

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 17.11. 2011. godine imenovana je komisija u sastavu:

Prof. Dr Nina Žigon, Medicinski fakultet, Beograd

Prof. Dr Zoran Todorović, Medicinski fakultet, Beograd

Prof. Dr Elena Kršljak, Stomatološki fakultet, Beograd

Za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom:

“Modulatorna uloga azot monoksida u muskarinskoj vazodilataciji I sekreciji parotidne žlezde kunića sa dijabetesom”

Kandidata: As. mr sci dr Jelena Roganović

Mentor: V.prof. dr Miroslav Radenković

Komentor: Prof. dr Dragica Stojić

Imenovana Komisija je proučila doktorsku disertaciju I podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Jelene Roganović pod nazivom ” **Modulatorna uloga azot monoksida u muskarinskoj vazodilataciji I sekreciji parotidne žlezde kunića sa dijabetesom**” je napisana na 98 strana na kojima je prikazano 10 tabela I 28 grafikona kao I 118 referenci iz savremene I značajne naučne literature. Disertacija sadrži: sažetak na srpskom I

engleskom jeziku , uvod, ciljeve istraživanja, materijal I metode, rezultate, diskusiju, zaključke I literaturu.

U **uvodu** su navedena savremena gledišta o modulatornoj ulozi NO kako u krvnim sudovima tako I u žlezdanom tkivu pljuvačnih žlezda, kao I uticaju dijabetes melitusa na funkciju pljuvačnih žlezda što ima dalekosežne posledice po oralno zdravlje. Pregledno su dati dosadašnji rezultati o mehanizmima uključenim u raznovrsne uloge NO u vazodilataciji I sekreciji u pljuvačnim žlezdama I specifičnim ulogama koje imaju različite izoforme NO sintaze. Posebno je istaknuta uloga iNOS u dijabetesu u drugim organima kao I značaj ispitivanja uloge i aktivnosti ovog enzima u pljuvačnim žlezdama u dijabetesu, o čemu do sada nije bilo podataka.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani: Ispitati efekte i transdukcione mehanizme dejstva acetilholina na izolovanoj glandularnoj grani spoljne karotidne arterije koja vaskularizuje parotidnu pljuvačnu žlezdu (parotidnoj arteriji) kunića, u fiziološkim uslovima i u dijabetesu; Utvrditi i analizirati učešće pojedinih podtipova muskarinskih receptora u vaskularnim efektima ACh na izolovanoj parotidnoj arteriji, u fiziološkim uslovima i dijabetesu; Utvrditi i analizirati učešće pojedinih podtipova muskarinskih receptora u sekretornim efektima holinergičkog agoniste, karbahola, u parotidnoj žlezdi kunića, u fiziološkim uslovima i dijabetesu; Odrediti bazalni nivo cGMP u izolovanoj parotidnoj arteriji i žlezdi, u fiziološkim uslovima i dijabetesu; odrediti veličinu ekspresije mRNK iNOS u izolovanoj parotidnoj arteriji i žlezdi, u fiziološkim uslovima i dijabetesu.

U poglavlju **Materijal I metode** jasno je definisan metod nastanka eksperimentalnog dijabetes melitusa tipa 1, kao I *in vitro* I *in vivo* farmakološke analize vaskularnih I sekretornih efekata muskarinskih agonista , imunoesejske tehnike (ELISE) za određivanje koncentracija cGMP I Real-time RT-PCR za kvantifikaciju ekspresije mRNK iNOS. Posebno je značajno istaći da su po prvi put date osnove za kvantifikovanje ekspresije gena u parotidnoj arteriji I žlezdi kunića I da je ova disertacija dala metodološke osnove za ispitivanja ekspresije različitih gena u ovim tkivima u fiziološkim uslovima kao I u toku dijabetesa.

Rezultati su prikazani u 4 potpoglavlja koji prate postavljene ciljeve. U prvom poglavlju je data farmakološka analiza vazorelaksantnog efekta ACh na parotidnoj arteriji kontrolnih I kunića sa dijabetesom, U drugom, farmakološka analiza sekretornog efekta karbahola u parotidnoj pljuvačnoj žlezdi obe grupe životinja. U trećem potpoglavlju prikazano je

kvantitativno određivanje mRNA iNOS u parotidnoj arteriji i žlezdi kontrolnih i kunića sa dijabetesom, dok su u četvrtom prikazani rezultati merenja bazalnih koncentracija cGMP u parotidnoj arteriji i žlezdi obe grupe životinja.

U **Diskusiji** su naučnom analizom dobijenih rezultata utvrđeni bliži uvidi o ćelijskim i molekularnim mehanizmima poremećaja sekretorne i vaskularne funkcije parotidne žlezde kunića. Istovremeno, dobijeni rezultati su povezani sa nalazima dosadašnjih savremenih istraživanja u ovoj oblasti.

Na osnovu iznetih i diskutovanih rezultata uobličeni su **zaključci** koji predstavljaju jasne odgovore na postavljene ciljeve.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 118 referenci iz savremene i značajne naučne literature koje su citirane u radu.

B Kratak opis postignutih rezultata

Na eksperimentalnom modelu dijabetes melitusa tipa 1 kod kunića (šest nedelja posle primene aloksana u dozi 100 mg/kg) dobijeni rezultati pokazuju da ova bolest značajno menja sekretornu aktivnost parotidne pljuvačne žlezde i vazoreaktivnost parotidne arterije, koja ishranjuje parotidnu žlezdu kunića. Zapaženi poremećaji su rezultat promena kako na ćelijskom nivou –receptorski signal tako i na molekularnom nivou-ekspresija gena. Farmakološka analiza je pokazala da je za sekretornu aktivnost parotidne žlezde, izazvanu karbapolom, odgovorna samo aktivacija muskarinskih M3 receptora, i da je smanjen sekretorni efekt karbapola u dijabetesu posledica promenjenog transdukcionog signala vezanog za aktivaciju muskarinskih M3 receptora, a ne promena u broju i afinitetu receptora. Na ćelijskom nivou, ovo je rezultat povećanja aktivnosti nNOS i iNOS što je na molekularnom nivou praćeno povećanjem ekspresije mRNA iNOS. Imajući u vidu činjenicu da sekretorna aktivnost pljuvačnih žlezda u značajnoj meri zavisi od vazodilatacije dovodnih i krvnih sudova unutar žlezdanog tkiva, od posebnog značaja su rezultati koji se odnose na vazorelaksantni efekt Ach u parotidnoj arteriji. Dobijeni rezultati pokazuju da je vazorelaksantni efekt Ach na parotidnoj arteriji rezultat aktivacije samo M3 receptora i da je značajno smanjen u dijabetesu kao posledica promena na nivou transdukcionog signala u disfunkcionalnom endotelu a ne rezultat promenjenog broja ili afiniteta M3 receptora. U osnovi disfunkcije endotela u parotidnoj arteriji kunića sa dijabetesom je smanjena aktivnost NO i kompenzatorno povećanje stvaranje/oslobađanje drugih endotelinih

faktora, prostaciklina i EDHF, kao i povećanje aktivnosti iNOS kao posledica povećane ekspresije mRNA iNOS. S obzirom da su obe izoforme NOS u parotidnoj arteriji kunića kolokalizovane u endotelu, i da su za njihovu funkciju neophodni isti supstrat i kofaktori, dobijeni rezultati ukazuju da iNOS deluje antagonistički sa eNOS zbog kompeticije za isti supstrat i kofaktore uključene u stvaranje NO. U parotidnoj arteriji i žlezdi kunića sa dijabetesom značajno se povećava bazalna koncentracija cGMP, osnovnog signalnog efektornog molekula NO.

Celokupni rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na mogućnost da promene u aktivnosti NO-cGMP sistema u dijabetesu, u kombinaciji sa oksidativnim stresom, osnovnim patofiziološkim mehanizmom dijabetes melitusa, doprinosi razvoju hipofunkcije sekretorne aktivnosti parotidne žlezde i endotelne disfunkcije parotidne arterije kunića sa dijabetesom.

C Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati ove doktorske disertacije, proistekli iz *in vivo* i *in vitro* ispitivanja sekretorne funkcije parotidne pljuvačne žlezde su pokazala da se u dijabetesu značajno smanjuje sekrecija parotidne pljuvačke kunića, izazvane stimulacijom muskarinskih receptora, što je u saglasnosti sa *in vivo* (Watanabe I sar., 2001) i *in vitro* (Fedirko I sar., 2006) istraživanjima drugih autora. Iako rezultati drugih autora (Watanabe I sar., 2001) pokazuju da dijabetes menja afinitet muskarinskih receptora uključenih u sekretorne procese u pljuvačnim žlezdama, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da su za sekretornu hipofunkciju parotidne žlezde odgovorni poremećaji na nivou transdukcionog signala a ne promene u broju i afinitetu M₃ receptora. U transdukcionom signalu vezanom za aktivaciju M₃ receptora i sekreciju u parotidnoj žlezdi kunića u fiziološkim uslovima ključnu ulogu ima nNOS što je pokazano i u *in vitro* ispitivanjima na parotidnim acinusima kunića (Sugiya i sar., 2001). Međutim, po prvi put je pokazano da u parotidnoj žlezdi u dijabetesu raste aktivnost nNOS i iNOS i da je ukupno povećanje aktivnosti NOS odgovorna za razvoj sekretorne hipofunkcije. Mehanizam kojim ova povećana aktivnost NOS izoformi utiče na razvoj hipofunkcije pljuvačnih žlezda nije sasvim razjašnjena ali se pretpostavlja da ključnu ulogu u patofiziološkom mehanizmu ima oksidativni stres (Kleinert, 2004). Ovo je od posebnog značaja ako se ima u vidu da su nedavna istraživanja Turner i sar (2011) ukazala na značajnu ulogu oksidativnog stresa u nastanku patoloških promena u

pljuvačnim žlezdama u toku dijabetesa. Iako, do sada, nije bilo podataka o značaju autonomne neuropatije u mehanizmima odgovornim za hipofunkciju pljuvačnih žlezda u ranom dijabetesu, istraživanja smanjene funkcije drugih sekretornih organa u dijabetesu, kao što su bubrezi, pokazuju da i u ranom dijabetesu (4-6 nedelja) postoje znaci periferne i autonomne neuropatije (Fushimi i sar., 1988). Nedavna istraživanja Negi i sar., (2011) ukazuju na mogućnost da je najznačajniji mehanizam nastanka dijabetične neuropatije oksidativni stress. Rezultati iz ove disertacije pokazuju da dijabetes izaziva značajno povećanje aktivnosti i ekspresije iNOS, ali i povećanje aktivnosti nNOS, i stvaranje neuralnog NO koji takođe može da doprinese disbalansu u stvaranju NO i oksidativnom stresu. Imajući u vidu da su ovo prvi rezultati o promenama u aktivnosti nNOS i iNOS u pljuvačnim žlezdama u toku dijabetesa, naknadna istraživanja su neophodna da bi se objasnile pojedinačne uloge iNOS i nNOS u funkciji pljuvačnih žlezda u dijabetesu. Buduća istraživanja usmerena ka farmakoterapiji kserostomije, jedne od najznačajnijih oralnih komplikacija dijabetesa treba da ukažu kako lekovima smanjiti patološko povećanje NO, a pri tome ne narušiti fiziološku ulogu NO u sekreciji, a sve to u cilju razvoja novih terapijskih strategija za lečenje hipofunkcije pljuvačnih žlezda. Poznato je da u nastanku vaskularne bolesti, kao komplikacije dijabetesa melitusa, ključnu ulogu ima poremećaj endotelne funkcije krvnih sudova koja se manifestuje prvenstveno smanjenjem endotelno-zavisne vazorelaksacije. Do sada nije bilo rezultata o efektima dijabetesa na reaktivnost dovodnih arterija za pljuvačne žlezde stoga su rezultati ove studije od posebnog značaja ako se uzme u obzir da vazodilatacija u žlezdi značajno doprinosi njenoj sekretornoj aktivnosti. Važno je istaći da su dobijeni rezultati pokazali da je u osnovi endotelne disfunkcije parotidne arterije u toku dijabetesa poremećaj odnosa između stvaranja endotelnih vazodilatatora, NO, prostaciklina i EDHF. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima drugih autora (Nishikawa i sar., 2000; Chataigneau i sar., 1999) o značajnoj ulozi NO u modulaciji vaskularnih efekata prostaciklina i EDHF, kako u fiziološkom stanju tako i u dijabetesu, kada je to kompenzatorni mehanizam za očuvanje narušene vaskularne funkcije, kao što je pokazano i na mezenteričnim arterijama miša sa dijabetesom (Nacci i sar., 2009). Značajno je da u parotidnoj arteriji i žlezdi u toku dijabetesa aktivnost iNOS raste a eNOS se smanjuje kao što je pokazano i u drugim organima u toku ove bolesti (Bojunga i sar., 2004). Rezultati ove studije ukazuju na novi aspekt razmatranja interakcije između ovih enzima kao mogućnost međusobne kompeticije između iNOS i eNOS po pitanju stvaranja NO, jer oba enzima, kolokalizovana u endotelu, zahtevaju isti supstrat i

kofaktore neophodne za stvaranje NO. Ova studija je takođe pokazala i da bazalne koncentracije cGMP rastu u dijabetesu, kako u žlezdi tako i u arteriji, što je u saglasnosti sa nalazima Bojunga i sar (2004) u drugim organima pacova sa dijabetesom, i da je promena u aktivnosti NO-cGMP sistema, pored oksidativnog stresa, od velikog značaja za poremećenu funkciju pljuvačnih žlezda u dijabetesu.

D Objavljeni rad koji čini deo doktorske disertacije:

Roganović J, Radenković M, Tanić N, Tanić N, Petrović N, Stojić D. Impairment of acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated parotid artery of the alloxan-induced diabetic rabbit. Eur J Oral Sci. 2011;119(5):352-360

E Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija "Modulatorna uloga azot monoksida u muskarinskoj vazodilataciji i sekreciji parotidne žlezde kunića sa dijabetesom" dr Jelene Roganović predstavlja originalan naučni doprinos u rasvetljavanju mehanizama, kako na ćelijskom tako i na molekularnom nivou, uključenih u poremećenu funkciju pljuvačnih žlezda u dijabetesu. U radu su primenjene savremene farmakološke i molekularno-biološke metode i po prvi put je pokazano da deo molekularnih mehanizama kojim dijabetes menja sekretornu i vaskularnu funkciju pljuvačnih žlezda uključuje povećanu ekspresiju i aktivnost inducibilne NO sintaze. U toku ovih molekularnih ispitivanja utvrđena je i metodološka osnova (određivanje najpogodnijih konstitutivnih gena kao endogenih kontrola) za merenja ekspresije različitih gena u pljuvačnim žlezdama i dovodnim arterijama kunića sa dijabetesom, primenom Real-time RT-PCR. Ovo je od posebnog značaja s obzirom da je pokazano da je kunić komparativno dobar eksperimentalni model za ispitivanje funkcionalnosti pljuvačnih žlezda kod ljudi. Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja, sa precizno definisanim ciljevima, originalnim naučnim pristupom, savremenom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i diskutovanim rezultatima i jasno uobličenim zaključcima.

Na osnovu svega napred navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, Komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Jelene Roganović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 8.12. 2011.

Mentor:

V. prof. dr Miroslav Radenković

Komentor:

Prof. dr Dragica Stojić

Članovi Komisije:

Prof. dr Nina Žigon

Prof. dr Zoran Todorović

Prof. dr Elena Kršljak
