

**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 маг. фарм. Милице Гајић Бојић

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, одржаној 19.10.2023. године, Одлуком број 2522/2 именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата маг. фарм. Милице Гајић Бојић, под насловом:

**„Васкуларна активност позитивних алостерних модулатора GABA<sub>A</sub> рецептора код пацова”**

Комисија у саставу:

1. Др Ранко Шкрбић, редовни професор, Универзитет у Бањалуци – Медицински факултет, председник Комисије
2. Др Бојан Марковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет,
3. Др Ања Сантрач, научни сарадник, Syneos Health, Београд

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

**ИЗВЕШТАЈ**

**А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Докторска дисертација маг. фарм. **Милице Гајић Бојић**, под називом **„Васкуларна активност позитивних алостерних модулатора GABA<sub>A</sub> рецептора код пацова”**, написана је на 91 страни са једноструким проредом и организована у следећих 7 целина: Увод (22 стране), Циљеви истраживања (1 страна), Методологија (11 страна), Резултати (33 стране), Дискусија (10 страна), Закључак (2 стране) и Литература (12 страна). На почетку, докторска дисертација садржи сажетак на српском и енглеском језику и садржај поглавља/потпоглавља, а на крају 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 56 слика и 14 табела. Преглед литературе садржи 146 навода.

**Увод** садржи преглед информација из литературних извора који су од значаја за теоријску основу истраживања која су спроведена у оквиру докторске дисертације, а организован је у девет потпоглавља. У првом делу описана је ГАВА-ергичка трансмисија, структура ГАВА<sub>A</sub> рецептора (ГАВА<sub>A</sub>R), те процеси синтезе и разградње ГАВА-е. У другом потпоглављу описана је периферна улога ГАВА-е и ГАВА<sub>A</sub>R, издвојени су литературни подаци о нивоима експресије подјединица ГАВА<sub>A</sub>R у периферним ткивима и органима, те подаци о клиничкој релевантности примене ГАВА-е и модулятора ГАВА<sub>A</sub>R у новим терапијским индикацијама. Улога ГАВА-е у кардиоваскуларном систему описана је у трећем потпоглављу увода, где су представљени резултати клиничких студија који указују на антихипертензивно дејство егзогене ГАВА-е. У четвртном потпоглављу, на основу информација из литературних извора о експресији различитих подјединица ГАВА<sub>A</sub>R у васкуларним ткивима, описани су васкуларни ГАВА<sub>A</sub>R. Наиме, поред података о експресији, представљени су и резултати фармаколошких студија који указују да дејством агониста ГАВА<sub>A</sub>R долази до смањења миогеног тонуса артерија, те је тако појам "васкуларни" ГАВА<sub>A</sub>R усвојен као релевантан за функционалне ГАВА<sub>A</sub>R у крвним судовима. Након тога, у петом потпоглављу описани су интрацелуларни протеини који ступају у интеракције са ГАВА<sub>A</sub>R, у циљу сагледавања потенцијалних супстрата интрацелуларне комуникације са "васкуларним" ГАВА<sub>A</sub>R. Поред бројних киназа и фосфатаза које су укључене у активацију и деактивацију рецептора, у овом поглављу представљени су интрацелуларни протеини, као што су: протеин везан за ГАВА<sub>A</sub>R (ГАВА<sub>A</sub>RAP), Plic-1 протеин, протеин 1 повезан са *Huntington*-ом (HAP1), фактор интеракције са ГАВА<sub>A</sub>R (GRIF-1), BIG2 протеин, GODZ протеин и радикасин. Наведени протеини ступају у интеракције са интрацелуларним доменима ГАВА<sub>A</sub>R и тако учествују у регулацији мембранског транспорта рецептора и његове локализације. У шестом потпоглављу описани су позитивни алостерни модулатори (ПАМ) ГАВА<sub>A</sub>R са фокусом на лиганде селективне за бензодиазепинско (БЗД) везно место на ГАВА<sub>A</sub>R. Представљена је фармакологија (механизам дејства и фармаколошки ефекти) бензодиазепаина као клинички најзначајнијих ПАМ-ова ГАВА<sub>A</sub>R (диазепам, мидазолам), те золпидема који нема БЗД структуру, али је такође ПАМ селективан за БЗД везно место. Затим су описани ново-синтетисани ПАМ-ови селективни за ГАВА<sub>A</sub>R који у рецепторском агрегату садрже  $\alpha 4$  (ХНе-III-074),  $\alpha 5$  (MP-III-022, MP-III-058, GL-II-73, XLi-093) или  $\alpha 6$  (DK-I-56-1) подјединицу, као и један неселективан и високо ефикасан ПАМ (SH-I-048A). Представљени ПАМ-ови последњих година заузимају важно место у фармаколошким истраживањима модулације одређених типова ГАВА<sub>A</sub>R у различитим моделима болести, те се у овом поглављу отвара могућност њихове примене у карактеризацији "васкуларних" ГАВА<sub>A</sub>R. Наведени су познати литературни подаци о селективности и ефикасности описаних лиганата који делују као модулатори на ГАВА<sub>A</sub>R који садрже  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  или  $\alpha 6$  подјединицу у комбинацији са  $\beta 3$  и  $\gamma 2$  подјединицом. У седмом потпоглављу описани су васкуларни ефекти стандардних бензодиазепаина који се дуго примењују у клиничкој пракси (диазепам, мидазолам), тако што су представљени резултати клиничких и предклиничких студија који указују на њихова директна вазодилатацијска својства. Најважнији механизми контракције и релаксације глатко-мишићне ћелије крвног суда описани су у осмом потпоглављу увода, док је у деветом потпоглављу указано на значај мерења васкуларне контрактилности. У последњем уводном поглављу наглашен је значај методологије

истраживања изолованог ткива у купатилу са посебним акцентом на изоловане крвне судове. Описан је принцип изометријског мерења контрактилности, те разноврсност узорака периферних ткива за *in vitro* мерења на купатилу за изоловане органе.

**Циљеви рада** били су делимична структурна карактеризација "васкуларних" GABAR у торакалној аорти пацова, те фармакодинамска карактеризација изабраних ПАМ-ова БЗД везног места на GABAR кроз функционалне тестове у купатилу са изолованим сегментима торакалне аорте пацова. Ова два основа циља дефинисана су у виду четири засебне целине, тако да је свака представљала посебан циљ везан за примену посебне методе. Први циљ била је идентификација информационе рибонуклеинске киселине (иРНК) за  $\alpha(1-6)$  подјединице GABAR у хомогенату торакалне аорте *Wistar* пацова, применом *real time* ланчане реакције полимеразе (qPCR). Други циљ била је имунохистохемијска анализа експресије и локализације протеина  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  и  $\gamma 2$  подјединице GABAR на попречном пресеку парафински укалупљене торакалне аорте пацова соја *Wistar*. Трећи циљ било је утврђивање васкуларне активности GABA-е и различитих неселективних и селективних ПАМ-ова БЗД места везивања на GABAR (диазепам, мидазолам, золпидем, SH-I-048A, MP-III-022, MP-III-058, GL-II-73, GL-II-74, XHe-III-074, DK-I-87-1, DK-I-56-1, XLi-093), и то у погледу остварене релаксације фенилефрином (ФЕ)- преконтрахованих прстенова пацовске аорте, те у погледу супресивних ефеката испитиваних супстанци на ФЕ контракцију, при чему би се испољени вазодилатацијски ефекти тестираних ПАМ-ова поредили са референтним вазодилататором – празосином. Крајњи, четврти циљ било је испитивање антагонистичког дејства различитих специфичних антагониста (PK11195, бидукулин, флумазенил, XLi-093) на вазодилатацијске ефекте тестираних ПАМ-ова, у оквиру мерења изометријске контракције на изолованим прстеновима пацовске аорте, како би се установили механизми вазоактивности и одговорна места везивања на "васкуларном" GABAR.

Циљеви рада су били добро дефинисани.

Поглавље **Методологија** наводи детаљан опис коришћене методологије и организовано је у 9 потпоглавља: Супстанце, Животиње, Припрема ткива, Квалитативна RT-PCR метода за идентификацију  $\alpha$  подјединица GABAR у аорти пацова, Имунохистохемијска метода за идентификацију  $\alpha 1-6$  и  $\gamma 2$  подјединица у аорти пацова, Мерење изометријске контракције прстенова пацовске аорте у присуству различитих лигананда GABAR (диазепам, мидазолам, золпидем, SH-I-048A, XHe-III-074, MP-III-022, MP-III-058, XLi-093, GL-II-73, GL-II-74, DK-I-87-1 и DK-I-56-1), Експериментални протоколи за утврђивање васкуларне активности различитих ПАМ-ова GABAR, Експериментални протоколи за утврђивање васкуларне активности различитих ПАМ-ова GABAR у присуству специфичних антагониста, Статистичка анализа.

Током истраживања употребљено је око 250 пацова *Wistar* соја. Коришћени су адултни пацови оба пола, тежине 250-300 g. Приликом рада са експерименталним животињама примењивани су етички принципи дефинисани Правилником за рад са експерименталним животињама Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, одговарајућим законским и подзаконским актима Републике Србије, и ЕУ директивом 2010/63/ЕУ. Узорци торакалне аорте изоловани су из пацова анестезираних комбинацијом анестетика кетамина и ксилазина. Одређени број узорака анализиран је на *real time* ланчаној реакцији полимеразе

(*qPCR*) и имунохистохемијском методом, а највећи број искоришћен је за мерење изометријске контракције у купатилу за изоловане органе.

После изолације (по Тризол протоколу) и квантификације РНК (на *BioSpec* Нано спектофотометру) у узорцима, РНК је преведена у комплементарну ДНК која је после детектована на *qPCR* у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију. Коришћени су прајмери за гене од интереса: за  $\alpha$  субјединице *GABA<sub>A</sub>* рецептора (*Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*), као и за *Actb* (бета актин) као *house-keeping* ген. Узорци за имунохистохемијску анализу су, након фиксације у формалину и обраде у ткивном процесору (*Leica TP1020*, *Leica Biosystems*, САД) укалупљени у парафинске пресеке дебљине 4-5  $\mu\text{m}$ , а потом инкубирани одговарајућим разблажењима примарних антитела за  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  и  $\gamma 2$  подјединице *GABAR*, те секундарним антителом коњугованим са полимерима означеним пероксидазом хрена (eng. *horseradish peroxidase*, *HRP*). Извођење и анализирање имунохистохемијске реакције извршено је у Центру за биомедицинска истраживања, Медицински факултет, Универзитет у Бањалуци.

У оквиру потпоглавља Мерење изометријске контракције детаљно је описана методологија мерења изометријске контракције препарата пацовске аорте у купатилу за рад са изолованим органима (*Panlab*, Шпанија). У потпоглављу Експериментални протоколи даје се детаљан опис следећих експеримената: мерење релаксације преконтрахованих препарата у присуству различитих ПАМ-ова *GABAR*, улога ендотела у диазепам-индукованој релаксацији ФЕ-преконтрахованих препарата, испитивање ефеката различитих ПАМ-ова *GABAR* на ФЕ-индуковану контракцију препарата, испитивање васкуларних ефеката празосина, бикукулина, флумазенила, РК11195 и XLi-093 на ФЕ-преконтрахованим препаратима, испитивање антагонистичког утицаја бикукулина и РК11195 на васкуларне ефекте диазепама код ФЕ-преконтрахованих препарата, испитивање антагонистичког утицаја XLi-093 на васкуларне ефекте МР-III-058 код ФЕ-преконтрахованих препарата, испитивање антагонистичког утицаја флумазенила на васкуларне ефекте МР-III-058 код ФЕ-преконтрахованих препарата. У сваком од експерименталних протокола наведене су концентрације супстанци, начини преконтракције препарата, временско трајање инкубације, контролно мерење, као и начин изражавања васкуларног одговора препарата пацовске аорте.

У потпоглављу Статистичка анализа за сваку методу наведено је која је статистика коришћена и који је софтвер примењен за обраду резултата.

За резултате мерења изометријске контракције статистичка анализа извршена је применом *LabChart 7 Pro* (*ADInstruments*) и *SigmaPlot 11* (*Systat Software Inc.*) софтвера, док је за обраду резултата *qPCR* анализе примењен *GraphPad Prism 5.01* (*GraphPad Software*). Резултати имунохистохемијске анализе били су дескриптивни и нису захтевали статистичку анализу.

Примењена методологија је адекватна за реализацију постављених циљева дисертације.

**Резултати** истраживања приказани су на прегледан начин, текстуално и графички, коришћењем 36 слика и 9 табела. Груписани су у четири веће целине: Резултати *qPCR* анализе за идентификацију  $\alpha$  подјединица *GABAR* у аорти пацова, Резултати имунохистохемијске анализе за идентификацију  $\alpha(1-6)$  и  $\gamma 2$  подјединица *GABAR* у аорти

пацова и Резултати мерења изометријске контракције прстенова пацовске аорте у присуству различитих ПАМ-ова GABAR и специфичних антагониста.

У оквиру прве и друге целине приказани су резултати везани за идентификацију, локализацију и семи-квантификацију  $\alpha(1-5)$  и  $\gamma 2$  подјединица GABAR, док су у оквиру треће и четврте целине представљени резултати васкуларне активности тестираних ПАМ-ова, у одсуству и присуству специфичних антагониста.

**Дискусија** садржи анализу добијених експерименталних резултата на основу које су донети одговарајући закључци истраживања, уз преглед и поређење са резултатима који су доступни у литератури. Поглавље Дискусија написано је у осам целина које прате излагање резултата: Експресија „васкуларних“ GABAR, Васкуларна активност GABA-е, васкуларна активност неселективних ПАМ-ова, Васкуларна активност  $\alpha 5$ -селективних ПАМ-ова, Васкуларна активност  $\alpha 1$ -,  $\alpha 4$ - и  $\alpha 6$ -селективних ПАМ-ова, Заједничке одлике васкуларне активности тестираних ПАМ-ова, Васкуларна активност специфичних антагониста за ПАМ-ове и Антагонистички утицај специфичних антагониста на васкуларне ефекте ПАМ-ова GABAR.

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

У поглављу **Литература** наведено је 146 референци које су коришћене у докторској дисертацији, цитираних Харвардским стилем.

## **Б. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА**

Резултати ове докторске дисертације изложени су кроз четири целине, у складу са постављеним циљевима истраживања.

У првој целини представљени су резултати RT-PCR анализе за експресију иРНК *gabra1*, *gabra2*, *gabra3*, *gabra4*, *gabra5* и *gabra6* у хомогенату торакалне аорте пацова.

Приказани агарозни гелови (обојени са 1,8%-ним етидијум бромидом) указују на детекцију сигнала за подјединице:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  и  $\alpha 5$ . Интересантно је да  $\alpha 6$  подјединица није детектована. Подјединице  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  дале су јасну, једноструку траку, док су подјединице  $\alpha 4$  и  $\alpha 5$  дале једну, али мање видљиву траку, што указује да су њихови нивои експресије значајно нижи у поређењу са  $\alpha 1-3$ . Ипак, кад се сви добијени сигнали упореде са експресијом гена домаћина (актином), нивои експресије за идентификоване *gabra1-5* значајно су слабији (потребан је већи број циклуса за њихову идентификацију). Као позитивна контрола за експресију  $\alpha$  подјединица GABAR узета је РНК из хомогената мозга пацова, што је оправдано резултатима RT-PCR анализе, где су све испитиване  $\alpha$  подјединице очекивано дале јасно видљиве траке експресије.

У другој целини приказани су резултати имунохистохемијске анализе за идентификацију протеина  $\alpha 1-6$  и  $\gamma 2$  подјединице GABAR. Попречни пресеци пацовске аорте анализирани су светлосним микроскопом, при чему је смеђа обојеност структуре указивала на њену имунореактивност. Позитивна контрола представљена је за сваку од тестираних подјединица, тако што је у специфичној регији мозга пацова, за коју се из литературних извора поуздано зна да у значајној мери поседује дату подјединицу GABAR, јасно видљива

смеђа обојеност, што је интерпретирано као позитиван сигнал експресије. Попречни пресеци пацовске аорте са карактеристичним смеђим бојењем били су они третирани са примарним антителима за  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  и  $\gamma 2$  подјединице, што није био случај за пресеке третиране са примарним антителима за  $\alpha 6$  GABAR подјединицу. На свим пресецима пацовске аорте који су показали имунореактивност јасно се види да је позитиван сигнал експресије присутан у глатко-мишићном слоју, док су еластична влакна, положена између глатко-мишићних ћелија, остала необојена. Поред имунохистохемијске идентификације, извршена је и семи-квантификација, у циљу процене интензитета имунореактивности подјединица GABAR у торакалној аорти пацова. Применом стандардних протокола, на основу интензитета сигнала и броја обојених ћелија и у поређењу са контролним пресецима, утврђено је да торакална аорта пацова има високу оцену имунореактивности за подјединице  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ , средњу оцену имунореактивности за подјединице  $\alpha 5$  и  $\gamma 2$ , ниску оцену имунореактивности за  $\alpha 4$  подјединицу, док за  $\alpha 6$  подјединицу GABAR имунореактивност није примећена. Овај семи-квантитативни налаз имунохистохемијске анализе у корелацији је са резултатима RT-PCR анализе.

У трећој целини представљени су резултати васкуларне активности GABA-е и тестираних ПАМ-ова. GABA није показала васкуларну активност на ФЕ-преконтрахованим препаратима пацовске аорте, што је утврђено након кумулативног додавања GABA-е у купатило у опсегу концентрација од  $10^{-8}$  М до  $10^{-4}$  М. С друге стране, вазодилатацијски ефекти већине ПАМ-ова, тестирани при истом концентрацијском опсегу, били су изражени, како на ФЕ- тако и на КСI-преконтрахованим препаратима. Релаксација је изражена у процентима смањења референтне преконтракције. Генерално посматрано, проценти релаксације тестираних ПАМ-ова (диазепам, мидазолам, SH-I-048A, MP-III-022, MP-III-058, XHe-III-074, DK-I-56-1) за ФЕ-преконтракцију износили су најчешће 60-90%, док је за КСI-преконтракцију релаксација била слабије изражена и износила је око 40-60%. За разлику од већине осталих тестираних ПАМ-ова, за золпидем је утврђена скромна васкуларна активност, јер у поређењу са контролним растварачем није било статистички значајне разлике у одговорима код ФЕ-преконтрахованих препарата. На графички представљеним кривама односа концентрација-релаксација видљиво је да поред концентрацијски-зависних и преконтракција-зависних одговора, вазодилатацијски ефекти за све испитиване ПАМ-ове имају и реверзибилну природу, јер се након вишеструког испирања препарата на крају протокола региструје значајно повећање тензије (условљено уклањањем претходно присутног ПАМ-а). У протоколу где је испитивана улога ендотела за остварене вазодилатацијске ефекте диазепама, утврђена је статистички значајна разлика у одговорима између препарата пацовске аорте са очуваним ендотелом (диазепам изазвао релаксацију од око 87%) и препарата са оштећеним (огољеним) ендотелом (диазепам изазвао релаксацију од 49%), што упућује на делимично ендотел-зависне механизме релаксације (вредности  $pEC_{50}$  за обе групе препарата нису се значајно разликовале). У протоколима где су испитивани супресивни ефекти тестираних ПАМ-ова (при три различите концентрације:  $10^{-7}$  М,  $10^{-6}$  М и  $10^{-5}$  М) на ФЕ контракцију утврђена је концентрацијски-зависна активност. Генерално, статистички значајни супресивни ефекти на ФЕ криву односа концентрација-контракција испољени су само при високој концентрацији ПАМ-а ( $10^{-5}$  М). Ниже концентрације већине тестираних ПАМ-ова ( $10^{-7}$  М и  $10^{-6}$  М) нису утицале на смањење ФЕ контракције, што је у корелацији са резултатима из првог протокола где су одређене криве односа концентрација-релаксација на ФЕ-преконтрахованим препаратима (значајне релаксације за већину ПАМ-ова испољене тек

при концентрацији  $10^{-5}$  M). Фармаколошки параметри који описују потентност ( $pEC_{50}$ ) и ефикасност ( $E_{max}$ ) ФЕ у одсуству или присуству различитих ПАМ-ова ГАВАР издвојени су у циљу сумарног прегледа испитиваног супресивног утицаја на контракцију. У овом збирном табеларном прегледу, као и у појединачним графичким приказима кривих односа концентрација-контракција, видљиво је да се диазепам издвојио као најпотентнији ПАМ, с обзиром да је и при нижим концентрацијама ( $10^{-7}$  M и  $10^{-6}$  M) испољио одређени супресивни утицај на јачину и ефикасност ФЕ контракције. За већину осталих ПАМ-ова (SH-I-048A, XHe-III-074, MP-III-0222, MP-III-058, GL-II-73) утврђен је значајан супресивни утицај при концентрацији  $10^{-5}$  M ( $p < 0,01$ ) који је на графички представљеним кривама условио померање ФЕ криве удесно и наниже. Интересантно је да се и у овом протоколу золпидем издвојио од осталих ПАМ-ова, јер није смањило ФЕ контракцију препарата пацовске аорте који су били инкубирани са золпидемом у концентрацији  $10^{-5}$  M. Другачију активност од већине других новосинтетисаних ПАМ-ова у овом протоколу показао је и лиганд DK-I-56-1. Слично осталима, када је примењен у концентрацији  $10^{-7}$  M, DK-I-56-1 није утицао на ФЕ контракцију. Међутим, при већим концентрацијама испољио је активност сличну диазепаму, јер је смањило ( $p < 0,05$ )  $pEC_{50}$  вредност и тако условио померање ФЕ криве удесно (при концентрацији  $10^{-6}$ ), те смањило ( $p < 0,01$ )  $E_{max}$  вредност и изазвао померање ФЕ криве наниже (при концентрацији  $10^{-5}$  M). Супресивни ефекти на ФЕ контракцију додатно су испитани при изузетно високој концентрацији од  $10^{-4}$  M за лиганде GL-II-73 и GL-II-74, након чега је ФЕ контракција скоро потпуно изостала, те је констатован некомпетитивни антагонистички карактер ове интеракције. Како би се показало да у описаном протоколу изражен супресивни утицај на ФЕ контракцију није само последица високе концентрације ПАМ-ова ( $10^{-4}$  M), представљени су и резултати добијени са другим испитиваним лигандима (ГАВА, флумазенил и  $ZnCl_2$ ). Слично раније поменутом золпидему, ови лиганди примењени у истој високој концентрацији ( $10^{-4}$  M) нису испољили супресивни утицај на ФЕ контракцију. Коначно, значајна је експериментална потврда релевантности добијених резултата, с обзиром да је временски период у којем су вршени описани експериментални протоколи прилично захтеван (износио је најчешће између пет и шест часова). Констатовано је да су контролни препарати пацовске аорте, посматрани током целог трајања експерименталног протокола, очували своју вијабилност, односно показали задовољавајућу стабилност нивоа преконтракције.

У четвртој целини представљени су резултати васкуларне активности тестираних ПАМ-ова у присуству различитих антагониста. Резултатима добијеним у првом протоколу представљени су васкуларни ефекти самих антагониста, те су за бикикулин, флумазенил, РК11195 и референтни празосин издвојени фармаколошки параметри ( $pEC_{50}$  и  $E_{max}$ ) важни за међусобно поређење њихове васкуларне активности. Утврђено је да су сви испитивани антагонисти показали вазодилатацијске ефекте, али различите ефикасности и потентности, при чему се празосин значајно и јасно издвојио као најефикаснији и најпотентнији вазодилататор. Поред поменутих, представљени су и резултати за  $\alpha 5$ - селективног антагонисту XLi-093, али је због ограничења везаних за његову слабу растворљивост примењен другачији концентрацијски опсег ( $10^{-10}$  M до  $10^{-6}$  M), те је поређење активности са осталима антагонистима оправдано изостављено. Утврђени васкуларни ефекти празосина важни су за процену вазоактивности осталих тестираних антагониста и ПАМ-ова на ФЕ-преконтрахованим препаратима аорте, јер је празосин фармаколошки антагониста ФЕ контракције. Упоредне криве односа концентрација-одговор јасно указују на супериорност празосина (и то при ниским концентрацијама,  $3 \times 10^{-7}$  M) у постигнутим

релаксацијским одговорима у односу на остале испитиване супстанце. Антагониста РК11195 испољио је релаксацијски потенцијал упоредив са диазепамом, и тако се издвојио од специфичних антагониста GABAR (бикукулин и флумазенил), који чак ни при високој концентрацији ( $10^{-4}$  M) нису испољили статистички значајне релаксацијске одговоре. Резултати из другог протокола представљају појединачне утицаје антагониста РК11195 и бикукулина на васкуларне ефекте диазепама. За обе супстанце утврђено је да испољавају антагонистички утицај једино при нижим концентрацијама диазепама ( $10^{-7}$  M и  $3 \times 10^{-7}$  M). Тако је утврђен компетитивни карактер њихове интеракције, јер се при већим концентрацијама диазепама постижу исти вазодилатацијски ефекти као у њиховом одсуству. Резултати из трећег протокола откривају да XLi-093, антагониста селективан за GABAR који садрже  $\alpha 5$  подјединицу, није утицао на васкуларне ефекте MP-III-058, који је окарактерисан као  $\alpha 5$ -селективан ПАМ. Треба нагласити да је овај резултат добијен при нижој концентрацији антагонисте XLi-093 ( $10^{-7}$  M), што је значајно ограничење у тумачењу резултата, условљено његовом изузетно слабом растворљивошћу. На крају су представљени резултати антагонистичког утицаја флумазенила, као стандардног антагонисте селективног за БЗД везно место на GABAR. Примењен у концентрацији  $10^{-4}$  M, флумазенил је значајно смањио релаксацију и узроковао померање кривих односа концентрација-одговор удесно и наниже за мидазолам и MP-III-058, указујући тако да се васкуларни ефекти тестираних ПАМ-ова остварују модулацијом БЗД везног места на "васкуларним" GABAR.

## **V. УПОРЕДНА АНАЛИЗА ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ**

Резултати RT-PCR и имунохистохемијске анализе у овој студији по први пут указују на експресију  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  и  $\gamma 2$  подјединице GABAR код пацовске аорте. Овим молекуларним техникама идентификације  $\alpha$  и  $\gamma 2$  подјединица начињени су први кораци у карактеризацији "васкуларних" GABAR као рецептора са БЗД везним местом. Осим тога, имунохистохемијским бојењем на попречном пресеку аорте утврђено је да се ради о глатко-мишићној локализацији експримираних подјединица. Интересантно је да раније описани налази RT-PCR и имунохистохемијске анализе за експресију  $\alpha$  подјединица у хуманој оменталној артерији нису показали експресију  $\alpha 5$  подјединице, већ само  $\alpha 4$  подјединице (Yim и сар., 2020). RT-PCR и имунохистохемијски резултати у овој студији показали су да  $\alpha 6$  подјединица није идентификована у испитиваним узорцима ткива. Сличан налаз установљен је и код различитих периферних органа миша (Everington и сар., 2018).

Значајно је нагласити да налази о експресији  $\alpha 1-5$  и  $\gamma 2$  подјединица у овој студији, заједно са имунохистохемијским налазом за идентификацију  $\beta$  подјединице (El Idrissi и сар., 2013), први указују на постојање "васкуларних" GABAR код пацовске аорте.

Нови ентитет "васкуларних" GABAR вероватно се у значајној мери разликује од познатих "неуралних" сродника GABAR у неколико аспеката, укључујући афинитете за ГАВА-у, експресиона места у ћелији, биофизичка и фармаколошка својста заснована на саставу подјединица (Juvale и сар., 2021). Познато је да се неурални GABAR, локализовани постсинаптички, углавном састоје од  $\alpha 1-3$ ,  $\beta 1-3$  и  $\gamma 2$ , те да се везивањем ГАВА-е остварује брза (на нивоу милисекунде) фазна инхибиција (Sieghart, 2015). За "васкуларне" GABAR претпоставља се да су састављени од подјединица претежно екстрасинаптичке



локализације, као што је  $\delta$  подјединица, те да могу бити дужи период активирани ниским концентрацијама ГАВА-е.

Резултати ове студије указују да је васкуларна активност ГАВА-е *per se* занемарљива, јер ГАВА није релаксирала ФЕ-преконтраховане препарате, нити је смањила ФЕ-изазвану контракцију. Овим су потврђени ранији налази на пацовској аорти (Perusquia и сар., 1996, Colussi и сар., 2011), мада студије на изолованим мезентеричним артеријама пацова (Farsi и сар., 2011, Kamran и сар., 2013, Kharazmi и сар., 2015) указују на релаксацијска својства ГАВА-е. Разлог ове неконзистентности вероватно је условљен морфолошким и функционалним разликама између мањих и већих крвних судова, те би било корисно, у неким наредним студијама, утврдити њену васкуларну активност на мањим артеријама од аорте. Претпоставка је да ГАВА пореклом из ендотела (Sen и сар., 2016), дифундије у интерстицијумску течност, где постиже константну амбијенталну концентрацију (Brandes, 2016) која је довољна за тоничку активацију "васкуларних" ГАВАР, након чега долази до уласка  $Ca^{2+}$  јона у ћелију и хиперполаризације мембране. Наравно, описана активација "васкуларних" ГАВАР подразумева везивање ПАМ-а, чији су васкуларни ефекти утврђени студијама на купатилу за изоловане органе.

Диазепам, позитиван модулатор са високим афинитетом за  $\alpha 1,2,3,5$  ГАВАР, био је најефикаснији ПАМ у овој студији, како у погледу постигнуте релаксације, тако и у погледу супресивних ефеката на контракцију изазвану ФЕ. Резултати ове студије показују да је он једини у концентрацији  $10^{-7}$  М смањео ФЕ изазвану контракцију препарата. Значајно је нагласити да је овај ефекат испољен при концентрацији која је седам пута нижа од његове терапијске (при условима са 96,8% везивања за протеине плазме) (Klotz и сар., 1976).

Иако се генерално сматра да класични БЗД ступају у интеракцију са ГАВАР везивањем за  $\alpha +\gamma$  – површину рецептора који садрже  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$  или  $\alpha 5$  и  $\gamma 2$  подјединице, бројне *in silico* студије указују на постојање најмање два начина везивања (Elgarf и сар., 2018). Тако је концепт "заједничког" начина везивања БЗД доведен у питање, што потврђују и уочене разлике у васкуларној активности између диазепам, мидазолама, SH-I-048A и осталих тестираних ПАМ-ова. Раније утврђена васкуларна активност мидазолама на хуманим крвним судовима (Moriyama и сар., 2011) потврђена је резултатима у овој студији, где се значајни релаксацијски ефекти постижу при супраклиничким концентрацијама ( $10^{-5}$  М и  $10^{-4}$  М). Стога је за разумевање разлика у васкуларној активности диазепам и мидазолама потребно познавати природу њихове интеракције и начина везивања на "васкуларним" ГАВАР. Претпоставља се да се разлике у начину везивања БЗД установљене за "класичне" неуралне ГАВАР могу очекивати и код "васкуларних" ГАВАР, посебно након што је у овој студији доказано да ови периферни агрегати такође садрже  $\gamma 2$  подјединицу која је неопходна за везно место БЗД. Интересантно је да је у хуманој артерији оментума доказана експресија иРНК која кодира екстрасинаптичку  $\delta$ , а не  $\gamma$  подјединицу (Yim и сар., 2020).

Уклањање ендотела у овој студији није поништило вазодилатацијске ефекте диазепам, мада су релаксације значајно слабије код препарата са оштећеним ендотелом, чиме су потврђени раније описани ендотел-зависни механизми релаксације (Chang и сар., 1994; Colussi и сар., 2011). С обзиром да је  $\alpha 5$  подјединица ГАВАР локализована на глатко-мишићном слоју пацовске аорте, у овој студији примењено је укупно четири  $\alpha 5$  селективна ПАМ-а (MP-III-022, MP-III-058, GL-II-73 и GL-II-74) и један неутрални алостерни модулатор, НАМ (XLi-093), а у циљу функционалне карактеризације "васкуларних" ГАВАР. Иако њихови *in vitro* профили указују на значајну преференцију за  $\alpha 5\beta 3\gamma 2$  у односу на остале  $\alpha 1/2/3/\beta 3\gamma 2$  рецепторе, њихова васкуларна активност на изолованим сегментима

пацовске аорте била је упоредива са другим неселективним ПАМ-овима (диазепам, SH-I-048A и мидазолам). Резултати неочекиване вазоактивности ПАМ-а XLI-093 потврдили су раније изнете претпоставке о различитим ефектима модулације "васкуларних" у односу на добро познате "неуралне" GABAR. Иако је XLI-093 окарактерисан као високо селективан антагониста  $\alpha 5$  подтипа GABAR (Li и сар., 2003), резултати представљени у овој дисертацији указују да је XLI-093 пре позитиван него неутралан модулатор "васкуларних" GABAR.

Поред тога, резултати ове студије издвојили су золпидем као ПАМ са најслабијом васкуларном активношћу, што није очекивано с обзиром да се ради о високо ефикасном ПАМ-у на GABAR који садрже  $\alpha 1$  подјединицу. Образложење ове слабије активности золпидема на "васкуларним" GABAR може бити повезано са одсуством његове ефикасности или слабом ефикасношћу на GABAR који садрже друге  $\alpha$  подјединице (Savić и сар., 2010), а на бази сазнања да  $\alpha 1$  подјединица у комбинацији са неком од других идентификованих  $\alpha$  подјединица не учествује у везном месту БЗД на "васкуларном" GABAR (del Rio и сар., 2001). Међутим, треба нагласити да се ови резултати слабе васкуларне активности золпидема разликују од резултата сличне студије где су описана изражена вазодилатацијска својства золпидема, већа чак и од диазепама (Kagota и сар., 2021).

Селективни ПАМ-ови XHe-III-074 и DK-I-56-1, са познатим *in vitro* профилима функционалне преференције према  $\alpha 4$ -GABAR и  $\alpha 6$ -GABAR, испољили су изражене вазодилатацијске ефекте у овој студији. Уочена вазоактивност XHe-III-074 може се објаснити експресијом протеина иРНК за  $\alpha 4$  подјединицу у ткиву аорте пацова, слично ранијим појашњењем бронходилатацијских ефекта повезаних са модулацијом  $\alpha 4$ -GABAR у дисајним путевима (Gallos и сар., 2012, Forkuo и сар., 2016). Међутим, овај концепт није применљив за DK-I-56-1, с обзиром да у овој студији није утврђена експресија  $\alpha 6$  подјединице. Ипак, постоји могућност да DK-I-56-1, као антагониста високог афинитета на класичном БЗД везном месту GABAR (Knutson и сар., 2018) оствари другачију интеракцију са присутним БЗД везним местом на "васкуларном" GABAR која условљава његову вазоактивност.

Заједничка особина тестираних вазоактивних ПАМ-ова јесте то да су при концентрацији од 10  $\mu$ M остварили релаксацију преконтрахованих препарата преко 50%, те сузбили ФЕ-изазвану контракцију препарата на некомпетитиван начин. Иако се ради о супраклиничкој концентрацији за већину БЗД (Park и сар., 2006), описани васкуларни ефекти могу бити значајни у хитним стањима као што су хипертензивне кризе, предозирање или злоупотреба лекова (Colussi и сар., 2011). Међутим треба нагласити да је њихов релаксацијски потенцијал значајно нижи у поређењу са референтним празосином, односно да је потребно знатно дуже времена и веће концентрације да би се достигли слични нивои релаксације.

Од испитиваних антагониста највећу васкуларну активност, упоредиву са ефектима вазоактивних ПАМ-ова, испољио је PK11195. С обзиром да се ради о високо селективном лиганду за ТСПО рецепторе (French и сар., 1989) претпоставка је да "васкуларни" GABAR и ТСПО ступају у интеракције у хомеостази васкуларних глатко-мишићних ћелија (Denora и Natile, 2017). Резултати из ове студије указују на скромну васкуларну активност флумазенила, што је појашњено његовом парцијалном агонистичком активношћу на одређене подтипове GABAR (Sieghart и Savić, 2018), те указују на изостанак вазоактивности бидукулина. Резултати експеримената на купатилу у присуству антагониста показали су антагонистички утицај флумазенила на вазодилатацијске ефекте мидазолама и MP-III-058,

доку су утицаји бикикулина и РК11195 изостали на вазодилатацијским ефектима диазепама. Ови функционални налази на купатилу сугеришу да се васкуларна активност тестираних ПАМ-ова остварује модулацијом БЗД везног места на "васкуларном" ГАВАР, те да је независна од активације ТСПО рецептора. Ову тврдњу поткрепљују налази имунохистохемијске анализе, с обзиром да идентификоване  $\alpha$  и  $\gamma 2$  подјединице формирају везно мјесто БЗД, те налази ранијих студија на изолованим сегментима пацовске аорте (Park и сар., 2006).

## Литература

Brandes RP. A butterfly taste to vascular biology: endothelial cells generate and release  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Circ Res.* 2016;119(5):577-9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309444.

Chang KS, Feng MG, Davis RF. Midazolam produces vasodilation by mixed endothelium-dependent and -independent mechanisms. *Anesth Analg.* 1994;78(4):710-7. doi: 10.1213/00000539-199404000-00017.

Colussi GL, Di Fabio A, Catena C, Chiuch A, Sechi LA. Involvement of endothelium-dependent and -independent mechanisms in midazolam-induced vasodilation. *Hypertens Res.* 2011;34(8):929-34. doi: 10.1038/hr.2011.62.

del Río JC, Araujo F, Ramos B, Ruano D, Vitorica J. Prevalence between different alpha subunits performing the benzodiazepine binding sites in native heterologous GABA(A) receptors containing the alpha2 subunit. *J Neurochem.* 2001;79(1):183-91. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00551.x.

Denora N, Natile G. An Updated View of Translocator Protein (TSPO). *Int J Mol Sci* 2017;18(12):2640. [https://doi: 10.3390/ijms18122640](https://doi.org/10.3390/ijms18122640).

El Idrissi A, Okeke E, Yan X, Sidime F, Neuwirth LS. Taurine regulation of blood pressure and vasoactivity. *Adv Exp Med Biol.* 2013;775:407-25. doi: 10.1007/978-1-4614-6130-2\_31.

Elgarf AA, Siebert DCB, Steudle F, Draxler A, Li G, Huang S, Cook JM, Ernst M, Scholze P. Different benzodiazepines bind with distinct binding modes to GABAA receptors. *ACS Chem Biol.* 2018;13(8):2033-2039. doi: 10.1021/acscchembio.8b00144.

Everington EA, Gibbard AG, Swinny JD, Seifi M. Molecular characterization of GABA-A receptor subunit diversity within major peripheral organs and their plasticity in response to early life psychosocial stress. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:18. doi: 10.3389/fnmol.2018.00018.

Farsi L, Keshavarz M, Soltani N. Relaxatory effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by same pathway in diabetic and normal rat mesenteric bed vessel. *Iran J Bas Med Sci.* 2011.14(1):94-8.

Forkuo GS, Guthrie ML, Yuan NY, Nieman AN, Kodali R, Jahan R, Stephen MR, Yocum GT, Treven M, Poe MM, Li G, Yu OB, Hartzler BD, Zahn NM, Ernst M, Emala CW, Stafford DC, Cook JM, Arnold LA. Development of GABAA receptor subtype-selective

imidazobenzodiazepines as novel asthma treatments. *Mol Pharm.* 2016;13(6):2026-38. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00159.

French JF, Rapoport RM, Matlib MA. Possible mechanism of benzodiazepine-induced relaxation of vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;14(3):405-11. doi: 10.1097/00005344-198909000-00008.

Gallos G, Yim P, Chang S, Zhang Y, Xu D, Cook JM, Gerthoffer WT, Emala CW Sr. Targeting the restricted  $\alpha$ -subunit repertoire of airway smooth muscle GABAA receptors augments airway smooth muscle relaxation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(2):L248-56. doi: 10.1152/ajplung.00131.2011.

Juvale IIA, Hassan Z, Has ATC. The emerging roles of  $\pi$  subunit-containing GABAA receptors in different cancers. *Int J Med Sci.* 2021;18(16):3851-3860. doi: 10.7150/ijms.60928.

Kagota S, Morikawa K, Ishida H, Chimoto J, Maruyama-Fumoto K, Yamada S, Shinozuka K. Vasorelaxant effects of benzodiazepines, non-benzodiazepine sedative-hypnotics, and tandospirone on isolated rat arteries. *Eur J Pharmacol.* 2021;892:173744. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173744.

Kamran M, Bahrami A, Soltani N, Keshavarz M, Farsi L. GABA-induced vasorelaxation mediated by nitric oxide and GABAA receptor in non diabetic and streptozotocin-induced diabetic rat vessels. *Gen Physiol Biophys.* 2013;32(1):101-6. doi: 10.4149/gpb\_2013013.

Kharazmi F, Soltani N, Rezaei S, Keshavarz M, Farsi L (2015). Role of GABAB receptor and L-Arg in GABA-induced vasorelaxation in non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rat vessels. *Iran Biomed J.* 2015;19(2):91-5.

Klotz U, Antonin KH, Bieck PR. Pharmacokinetics and plasma binding of diazepam in man, dog, rabbit, guinea pig and rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1976;199(1):67-73.

Knutson DE, Kodali R, Divović B, Treven M, Stephen MR, Zahn NM, Dobričić V, Huber AT, Meirelles MA, Verma RS, Wimmer L, Witzigmann C, Arnold LA, Chiou LC, Ernst M, Mihovilovic MD, Savić MM, Sieghart W, Cook JM. Design and synthesis of novel deuterated ligands functionally selective for the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)  $\alpha 6$  subtype with improved metabolic stability and enhanced bioavailability. *J Med Chem.* 2018;61(6):2422-2446. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01664.

Li X, Cao H, Zhang C, Furtmueller R, Fuchs K, Huck S, Sieghart W, Deschamps J, Cook JM. Synthesis, in vitro affinity, and efficacy of a bis 8-ethynyl-4H-imidazo[1,5a]-[1,4]benzodiazepine analogue, the first bivalent  $\alpha 5$  subtype selective BzR/GABA(A) antagonist. *J Med Chem.* 2003;46(26):5567-70. doi: 10.1021/jm034164c.

Moriyama T, Tsuneyoshi I, Kanmura Y. Effects of a novel benzodiazepine derivative, JM-1232(-), on human gastroepiploic artery in vitro. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2011;25(1):72-7. doi: 10.1053/j.jvca.2010.03.013.

Park SE, Sohn JT, Kim C, Chang KC, Shin IW, Park KE, Lee HK, Chung YK. Diazepam attenuates phenylephrine-induced contractions in rat aorta. *Anesth Analg*. 2006;102(3):682-9. doi: 10.1213/01.ane.0000196521.62806.43.

Perusquía M, Hernández R, Morales MA, Campos MG, Villalón CM. Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol*. 1996;27(1):181-5. doi: 10.1016/0306-3623(95)00091-7.

Savić MM, Majumder S, Huang S, Edwankar RV, Furtmüller R, Joksimović S, Clayton T Sr, Ramerstorfer J, Milinković MM, Roth BL, Sieghart W, Cook JM. Novel positive allosteric modulators of GABAA receptors: do subtle differences in activity at alpha1 plus alpha5 versus alpha2 plus alpha3 subunits account for dissimilarities in behavioral effects in rats? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(2):376-86. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.01.004.

Sen S, Roy S, Bandyopadhyay G, Scott B, Xiao D, Ramadoss S, Mahata SK, Chaudhuri G.  $\gamma$ -Aminobutyric acid is synthesized and released by the endothelium: potential implications. *Circ Res*. 2016;119(5):621-34. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308645.

Sieghart W. Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. *Adv Pharmacol*. 2015;72:53-96. doi: 10.1016/bs.apha.2014.10.002.

Sieghart, W., Savić, M.M. International union of basic and clinical pharmacology. CVI: GABAA receptor subtype- and function-selective ligands: key issues in translation to humans. *Pharmacol. Rev.* 2018;70, 836–878. doi:10.1124/ pr.117.014449.

Yim PD, Gallos G, Lee-Kong SA, Dan W, Wu AD, Xu D, Berkowitz DE, Emala CW. Novel expression of GABAA receptors on resistance arteries that modulate myogenic tone. *J Vasc Res*. 2020;57(3):113-125. doi: 10.1159/000505456.

## **Г. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

**Радови објављени у цјелини у часописима међународног значаја:**

### **Радови објављени у истакнутом међународном часопису (M22)**

1. Gajić Bojić M, Todorović L, Santrač A, Mian MY, Sharmin D, Cook JM, Savić MM. Vasodilatory effects of a variety of positive allosteric modulators of GABA<sub>A</sub> receptors on rat thoracic aorta. *Eur J Pharmacol*. 2021;899:174023. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174023. **IF (2021) = 5,195; M21**
2. Gajić Bojić M, Treven M, Pandey KP, Tiruveedhula PB, Santrač A, Đukanović Đ, Vojinović N, Amidžić Lj, Škrbić R, Scholze P, Ernst M, Cook JM, Savić MM. Vascular effects of midazolam, flumazenil and a novel imidazobenzodiazepine MP-III-058 on isolated rat aorta. *Can J Physiol Pharmacol*. 2023; doi: 10.1139/cjpp-2023-0285. **IF (2022) = 2,1; M23**

### **Радови објављени у часопису националног значаја (M52)**

1. Gajić-Bojić M, Savić MM. The vasorelaxant properties of novel benzodiazepine-like ligands on isolated rat thoracic aorta. Scripta Medica 2020. doi: 10.5937/scriptamed51-26900

### **Саопштења на међународним научним скуповима:**

#### **Саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34)**

1. Gajić Bojić M, Golić Jelić A, Mian MY, Sharmin D, Cook JM, Savić MM. Relaxing effects of novel benzodiazepine-like ligand MP-III-058 on rat trachea. 80-ти FIP свјетски Конгрес фармације и фармацеутских наука. Септембар 2022. Севиља, Шпанија.
2. Gajić Bojić M, Tiruveedhula PB, Marinković S, Đukanović Đ, Škrbić R, Cook JM, Savić MM. Relaxing effects of imidazobenzodiazepine MP-III-058 on rat aorta and trachea. 8. скуп Европске секције Интернационалне Академије за кардиоваскуларне науке. Септембар 28 - Октобар 1., 2022. Сегедин, Мађарска.
3. Gajić Bojić M, Škrbić R, Savić MM. Vasodilatory effects of midazolam and novel benzodiazepine-like ligand MP-III-058 on rat aorta. 7. скуп Европске секције и 8. скуп Сјеверноамеричке секције Интернационалне Академије за кардиоваскуларне науке. Септембар 20 - 23, 2022. Бања Лука, Република Српска, Босна и Херцеговина.
4. Gajić Bojić M, Treven M, Pandey KP, Tiruveedhula PB, Santrač A, Đukanović Đ, Vojinović N, Amidžić Lj, Škrbić R, Scholze P, Ernst M, Cook JM, Savić MM. Vascular effects of midazolam, flumazenil and a novel imidazobenzodiazepine MP-III-058 on isolated rat aorta. 15. конгрес фармаколога Србије и 5. конгрес клиничке фармакологије Србије са међународним учешћем. Септембар 14-16, 2023, Врњачка бања, Србија

### **Д. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Резултати ове дисертације дали су важан допринос расветљавању структуре и ефеката модулације "васкуларних" GABAR, те указују на значајне васкуларне ефекте различитих ПАМ-ова БЗД места везивања GABAR. Осим тога, резултати поткрепљују оправданост примене високо-селективних лиганата у фенотипизацији рецептора, те охрабрују извођење даљих истраживања на пољу ГАВА-ергичке трансмисије у периферним крвним судовима.



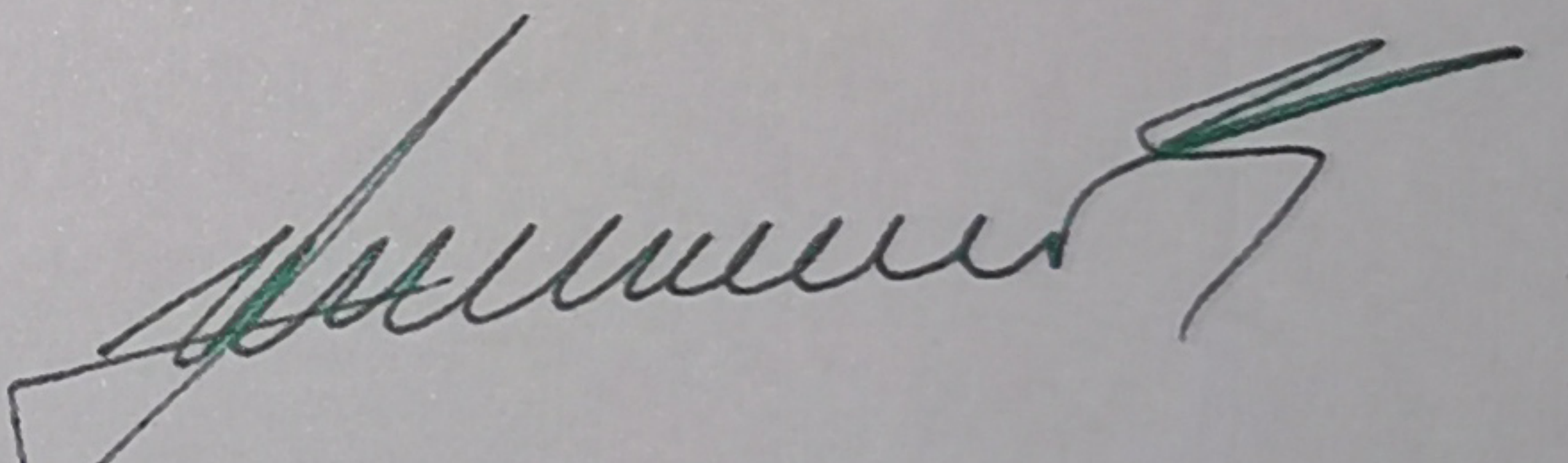
## Б. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу прегледа докторске дисертације маг. фарм. Милице Гајић Бојић под називом „Васкуларна активност позитивних алостерних модулатора GABA<sub>A</sub> рецептора код пацова”, 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 облику два рада у међународним часописима, чији збир импакт фактора износи 7,3.

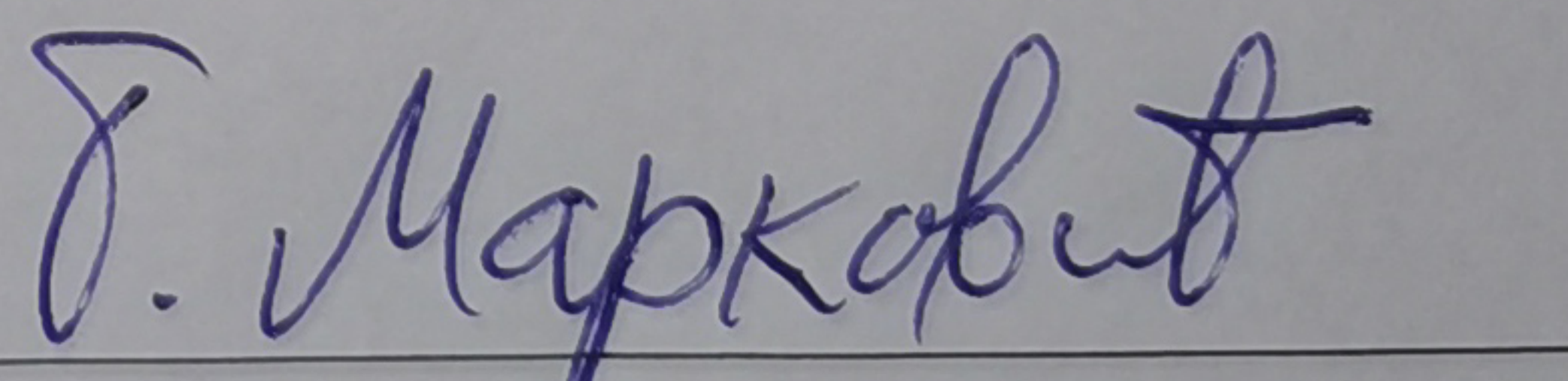
Комисија, стога, предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и након добијања сагласности Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду одобри маг. фарм. Милице Гајић Бојић јавну одбрану докторске дисертације.

Београд, 17.11.2023.

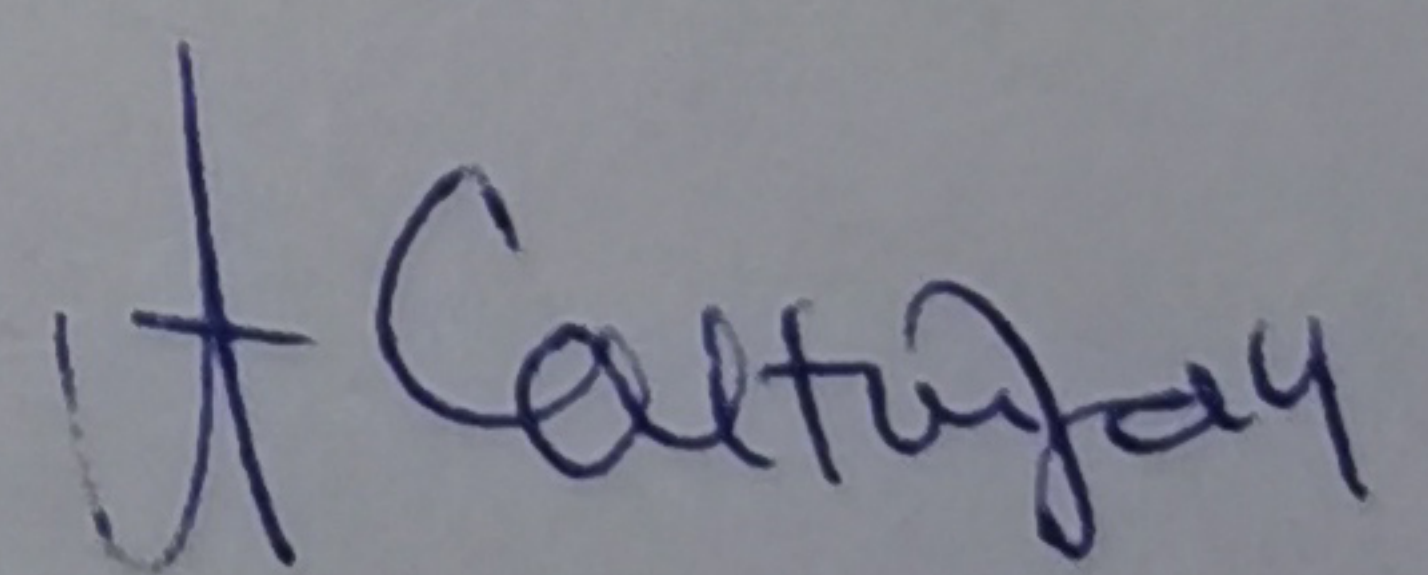
Чланови Комисије:

1. 

Др Ранко Шкрбић, редни професор  
Универзитет у Бањалуци – Медицински факултет

2. 

Др Бојан Марковић, редовни професор  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

3. 

Др Ања Сантрач, научни сарадник  
Syneos Health, Београд