

## 1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-646/3-5, од 28. 01. 2015. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Ивана Срејовића, под називом:

### „Ефекти модулације *N*-метил-*D*-аспартатних рецептора на изолованом срцу пацова“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Гвозден Росић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **Проф. др Драган Ђурић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Физиологија, члан.
3. **Доц. др Владимир Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија, члан;

## 2. Извештај комисије о подобности теме

### 2.1. Кратка биографија кандидата

Др Иван Срејовић је рођен 12. 09. 1985. године у Крагујевцу, где је завршио основну и средњу школу.

Медицински факултет је уписао школске 2004/05 године у Крагујевцу, а дипломирао у марту 2012. године.

Докторске академске студије је уписао 2012/13 године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје: Клиничка и експериментална физиологија са спортском медицином.

### 2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

**Наслов:** „Ефекти модулације *N*-метил-*D*-аспартатних рецептора на изолованом срцу пацова“

**Предмет:** Испитивање ефеката различитих агониста и антагониста *N*-метил-*D*-аспартатних рецептора, уз акутну примену хомоцистеина, на миокард и коронарну циркулацију изолованог срца пацова, као и испитивање значаја оксидационог стреса у добијеним ефектима.

**Хипотеза:** Акутна примена агониста и антагониста *N*-метил-*D*-аспартатних рецептора може да узрокује модификацију евентуалног штетног дејства акутне администрације хомоцистеина на функционисање миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.

### 2.3. Подобност кандидата

Кандидат има осам публикованих радова из области претклиничких и клиничких истраживања. Кандидату је објављен један рад у целини за штампу у рецензираном часопису, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

**Srejovic I, Jakovljevic V, Zivkovic V, Barudzic N, Radovanovic A, Stanojlovic O, Djuric DM.** The effects of the modulation of NMDA receptors by homocysteine thiolactone and dizocilpine on cardiodynamics and oxidative stress in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2015 Mar;401(1-2):97-105. **M23**

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Све више пажње се усмерава на значај хомоцистеина у патогенези различитих болести, па тако и болести кардиоваскуларног система. Резултати великог броја истраживања указују на висок степен повезаности повишених концентрација хомоцистеина у плазми и инциденције кардиоваскуларних болести, због чега се хомоцистеин сматра новим и независним фактором ризика за настанак неке од болести из ове групе.

Потенцијални механизми којима хомоцистеин узрокује поремећаје кардиоваскуларног система нису довољно испитани и не може се са сигурношћу издвојити један или више доминантних механизма. Имајући у виду структуру ове аминокиселине, односно постојање слободних тиолних (SH) група, хомоцистеин спада у групу најреактивнијих аминокиселина. Хомоцистеин лако ступа у оксидо-редукционе реакције, тако да може да оксидује кисеоник и продукује неке од реактивних врста кисеоника. Услед тога оксидациони стрес се намеће као значајан механизам индуковања оштећења васкуларног зида.

*N*-метил-*D*-аспартатни (NMDA) рецептор је јонотропни глутаматни рецептор који омогућава улазак  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  у ћелију, као и излазак  $\text{K}^+$  из ћелије. Позната је улога ових рецептора у физиологији нервних ткива, међутим ови рецептори су изоловани и у кардиомиоцитима и ендотелним ћелијама. Активација NMDA рецептора узрокује повећање интрацелуларне концентрације  $\text{Ca}^{2+}$ , као и концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  у митохондријама што за последицу има повећање оксидационог стреса. Актуелна истраживања указују на чињеницу да смањење контрактилности миокарда током хиперхомоцистеинемije настаје као последица активације NMDA рецептора и последичним повећањем концентрације  $\text{Ca}^{2+}$  у кардиомиоцитима, као и повећањем продукције слободних кисеоничких радикала. Студије које се баве испитивањем утицаја примене антагониста NMDA рецептора на нервни систем су показале да примена ових супстанци скоро потпуно превенира неуротоксичност изазвану хиперхомоцистеинемijом, али у доступним студијама нема радова који се баве ефектима акутне примене агониста и антагониста наведених рецептора у изолованом срцу сисара.

### 2.5. Значај и циљ истраживања

#### *Значај студије*

Ово истраживање би могло да донесе нове и до сада мало познате податке о активности *N*-метил-*D*-аспартатних рецептора у миокарду и коронарном ендотелу, као и о њиховом квантитативном значају у одржавању хомеостазе  $\text{Ca}^{2+}$  у кардиомиоцитима. Студија би донела и нове резултате везане за оксидациони статус током модулације NMDA рецептора. У складу са значајем одређивања вредности хомоцистеина (као фактора ризика за развој

обољења кардиоваскуларног система), резултати студије могу да дају додатне податке о могућим терапијским приступима у третману хиперхомоцистеинемije и превенцији низа обољења, што је основа за евентуалне клиничке студије.

### *Циљ и хипотезе студије*

Главни циљ истраживања је да се испитају ефекти акутне примене агониста и антагониста NMDA рецептора, уз акутну примену хомоцистеина, на миокард и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.

Главна хипотеза студије је да акутна примена агониста и антагониста NMDA рецептора може узроковати модификацију евентуалног штетног дејства акутне администрације хомоцистеина на функционисање миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.

## **2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима**

Студије спроведене последњих година указују на значај NMDA рецептора у функционисању миокарда. Како је доказана улога претеране стимулације NMDA рецептора хомоцистеином у патогенези одређених неуролошких поремећаја (епилепсија, Паркинсонова болест, Алцхајмерова болест), претпоставља се да ови рецептори у условима хиперхомоцистеинемije учествују у индуковању кардиоваскуларних поремећаја.

Механизми остваривања негативних ефеката хомоцистеина, као и евентуална улога слободних радикала, у кардиоваскуларном систему још увек нису довољно истражене теме. Такође, у доступној литератури нема довољно података, како о улози NMDA рецептора у физиологији миокарда, тако и о повезаности ових рецептора и поремећаја узрокованих хиперхомоцистеинемijом.

## **2.7. Методе истраживања**

### *Врста студије*

Студија припада експерименталним истраживањима *in vitro*.

### *Популација која се истражује*

Планирано истраживање би обухватило 240 пацова (Wistar albino сој, мушки пол, старости 10 недеља, просечне телесне масе  $200 \pm 50$ г) којима би се изоловало срце и перфундовало методом ретроградне перфузије по Лангендорфу (Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary) при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH<sub>2</sub>O. Животиње би се чувале у строго контролисаним условима (температура ваздуха  $22 \pm 1$ °C, релативна влажност ваздуха 50%, циклус светлост:тама 12:12 часова, са почетком светлог периода у 9 часова), и са слободним приступом води и стандардној храни. Све експерименталне процедуре ће се радити у складу са прописаним актима (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC) и принципима етичности.

Истраживање је одобрено дана 11. 12. 2014. од стране Етичког одбора за заштиту добробити експерименталних животиња (одлука бр. 01-13786/2), Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, као и Етичког савета за заштиту добробити експерименталних животиња Републике Србије.

### Материјал и методе

У студији је предложено шеснаест (16) група (12 животиња у групи): 1) перфузија комплексним Krebs-Hensenleit-овим физиолошким раствором (контролна група) 2) апликација DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорида (10  $\mu\text{mol/l}$ ), 3) апликација глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ), 4) апликација глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ), 5) ко-апликација глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ), 6) апликација МК801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), 7) апликација мемантин-хидрохлорида (100  $\mu\text{mol/l}$ ), 8) апликација ифенпродил-тартарата (1  $\mu\text{mol/l}$ ), 9) апликација N-метил-D-аспартата (NMDA) (100  $\mu\text{mol/l}$ ), 10) ко-апликација МК801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ), 11) ко-апликација МК801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ), 12) ко-апликација МК801 (50  $\mu\text{mol/l}$ ), глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ), 13) апликација верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), 14) ко-апликација верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ), 15) ко-апликација верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ) 16) ко-апликација верапамила (3  $\mu\text{mol/l}$ ), глицина (100  $\mu\text{mol/l}$ ) и глутамата (100  $\mu\text{mol/l}$ ).

Изолована срца из свих студијских група ће прво бити подвргнута стабилизацији у трајању од 30 минута при константном перфузионом притиску од 70  $\text{cmH}_2\text{O}$ . Након периода стабилизације, испитиване супстанце ће се апликовати континуираном перфузијом (минимално 5 минута) док се не постигне стабилни коронарни проток. Након постизања стабилног коронарног протока, искључује се перфузија испитиваном супстанцом и следи период испирања (*wash out*) до постизања стабилног коронарног протока (минимално 5 минута).

Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве аурикуле и прокидањем митралне валвуле омогућило би се убацивање сензора (transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary) у леву комору ради директног и континуираног праћења параметара функције леве коморе:  $dp/dt \text{ max}$  - максимална стопа промене притиска у левој комори,  $dp/dt \text{ min}$  - минимална стопа промене притиска у левој комори, SLVP - систолни притисак леве коморе, DLVP - дијастолни притисак леве коморе, HR - срчана фреквенца. Вредност коронарног протока би се одређивала флоуметријски.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи параметри оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^-$ ), водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да примена хомоцистеина смањи вредности кардиодинамских параметара и коронарни проток као и да узрокује повећање вредности параметара оксидационог стреса. Такође се очекује да агонисти и антагонисти NMDA рецептора изазову различите ефекте на миокарду, као и различите промене оксидационог статуса, како самостално тако и у комбинацији са хомоцистеином. Добијени резултати ће допринети бољем разумевању улоге NMDA рецептора у функционисању миокарда, као и улоге ових рецептора у испољавању штетних ефеката хиперхомоцистеинемije.

## 2.9. Оквирни садржај дисертације

Повезаност метаболизма хомоцистеина, NMDA рецептора и оксидационог стреса у оквиру кардиоваскуларног система још увек није довољно истражена. Узимајући у обзир значај хомоцистеина у патогенези низа обољења кардиоваскуларног система, главни циљ ове студије је да испита улогу NMDA рецептора у развоју ових поремећаја применом хомоцистеина, као и агониста и антагониста наведених рецептора. Планирано истраживање би било подељено у шеснаест група. Процена ефеката примене ових супстанци на срчани мишић и коронарну циркулацију пацова вршиће се анализом кардиодинамских параметара леве коморе ( $dp/dt \max$ ,  $dp/dt \min$ , SLVP, DLVP, HR) и величине коронарног протока. У узорима коронарног венског ефлуента би се спектрофотометријски мерила активност маркера оксидационог стреса. Ово истраживање би могло да да нове информације о NMDA рецепторима у срцу, као и њиховом значају у развоју поремећаја кардиоваскуларног система услед хиперхомоцистеинемije, као и о улози оксидационог стреса.

## 2.10. Предлог ментора

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

## 2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Експериментална физиологија.

## 2.12. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Гвозден Росић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **Проф. др Драган Ђурић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Физиологија, члан.
3. **Доц. др Владимир Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија, члан;

## Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Ивана Срејовића комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да донесе нове и до сада мало познате податке о улози NMDA рецептора у кардиоваскуларном систему, као и о улози NMDA рецептора у механизмима настанка поремећаја индукованих хиперхомоцистеинемijом у наведеном систему, са посебним освртом на оксидациони статус.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Ивана Срејовића бити од великог научног и практичног значаја у смислу разумевања комплексних молекуларних интеракција, и значају NMDA рецептора у оквиру њих, које учествују у настанку кључних (пато)физиолошких процеса у кардиоваскуларном систему.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Ивана Срејовића под називом „**Ефекти модулације N-метил-D-аспартатних рецептора на изолованом срцу пацова**“ и одобри њену израду.

**Проф. др Гвозден Росић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија

---

**Проф. др Драган Ђурић**, члан, редовни професор Медицинског факултета  
Универзитета у Београду, за ужу научну област Физиологија

---

**Доц. др Владимир Живковић**, члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета  
у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија

---

У Крагујевцу, 03. 02. 2015.