б2 на изолованој унутрашњој торакалној артерији и вени сафени човека“, написана је на 92 стране са проредом 1 и организована у следећих 7 целина: Увод (25 стране), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (3 стране), Резултати (22 стране), Дискусија (9 страна), Закључци (1 страна) и Литература (17 страна). На почетку, докторска дисертација садржи и сажетак на српском и енглеском језику и садржај поглавља и потпоглавља, а на крају списак радова и саопштења проистеклих из докторске дисертације, кратку биографију кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације.

Дисертација је написана јасним и прегледним стилем и садржи 25 слика и 14 табела. Преглед литературе садржи 293 навода.

Увод садржи прегледно изложене податке из релевантних литературних извора који представљају теоријску основу за истраживања спроведена у оквиру ове докторске дисертације. У првом делу увода описан је процес развоја атеросклерозе као патофизиолошког супстрата исхемијске болести срца и њених хроничних (стабилна ангина пекторис) и акутних манифестација (акутни коронарни синдром). У другом делу увода приказана је подела флавоноида, са посебним освртом на флаваноле, њихове изворе и биолошке ефекте показане у епидемиолошким проспективним и клиничким студијама. У трећем и четвртном делу детаљно су описана два флаванола која су и била предмет ове дисертације, и то (-)-епикатехин и процијанидин Б2. Истакнута је њихова структура, најзначајнији извори, фармакокинетика и биолошки ефекти. У петом делу увода детаљно је описан механизам вазорелаксације посредован: 1) факторима пореклом из ендотела, 2) утицајем на промет Ca^{2+} у глаткој мускулатури и 3) утицајем на K^+ канале крвних судова. У последњем делу су изложени најбитнији разлози употребе хуманих бајпас графтова као модела за испитивање у овој докторској дисертацији.

Циљ истраживања ове докторске дисертације био је да се испитају механизми вазодилаторног деловања (-)-епикатехина, мономерног флаванола, и процијанидина Б2, једног од најзначајнијих олигомерних облика, на изолованој унутрашњој торакалној артерији и вени сафени човека. У сврху реализације главног циља, јасно су дефинисани подциљеви који су обухватили: 1) испитивање зависности вазодилаторног деловања (-)-епикатехина и процијанидина Б2 од присуства ендотела; 2) испитивање улоге сигналног пута NO/cGMP-а, као и простаглицина, у механизму ендотел-зависног вазодилаторног дејства ових флаванола; 3) дефинисање типова K^+ канала посредством којих делују вазодилаторно (-)-епикатехин и процијанидин Б2, као и испитивање да ли ови полифеноли делују вазодилаторно посредством истих типова K^+ канала на изоловану унутрашњу торакалну артерију и вену сафену; 4) испитивање укључености волтажнo-зависних калцијумских канала у механизам вазодилаторног дејства ових флаванола, као и утицај флаванола на интрацелуларни Ca^{2+} . Циљеви истраживања су добро постављени.

Поглавље **Материјал и методе** даје детаљан опис припреме ткива (неискоришћених сегмената хумане унутрашње торакалне артерије и вене сафене) и коришћеног експерименталног протокола. Испитивање је рађено у *in vitro* условима у систему за изоловане органе. Током истраживања употребљено је 178 артеријских и 156 венских сегмената узетих од 250 пацијената током бајпас операција. Употреба неискоришћених сегмената хуманих артеријских и венских бајпас графтова одобрена је од стране Етичког Одбора Института за кардиоваскуларне болести „Дедиње“.

Добијени сегменти крвних судова су у лабораторији, након уклањања масног и везивног ткива, пажљиво исецани на прстенове ширине око 3 mm. У циљу испитивања улоге ендотела у вазорелаксантном дејству испитиваних супстанци, ендотел неких прстенова је механички уклањан. Поступак постављања прстенова крвних судова у купатило за изоловане органе испуњено Кребс-Рингеровим бикарбонатним раствором, њихова еквилибрација и подешавање изометријске тензије препарата је детаљно описан.

Експериментални протокол је подразумевао употребу изолованих крвних судовима са и без ендотела. Након периода еквилибрације, прстенови крвних судова су контраховани фенилефрином, а када је контракција достигла стабилан плато (око 10-15

мин.), у водено купатило је додаван ацетилхолин у циљу испитивања присуства ендотела. Брза релаксација крвног суда указивала је на присуство, а изостанак релаксације на одсуство ендотела. Након испирања препарата свежим Кребс-Рингеровим бикарбонатним раствором током наредних сат времена, препарат је поново контрахован фенилефрином или раствором који садржи 80 mM K^+ . Када је ова контракција достигла свој плато, кумулативно су додаване растуће концентрације (-)-епикатехина (0,1-500 μ M) или процијанидина Б2 (0,001-3 μ M) и конструисане концентрацијски-зависне криве релаксације.

У циљу испитивања улоге различитих K^+ канала, компоненти cGMP сигналног пута или простациклина у механизму дејства (-)-епикатехина или процијанидина Б2, у посебним серијама експеримената су, након конструкције прве кумулативне концентрацијски-зависне криве релаксације и испирања препарата наредних сат времена, у водено купатило додавани различити блокатори/инхибитори или њихове комбинације. Дат је детаљан приказ коришћених блокатора/инхибитора, њихових улога и концентрација, као и начин растварања свих употребљених супстанци.

Да би се испитао утицај (-)-епикатехина и/или процијанидина Б2 на интрацелуларни Ca^{2+} , у посебној серији експеримената контракције су индуковане фенилефрином (10 μ M) или кофеином (25 mM) у Кребс-Рингеровом раствору који не садржи Ca^{2+} (без $CaCl_2$), а затим су кумулативно додаване растуће концентрације испитиваних супстанци. Такође, неки прстенови, у нормалном Кребс-Рингеровом раствору (са $CaCl_2$), пре контракције фенилефрином и кумулативног додавања (-)-епикатехина или процијанидина Б2, су третираны тапсигаргином или нифедипином. Експерименти извођени без додавања специфичних блокатора/инхибитора коришћени су као контрола.

За статистичко поређење кумулативних концентрацијски-зависних кривих релаксације под различитим третманом (са и без блокатора/инхибитора) коришћена је двофакторска анализа варијансе (ANOVA) са поновљеним мерењима и Бонферрони тестом за *post hoc* поређења. За испитивање значајности разлика између максималних вредности релаксације и средњих ефективних концентрација (EC_{50}) различитих група, коришћен је Студентов т-тест. Статистички значајном је сматрана вредност $p < 0,05$. За статистичке анализе коришћен је компјутерски програм SPSS (version 10.0; International Business Machines Corp, Armonk, NY), а за цртање графика компјутерски програм Sigma Plot (version 11.0; Systat Software, Inc.).

Примењена методологија је адекватно одабрана и омогућила је добијање јасних и поузданих резултата и реализацију постављених циљева.

Резултати истраживања приказани су прегледно и представљени текстуално и графички, коришћењем 25 слика и 14 табела. Груписани су у две основне целине: 1) Вазодилаторно дејство (-)-епикатехина и 2) Вазодилаторно дејство процијанидина Б2.

Дискусија обухвата детаљну анализу резултата добијених истраживањем у циљу доношења одговарајућих закључака, а уз осврт на релевантне налазе других аутора из доступних литературних извора. Поглавље Дискусија организовано је у три целине: 1) Механизам вазодилаторног ефекта (-)-епикатехина на изолованим сегментима вене сафене и унутрашње торакалне артерије; 2) Механизам вазодилаторног ефекта процијанидина Б2 на изолованим сегментима вене сафене и унутрашње торакалне артерије; и 3) Основне разлике у вазодилаторном дејству (-)-епикатехина и процијанидина Б2 на хуманој вени сафени и унутрашњој торакалној артерији.

Поглавље **Закључци** садржи сажето приказане најважније закључке проистекле из резултата истраживања и њихове анализе, а који су у складу са постављеним циљевима истраживања.

У поглављу **Литература** наведене су 243 референце које су коришћене у докторској дисертацији.

Б. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

Резултати ове докторске дисертације логично су подељени у две основне целине сходно предмету испитивања који обухвата два флаванола, један мономерни ((-)-епикатехин) и други олигомерни (процијанидин Б2).

У првом делу презентовани су резултати испитивања вазодилаторног ефекта (-)-епикатехина. Показано је да (-)-епикатехин концентрацијски-зависно релаксира прстенове хумане вене сафене и унутрашње торакалне артерије са и без ендотела. Није било статистичке значајности у осетљивости и максималној ефикасности (-)-епикатехина између препарата са и без ендотела (на оба крвна суда), али јесте међу крвним судовима (између вене и артерије). Показано је да је унутрашња торакална артерија са и без ендотела високо значајно осетљивија на (-)-епикатехин у поређењу са венном сафеном (са и без ендотела). Због показаног ендотел-независног деловања (-)-епикатехина, даља испитивања механизма дејства рађена су на препаратима без ендотела.

Приликом испитивања улоге K^+ канала у вазорелаксантном ефекту (-)-епикатехина, тестиран је утицај различитих блокатора K^+ канала: глибенкламида (селективног блокатора АТР-зависних K^+ (K_{ATP}) канала), ибериотоксина (селективног блокатора Ca^{2+} -зависних K^+ (K_{Ca}) канала велике проводљивости (BK_{Ca})), 4-аминопиридина (неселективног блокатора волтажно зависних K^+ (K_V) канала) и маргатоксина (селективног блокатора $K_V1.3$ канала). Поређење кумулативних кривих релаксације за (-)-епикатехин показало је да на унутрашњој торакалној артерији постоји статистички значајна разлика након инкубације са глибенкламидом, 4-аминопиридином, маргатоксином или ибериотоксином у односу на контролу. Слично, на вени сафени показана је статистички значајна разлика након инкубације било којег од 4 коришћена блокатора K^+ канала у односу на контролу.

У сету експеримената испитивања ефекта (-)-епикатехина на инфлукс екстрацелуларног Ca^{2+} , показана је (-)-епикатехином индукована парцијална релаксација унутрашње торакалне артерије и вене сафене преконтраховане високим K^+ . Додатно, поређење кумулативних кривих релаксације за (-)-епикатехин (са и без нифедипина; блокатора волтажно-зависних Ca^{2+} канала) показало је да на вени сафени постоји статистички значајна разлика након инкубације овим блокатором у односу на контролу.

У резултатима испитивања ефекта процијанидина Б2 на ослобађање интрацелуларног Ca^{2+} , (-)-епикатехин је изазвао концентрацијски-зависну релаксацију унутрашње торакалне артерије, без обзира да ли је контракција претходно била индукована фенилефрином или кофеином. Додавање (-)-епикатехина изолованим сегментима вене сафене под истим условима узроковало је парцијалну релаксацију прстенова претходно контрахованих фенилефрином, док у случају претходне контракције кофеином, (-)-епикатехин није показао никакав релаксантни ефекат.

Поред тога, испитан је и утицај тапсигаргина, блокатора Ca^{2+} пумпе на саркоплазматском ретикулуму (SERCA), на (-)-епикатехином индуковану релаксацију (у

Кребс-Рингеровом бикарбонатном раствору без Ca^{2+}). Поређење кумулативних кривих релаксације за (-)-епикатехин показало је да на унутрашњој торакалној артерији и вени сафени постоји статистички значајна разлика након инкубације тапсигаргином у односу на контролу.

У другом делу приказани су резултати испитивања вазодилаторног ефекта процијанидина Б2. Резултати су показали да процијанидин Б2 изазива концентрацијски-зависну релаксацију прстенова изоловане вене сафене и унутрашње торакалне артерије са ендотелом, док је релаксантни ефекат био значајно смањен након уклањања ендотела. Сходно приказаном ендотел-зависном релаксантном ефекту, даља испитивања механизма дејства процијанидина Б2 вршена су на препаратима са ендотелом. Поређење осетљивости и максималне ефикасности процијанидина Б2 између изоловане вене сафене са ендотелом и унутрашње торакалне артерије са ендотелом, као и међу препаратима ова два крвна суда без ендотела, није показало статистички значајне разлике.

Резултати испитивања улоге NO/cGMP/PKG (протеин киназа G) сигналног пута у вазорелаксантном деловању процијанидина Б2 показали су да је дошло до значајног антагонизовања релаксације оба крвна суда у присуству свих испитиваних инхибитора овог сигналног пута: L-NAME (инхибитора ендотелне NO синтазе), ODQ (инхибитора солубилне гванилат циклазе (ГЦ)), хидрококобаламина (хватача NO), с тим да је утицај ODQ на релаксацију унутрашње торакалне артерије био нешто већи у односу на релаксацију на вени сафени. Треба напоменути и да је додатак апамина (селективног блокатора K_{Ca} канала мале проводљивости (SK_{Ca})) и TRAM-34 (селективног блокатора K_{Ca} канала средње проводљивости (IK_{Ca})), у присуству L-NAME и индометацина, реверзибилног инхибитора COX, довео до статистички значајног редуковања максималног ефекта процијанидином Б2-индуковане релаксације вене сафене, али не и унутрашње торакалне артерије.

Тестирајући улогу простациклина у процијанидин Б2 индукованој релаксацији показано је да је индометацин на сегментима унутрашње торакалне артерије скоро поништио ефекте изазване нижим концентрацијама процијанидина Б2, док су ефекти виших концентрација били делимично умањени. На сегментима вене сафене, индометацином су благо, али статистички значајно, редуковани само ефекти проузроковани вишим концентрацијама процијанидина Б2.

У резултатима испитивања улоге различитих K^+ канала у вазорелаксантном ефекту процијанидина Б2, показан је утицај следећих блокатора K^+ канала: ибериотоксина, глибенкламида и 4-аминопиридина. Поређење кумулативних кривих релаксације за процијанидин Б2 показало је да на оба крвна суда постоји статистички значајна разлика након инкубације са ибериотоксином или глибенкламидом, у односу на контролу или након инкубације са 4-аминопиридином, у односу на контролу, на вени сафеини.

Добијени резултати били су основа даљег испитивања улоге NO и cGMP-а у активацији K^+ канала изазваној процијанидином Б2. У условима инхибиране синтезе и ослобађања NO и простациклина из ендотела, резултати су показали додатну значајну редукацију релаксације оба крвна суда у присуству глибенкламида. Супротно, додатком 4-аминопиридина или ибериотоксина, релаксација проузрокована процијанидином Б2 је била скоро непромењена на оба крвна суда.

У сету експеримената испитивања ефекта процијанидина Б2 на инфлукс екстрацелуларног Ca^{2+} , показана је процијанидином Б2 индукована парцијална

релаксација унутрашње торакалне артерије и вене сафене преконтраховане високим K^+ . Додатно, поређење кумулативних кривих релаксације за процијанидин Б2 (са и без нифедипина) показало је да на оба крвна суда постоји статистички значајна разлика након инкубације овим блокатором у односу на контролу.

У резултатима испитивања ефекта процијанидина Б2 на ослобађање интрацелуларног Ca^{2+} на оба крвна суда, процијанидина Б2 је индуковао концентрацијски-зависну релаксацију унутрашње торакалне артерије, претходно контраховане фенилефрином, док на контракцију индуковану кофеином није било утицаја (у Кребс-Рингеровом бикарбонатном раствору без Ca^{2+}). У случају вене сафене, кумулативно додавање процијанидина Б2 под истим условима, узроковало је парцијалну релаксацију сегмената претходно контрахованих и фенилефрином и кофеином.

Приликом испитивања улоге SERCA у вазорелаксантном деловању процијанидина Б2 на оба крвна суда, тестиран је утицај тапсигаргина, селективног блокатора овог транспортера. Овај агенс је потпуно онемогућио релаксацију унутрашње торакалне артерије узроковану ниским концентрацијама процијанидина Б2, а претходно контраховане фенилефрином. Вазорелаксантни ефекат већих концентрација процијанидина Б2 био је значајно умањен у поређењу са контролом. Са друге стране, релаксација вене сафене проузрокована процијанидином Б2 је присуством тапсигаргина драстично редукована у односу на контролу.

В. УПОРЕДНА АНАЛИЗА ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Литературни подаци о дилататорном ефекту појединачних флавоноида на изолованим хуманим крвним судовима су минимални и доста оскудни (Goncalves и сар., 2009), и, према доступним подацима, ова докторска дисертација је прва која је испитивала дејство неког флаванола на крвним судовима хуманог порекла. Док је релаксантни потенцијал катехина до сада документован на више типова артеријских крвних судова анималног порекла (Aggio и сар., 2003; Duarte и сар., 1993; Huang и сар., 1998, 1999, 2000), овом дисертацијом је први пут показан релаксантни ефекат и механизми деловања (-)-епикатехина на венском и артеријском бајпас графту.

У овој докторској дисертацији је показано да (-)-епикатехин ефикасно релаксира фенилефрином контраховане сегменате вене сафене и унутрашње торакалне артерије и да је тај ефекат ендотел-независан. Овакав налаз је у корелацији са резултатима рада Duarte и сар. (1993), прве студије која је проучавала ефекат (-)-епикатехина на неком изолованом крвном суду (аорта пацова). Међутим, у литератури се могу наћи и резултати који указују на значајан утицај (-)-епикатехина на синтезу и ослобађање релаксантних фактора пореклом из ендотела, првенствено NO (Aggio и сар., 2013; Huang и сар., 2000, 1999). Додатно, потентност и ефикасност (-)-епикатехина у овој дисертацији је већа у поређењу са претходно публикованим резултатима (Huang и сар., 2000; Aggio и сар., 2013).

Механизам вазодилататорног дејства (-)-епикатехина на хуманим бајпас графтовима, са посебним освртом на улогу различитих типова K^+ канала, по први пут је испитиван у овој докторској дисертацији. Потврђено је значајно учешће 4-аминопиридин-сензитивних K^+ канала у (-)-епикатехином индукованој релаксацији оба крвна суда. Литературни подаци наводе да је најзаступљенији подтип K_v канала у васкулатури K_v1 (Cox и Rusch, 2002), и да је у хуманој вени сафени и унутрашњој торакалној артерији показана

експресија $K_{v1.3}$ и $K_{v1.5}$ канала (Bonnet и сар., 2009; Cheong и сар., 2011; Afsar и сар., 2016). Иначе, $K_{v1.3}$ канали имају значајну улогу у пролиферацији и миграцији васкуларних глатких мишићних ћелија, што може резултирати неинтималном хиперлазијом и даљим ремоделовањем крвних судова (Cheong и сар., 2011). Резултати дисертације потврђују могућност да су $K_{v1.3}$ канали део механизма вазорелаксантног дејства (-)-епикатехина на испитиваним крвним судовима.

Док неки литературни подаци (Huang и сар. 1999,1998) потпуно искључују могућност да је активација K_{ATP} канала део вазорелаксантног механизма (-)-епикатехина, налази из дисертације сугеришу да су K_{ATP} канали, бар делимично, укључени у ефекат (-)-епикатехина на артеријском крвном суду, а да значајну улогу у дилатацији венског крвног суда остварују тек употребом високих концентрација овог флаванола. Додатно, у дисертацији је показано да су и $ВК_{Ca}$ канали укључени у (-)-епикатехином индуковану релаксацију оба испитивана крвна суда. До отварања $ВК_{Ca}$ канала може доћи дејством нитровазодилатора или ендогеног NO у различитим крвним судовима као последица активације $cGMP/PKG$ пута. Ипак, растући број доказа из литературе указује да је активација $ВК_{Ca}$ канала независна од $cGMP/PKG$ пута (Bolotina и сар., 1994; Bonaventura и сар., 2007; Wang и сар., 2012), а са њима су у сагласности и резултати из дисертације који показују да (-)-епикатехин може на оба испитивана крвна суда да отвори $ВК_{Ca}$ канале $cGMP$ -независним механизмом, односно да ова два пута делују паралелно.

У дисертацији је први пут сугерисан и потенцијални утицај (-)-епикатехина на екстрацелуларни и интрацелуларни Ca^{2+} , односно могућност да (-)-епикатехин свој ефекат остварује инхибицијом инфлуksа Ca^{2+} путем волтажно-зависних Ca^{2+} канала L -типа, што је у сагласности са претходним литературним подацима (Huang и сар., 1998), или инхибицијом ослобађања интрацелуларног Ca^{2+} из саркоплазматског ретикулума и/или стимулацијом преузимања овог јона помоћу $SERCA$. Литературни податак (Huang и сар., 1998) да (-)-епикатехин инхибише ослобађање интрацелуларног Ca^{2+} интерагујући само са IP_3 системом саркоплазматског ретикулума је у потпуној корелацији са резултатима дисертације добијеним на хуманој вени сафени, а разликује се од резултата добијеним на унутрашњој торакалној артерији, где је сугерисано додатно деловање овог флавонола на ријанодинске рецепторе. У потпуној корелацији са ткивно-специфичним деловањем (-)-епикатехина је и резултат дисертације да је активација $SERCA$ значајна за испољавање релаксантног ефекта (-)-епикатехина на оба крвна суда, али да је њен допринос већи на вени сафени него на унутрашњој торакалној артерији.

Преглед релевантне литературе указује да ефикасност и потентност процијанидинских екстраката у различитим студијама варира у зависности од коришћеног крвног суда, коришћене врсте и од експерименталних услова. У дисертацији је први пут показан вазорелаксантни ефекат изолованог процијанидина $B2$ на хуманој вени сафени и хуманој унутрашњој торакалној артерији. Ендотелна зависност деловања процијанидина $B2$ показана на овим крвним судовима корелира са одређеним подацима из литературе (Aldini и сар., 2003; Buiun и сар., 2014; Matsui и сар., 2009). Такође, поређење добијених резултата са доступним анализама људске плазме, где је показано да се концентрација процијанидина креће код здравих испитаника у наномоларним концентрацијама (Vaba и сар., 2000; Richhelle и сар., 1999), указује да у физиолошким концентрацијама процијанидин $B2$ вероватно може извршити мерљив утицај на васкуларни тонус вене сафене и унутрашње торакалне артерије.

У досадашњим студијама су предложени различити механизми вазодилаторног ефекта процијанидина B2, међу којима су отварање K^+ канала, као и утицај на NO/cGMP/PKG сигнални пут, али нема података за хумане бајпас графтове. Резултати ове дисертације показују да активирање целокупног NO/cGMP/PKG сигналног пута барем делимично посредује у релаксацији хумане вене сафене и унутрашње торакалне артерије изазваној процијанидином B2, што је у сагласности са претходним извештајима са процијанидинским екстрактима (Aldini и сар., 2003; Biyun и сар., 2014; Matsui и сар., 2009). Међутим, редукција релаксантног ефекта процијанидина B2, на оба крвна суда, у условима инхибиције ГЦ била је значајно мања него у условима смањене синтезе или ослобађања NO. Овакав резултат указује да NO-зависан ефекат, вероватно, није посредован искључиво активацијом ГЦ, па су предмет испитивања дисертације били и други NO-зависни ефекти.

Додатно, резултати дисертације сугеришу и учешће простацikliна у процијанидин B2-индукованој релаксацији оба крвна суда. Литературни податак (Chaikhounia и сар. 1986) о већој способности унутрашње торакалне артерије да произведе простацikliн у односу на вену сафену, како у базалним условима, тако и при стимулацији је у потпуној корелацији са резултатима дисертације. Нешто другачији резултат него у дисертацији добијен је у студији Aldini и сар. (2003) јер је показани значај простацikliна за релаксацију унутрашње торакалне артерије био већи него у резултатима дисертације.

EDHF (ендотел-зависни хиперполаришући фактор) се сматра резервним системом за одржавање перфузије ткива у условима смањене синтезе NO. Након стимулације ендотелних ћелија различитим агонистима, повећава се интрацелуларна концентрације Ca^{2+} , која последично активира IK_{Ca} и SK_{Ca} канале. Услед тога настаје хиперполаризација која се путем миоендотелних тесних веза преноси на глатку мускулатуру и индукује њену релаксацију, или та ендотелна хиперполаризација представља вучну силу за улазак Ca^{2+} , који индукује производњу NO и простацikliна. Налаз добијен у студији потпуно искључује могућност да EDHF доприноси релаксацији унутрашње торакалне артерије и вене сафене индукованој процијанидином B2. Овакав резултат је супротан налазу студије Hea и сар. (2002), у којој постоје јасни докази о доприносу EDHF релаксацији венског крвног суда.

У неколицини научних радова показана је значајност K_V канала у процијанидин-индукованој хиперполаризацији и последичној релаксацији различитих крвних судова (Biyun и сар., 2012; Kwan и сар., 2005; Matsui и сар., 2009). Резултати студије су у сагласности са тим налазима, имајући у виду да је показано да 4-AP-сензитивни K_V канали доприносе релаксантном деловању процијанидина B2 на оба крвна суда. Додатним испитивањима, по први пут је показано да је процијанидин B2-индуковано отварање K_V канала на оба крвна суда у потпуности последица активације NO/cGMP пута, што корелира са резултатима студија Kohlera и сар. (1998) и Neika и сар. (2018).

Досадашња испитивања улоге K_{ATP} канала у механизму дејства екстраката богатих процијанидинима, дала су неусклађене резултате. Резултати дисертације иду у корист тога да отварање ових канала ипак значајно доприноси релаксантном дејству процијанидина B2 на оба крвна суда и да је деловање испитиваног димера на K_{ATP} канале директно, а не посредовано NO/cGMP-сигналним путем. Имајући у виду да K_{ATP} канали учествују у регулацији коронарног протока крви током хипоксије, ацидозе, исхемије и исхемијског

прекондиционирања (Dellsperger, 1996), афирмативан резултат дисертације може бити од већег значаја.

Релевантни литературни подаци показују да се $ВК_{Ca}$ канали супротстављају миогеном тонусу вене сафене изложене хронично високом притиску *in vivo* (Szentiványi и сар., 1997), и да последично постоји промена ових канала у патофизиолошким условима, као што су хипертензија, дијабетес, хипоксија и исхемијска болест срца (Hu и Zhang, 2012). Резултати дисертације да на оба крва суда $ВК_{Ca}$ канали значајно доприносе деловању процијанидина Б2, као и да испитивани димер отвара $ВК_{Ca}$ канале индиректно посредством $NO/cGMP$ -сигналног пута (што је потпуно у сагласности са налазима студије Archer и сар., 1994), би могли имати значај код различитих кардиоваскуларних болести.

Значајан удео у испољавању вазорелаксантног деловања појединих једињења пореклом из биљака има и њихов утицај на промет Ca^{2+} (Han и сар., 1987; Zucchi i Ronca-Testoni, 1997). У сагласности са тим је и резултат дисертације да процијанидин Б2 редукује улазак екстрацелуларног Ca^{2+} (интерферирајући са волтажно-зависним Ca^{2+} каналима L-типа) и смањује ослобађање интрацелуларног Ca^{2+} на оба крвна суда делујући на IP_3 рецепторску каскаду, док на вени сафени његовом релаксантном дејству доприноси и деловање на ријанодинске рецепторе ендоплазматског ретикулума. Додатно, резултати дисертације сугеришу и да је стимулација SERCA неизоставан фактор испољавања вазорелаксантног дејства процијанидина Б2 на оба крвна суда и да су индукција активности SERCA или смањено интрацелуларно ослобађање Ca^{2+} само последични ефекти активације $NO/cGMP$ пута, а не директни ефекти процијанидина Б2, што је у сагласности са релевантним литературним подацима (Adachi и сар. 2004; Khan и сар., 1998).

Г. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Научни радови објављени у врхунским часописима међународног значаја (M21)

1. Marinko M, Jankovic G, Milojevic P, Stojanovic I, Nenezic D, Novakovic A. (-)-Epicatechin-induced relaxation of isolated human saphenous vein: Roles of K^+ and Ca^{2+} channels. *Phytotherapy research* 2018;32:267-275.

Научни радови објављени у истакнутим часописима међународног значаја (M22)

2. Novakovic A, Marinko M, Jankovic G, Milojevic P, Stojanovic I, Nenezic D, Kanjuh V, Yang Q, He GW. Endothelium-dependent vasorelaxant effect of procyanidin B2 on human internal mammary artery. *Eur J Pharmacol* 2017; 807: 75-81
3. Novakovic A, Marinko M, Vranic A, Jankovic G, Milojevic P, Stojanovic I, Nenezic D, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He GW. Mechanisms underlying the vasorelaxation of human internal mammary artery induced by (-)-epicatechin. *Eur J Pharmacol* 2015;762:306-12.
4. Jankovic G, Marinko M, Milojevic P, Stojanovic I, Nenezic D, Kanjuh V, Yang Q, He GW, Novakovic A. Mechanisms of endothelium-dependent vasorelaxation induced by procyanidin B2 in venous bypass graft. *J Pharmacol Sci* 2020; 142:101-108.

САОПШТЕЊА

Саопштења са међународног скупа штампана у изводу (МЗ4)

1. Novakovic A, Vranic A, Jankovic G, Stojanovic I, Milojevic P, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He G.-W. Cardioprotective effect of (-) epicatechin. 82nd The European Atherosclerosis Society (EAS) Congress, 31 May - 3 June 2014, Madrid, Spain. *Atherosclerosis*. 2014;235(2):e111.
2. Novakovic A, Vranic A, Jankovic G, Stojanovic I, Milojevic P, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He G.-W. Relaxation of arterial graft induced by epicatechin. World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2014, 4 – 7 May 2014, Melbourne, Australia. *Global Heart* 2014;9(1):e220.
3. Novakovic A, Marinko M, Vranic A, Jankovic G, Stojanovic I, Milojevic P, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He G.-W. Epicatechin induced vasorelaxation of human internal mammary artery. 83rd Congress of the European Atherosclerosis Society, 22-25 March, Glasgow, Scotland. *Atherosclerosis* 2015;241(1): e50.
4. Novakovic A, Marinko M, Vranic A, Jankovic G, Stojanovic I, Milojevic P, Ugresic N, Kanjuh V, Yang Q, He G.-W. Mechanisms underlying the vasorelaxation of human internal mammary artery induced by epicatechin. 17th International Symposium on Atherosclerosis, may 23-26, 2015, Amsterdam, The Netherlands.
5. Marinko M, Jankovic G, Nenezic D, Stojanovic I, Milojevic P, Kanjuh V, Yang Q, He GW, Novakovic A. Cardiovascular protection by dietary epicatechin. European Congress on Preventive Cardiology (EuroPrevent 2017), 6-8 April 2017, Malaga, Spain. *European Journal of Preventive Cardiology* 2017;24 (Suppl.1):S85.
6. Marinko M, Novakovic A, Jankovic G, Nenezic D, Stojanovic I, Milojevic P, Kanjuh V, Yang Q, He GW. Vasodilation as a mechanism of cardioprotection induced by epicatechin. 11th World Congress on Polyphenols Applications, June 20-21, 2017, Vienna, Austria. *Journal of International Society of Antioxidants in Nutrition and Health (JISANH)* 2017;3(4):p126
7. Novakovic A, Marinko M, Jankovic G, Nenezic D, Stojanovic I, Milojevic P, Kanjuh V, Yang Q, He GW. Vasorelaxant effect of procyanidin B2 on human internal mammary artery. 11th World Congress on Polyphenols Applications, June 20-21, 2017, Vienna, Austria. *Journal of International Society of Antioxidants in Nutrition and Health (JISANH)* 2017;3(4):p136.

Д. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Последњих двадесетак година флаваноли су једна од најчешће испитиваних група флавоноида у биомедицинским наукама. Подаци о дилататорном ефекту појединачних флавоноида на изолованим хуманим крвним судовима су минимални и доста оскудни (Goncavales и сар., 2009), док, према доступним подацима, дисертација дипл. фарм. Горана Јанковића је прва која је испитивала дејство неког флаванола на крвним судовима хуманог порекла. Први пут је показан релаксантни ефекат и механизми деловања (-)-епикатехина на венском и артеријском бајпас графту. Додатно, резултати студије су једни од малобројних који су показали вазорелаксантна својства изолованог процијанидина и његове могуће механизме деловања. Релевантни литературни подаци су указали да екстракти различитог порекла богати процијанидинима индукују снажну ендотел-зависну

релаксацију више типова крвних судова (Aldini и сар., 2003; Byun и сар., 2014; Matsui и сар., 2009). Међутим, у већини студија, крвни судови су били анималног порекла и коришћени су биљни екстракти, тако да није било могуће проценити допринос индивидуалних супстанци укупном вазорелаксантном ефекту.

Верујемо да се допринос ове дисертације огледа и у чињеници да би вазорелаксантни ефекат испитиваних флаванола, бар делимично, могао допринети антиатерогеном ефекту артеријског и венског графта. Непобитна је чињеница да су у 18% случајева показане промене у венском графту одмах након оперативног лечења (акутна тромбоза), а у 20-50% случајева након 5 година јављају се значајне атеросклеротске промене (Dacey и сар., 2011; Vural и сар., 2001). У око 40% случајева након 10 година од оперативног захвата венски графт је потпуно оклудираан, и код још 30% њих је угрожен проток (Goldman и сар., 2004; Vural и сар., 2001). У светлу комплексних механизма који леже у релативно брзом пропадању хуманих бајпас графтова, продужење проходности крвних судова који се користе у ту сврху и даље представљају изазов, а одређене истраживачке групе континуирано раде на проналажењу најбоље методе за превазилажење овог проблема.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

- Aggio A, Grassi D, Onori E, D'Alessandro A, Masedu F, Valenti M, Ferri C. Endothelium/nitric oxide mechanism mediates vasorelaxation and counteracts vasoconstriction induced by low concentration of flavanols. *Eur J Nutr.* 2013;52:263-72.
- Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Facino RM. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardioprotection. *Life Sci.* 2003;73:2883-98.
- Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of carbydotoxin sensitive K^+ channels by cGMP-dependent protein kinase. *PNAS.* 1994;91:7583-87.
- 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- β /NFAT axis. *Circulation.* 2009;120:1231-40.
- Bolotina VM, Najibi SN, Palacino JJ, Pagano PJ, Kohen, RA. Nitric oxide directly activates Ca^{2+} -dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994;368:850-853.
- Byun EB, Sung NY, Yang MS, Song DS, Byun EH, Kim JK, Park JH, Song BS, Lee JW, Park SH, Byun MW, Kim JH. Procyanidin C1 causes vasorelaxation through activation of the endothelial NO/cGMP pathway in thoracic aortic rings. *J Med Food.* 2014;17:742-748.
- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* 2004;10:1200-1207.
- Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J. Bioavailability of epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res.* 2000;33:635-41.
- Duarte J, Pérez Vizcaino F, Utrilla P, Jiménez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol.* 1993;24:857-62.

- Huang Y, Chan NW, Lau CW, Yao XQ, Chan FL, Chen ZY. Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-)epicatechin. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1427:322-28.
- Huang Y, Yao XQ, Tsang SY, Lau CW, Chen ZY. Role of endothelium/nitric oxide in vascular response to flavonoids and epicatechin. *Acta Pharmacol Sin*. 2000;21:1119-24.
- Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci*. 1998;63:275-83.
- Cox RH, Rusch NJ. New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure. *Microcirculation*. 2002;9:243-257.
- 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 KV1.3 channel blockers. *Cardiovasc Res*. 2011;89:282-89.
- Wang N, Ko SH, Chai W, Li G, Barrett EJ, Tao L, Cao W, Liu Z. Resveratrol recruits rat muscle microvasculature via a nitric oxide-dependent mechanism that is blocked by TNF α . *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300:195-201.
- Matsui T, Korematsu S, Byun EB, Nishizuka T, Ohshima S, Kanda T. Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K⁺ channel activations. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73:2246-51.
- Richelle M, Tavazzi I, Enslin M, Offord EA. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr*. 1999;53:22-6.
- Chaikhouni A, Crawford FA, Kochel PJ, Olanoff LS, Halushka PV. Human internal mammary artery produces more prostacyclin than saphenous vein. *J thorac cardiovasc surg*. 1986;92:88-91.
- He GW. Nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries and veins. *J card surg*. 2001;17:317-23.
- Kwan CY, Zhang WB, Nishibe S, Seo S. A novel in vitro endothelium dependent vascular relaxant effect of Apocynum venetum leaf extract. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32:789-795.
- Matsui T, Korematsu S, Byun EB, Nishizuka T, Ohshima S, Kanda T. Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K⁺ channel activations. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73:2246-51.
- Köhler R, Schönfelder G, Hopp H, Distler A, Hoyer J. Stretch-activated cation channel in human umbilical vein endothelium in normal pregnancy and in preeclampsia. *J Hypertens*. 1998;16:1149-56.
- Naik JS, Walker BR. Endothelial-dependent dilation following chronic hypoxia involves TRPV4-mediated activation of endothelial BK channels. *Pflugers Arch*. 2018;470:633-648.
- Dellsperger KC. Potassium channels and coronary circulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23:1096-1101.
- Szentiványi M, Bérczi V, Hüttl T, Reneman RS. Venous myogenic tone and its regulation through K⁺ channels depends on chronic intravascular pressure. *Circulation*. 1997;81:109-14.
- Hu XQ, Zhang L. Function and regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today*. 2012;17:974-87.
- Han C, Abel PW, Minneman K.P. Alpha 1-adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca²⁺ in smooth muscle. *Nature*. 1987;329:333-5.

Khan SA, Higdon NR, Meisheri KD. Coronary vasorelaxation by nitroglycerin: involvement of plasmalemmal calcium-activated K^+ channels and intracellular Ca^{2+} stores. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284:838–46.

Zucchi R, Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev.* 1997;49:1–52

Б. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу прегледа докторске дисертације дипл. фарм. Горана Јанковића под називом „Испитивање механизма вазодилататорног дејства (-)-епикатехина и процијанидина Б2 на изолованој унутрашњој торакалној артерији и вени сафени човека“ може се закључити да је кандидат испунио постављене циљеве и да резултати приказани у дисертацији представљају оригиналан и значајан научни допринос, што је потврђено њиховим објављивањем у међународним часописима.

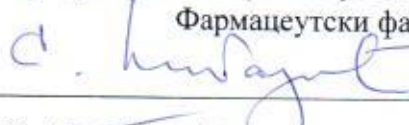
Комисија, стога, предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и након добијања сагласности Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду одобри дипл. фарм. Горану Јанковићу јавну одбрану докторске дисертације.

Београд, _____ . год.

Чланови комисије:



Др Наташа Богавац Станојевић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет,



Др Слађана Шобајић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет



Др Нина Јапунцић Жигон, редовни професор, Универзитет у Београду – Медицински факултет