

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЉЕНО: 29.05.17			
Орг.јед.	Број	Прилог	Вредно.
05	6588/2-2		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-456/28 од 03.05.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Јелене Ристић** под називом:

“Утицај хроничног прекодиционирања инхибиторима фосфодиестеразе 1 самостално и у комбинацији са физичком активношћу на функционални опоравак изолованог срца пацова“

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **Проф. др Душан Ђурић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник;
2. **Проф. др Славољуб Јовић**, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине 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;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Јелена Ристић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Мр сци мед Јелена Ристић је рођена 1975. године у Скопљу, Република Македонија. Основну школу и општу гимназију „Михајло Пупин“ је завршила у Београду. На Медицинском факултету Универзитета у Београду је дипломирала 2001. године са просечном оценом 8,86. На Медицинском факултету Универзитета у Приштини, са седиштем у Косовској Митровици је одбранила магистарску тезу 2007. године из области клиничке фармакологије. Завршила је специјализацију из клиничке фармакологије на Медицинском факултету Универзитета у Београду 2012. године.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Утицај хроничног прекондиционарања инхибиторима фосфодиестеразе 1 самостално и у комбинацији са физичком активношћу на функционални опоравак изолованог срца пацова“

Предмет: Испитивање ефеката хроничног прекондиционарања инхибиторима фосфодиестеразе 1 самостално и у комбинацији са физичком активношћу на функционални опоравак изолованог срца пацова током исхемије и реперфузије.

Хипотезе:

- Прекондиционарање физичком активношћу и прекондиционарање инхибиторима фосфодиестеразе 1 највероватније има протективну улогу у промени редокс статуса, функционалне и морфолошке карактеристике срца пацова.
- Комбинована примена ова два маневра прекондиционарања би требало да покаже бенефите у погледу редокс статуса, функционалних и морфолошких карактеристика изолованог срца пацова у односу на самостално примењену физичку активност, односно прекондиционарање инхибиторима фосфодиестеразе 1.
- Вредности антиоксидационих ензима код животиња које су претходно биле изложене комбинованом прекондиционарању највероватније ће бити статистички више у односу на вредности ових параметара код животиња које су биле изложене само једном од испитиваних маневра прекондиционарања.
- Хистолошком анализом би требало да се утврде најмања оштећења на квадрицепсу и срцу пацова која су била изложена комбинованом прекондиционарању у односу на

подгрупе пацова која су била изложена само једном од два испитивана маневра прекондиционирања.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Јелена Ристић, је објавила рад у целини у часопису категорије M52, у коме је први аутор, чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

Ristic J, Nikolic T, Jeremic J, Stojic I, Janicijevic-Hudomal S, Popović M, Arsic-Komljenovic G, Srejovic I, Zivkovic V. The impact of positive acceleration (+GZ) on antioxidant capacity and histopathological alterations in different organs and tissues in rats. *Serb J Exp Clin Res.* DOI: 10.1515/sjecr-2016-0066. **M52**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Исхемијска болест срца представља значајан здравствени проблем и сматра се једним од водећих узрока mortalитета и morbидитета. Последњих година научници све више напора улажу у расветљавање механизма којим настају исхемијско-реперфузионе повреде које су одговорне за акутну срчану дисфункцију и смрт миоцита, као и за касније хроничне компензационе промене у срчаној морфологији које доводе до инсуфицијенције и смрти. Досадашњи литературни подаци указују да краткотрајни периоди исхемије и реперфузије могу да формирају заштитни механизам миокарда за касније продужене периоде исхемије и реперфузије. Ова стратегија се назива исхемијско прекондиционирање. С обзиром да је клиничка примена исхемијског прекондиционирања ограничена, последњих година све више се проучавају и други нефармаколошки и фармаколошки маневри прекондиционирања.

Поред нефармаколошких, у великој мери су проучавани и различити фармаколошки маневри прекондиционирања, али научници још увек нису успели да разјасне њихове комплексне кардиопротективне ефекте. Мишљења су често контроверзна, а у литератури се спомиње улога аденозина, норепинефрина, брадикинина, као и слободних радикала. Протеин киназа С такође има значајну улогу у исхемијском прекондиционирању, као и тирозин киназа, АТР сензитивни калијумски канали. Међутим, многобројне студије све више потенцирају улогу калцијума како у исхемији тако и у

прекондиционарању. У више наврата је доказано да услед исхемије долази до смањења доступног АТР-а чиме се инхибира $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТР-аза}$ и долази до преоптерећења калцијумом (Ca^{2+} *overload*). Повећана продукција калцијума у цитоплазми значајна је у исхемијско-реперфузионим повредама миокарда јер поспешује његово везивање за калмодулин киназу II и настанак калцијум/калмодулин ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) комплекса који даље активира протеин киназу, али и азот оксид синтазу која из L-аргинина ствара цитрулин уз ослобађање азот монооксида.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања се огледа у потенцијалним новим сазнањима о патофизиологији развоја промена у миокарду изазваних исхемијом и реперфузијом, као и сазнањима о фармаколошким и нефармаколошким методама њиховог минимизирања.

Циљ ове студије би био да испита ефекате хроничног прекондиционарања инхибиторима фосфодиестеразе 1, самостално и у комбинацији са физичком активношћу на функционални опоравак изолованог срца пацова током исхемије и реперфузије. У складу са овим општим циљем постављени су и следећи специфични циљеви:

1. Испитивање ефеката хроничне администрације различитих лекова из групе инхибитора фосфодиестеразе 1 у моделу фармаколошког прекондиционарања на функцију и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
2. Проучавање ефеката физичке активности у моделу прекондиционарања на функционисање миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
3. Евалуација ефеката комбиноване примене фармаколошког и прекондиционарања физичком активношћу на функцију миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
4. Компарација ефеката хроничне примене инхибитора фосфодиестеразе 1 као фармаколошких агенаса у моделу прекондиционарања и прекондиционарања физичком активношћу, као и њихове комбиноване примене на миокард и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
5. Испитивање учешће различитих биомаркера оксидационог оштећења: нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикала (O_2^-), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну

циркулацију при примени модела фармаколошког и прекондиционирања физичком активношћу као и њихове комбиноване примене.

6. Одређивање вредности антиоксидационих ензима и слободних радикала из крви животиња које су претходно биле изложене физичком активношћу, хроничним прекондиционирањем инхибиторима фосфодиестеразе 1 и њиховом комбинованом применом и међусобно упоређивање вредности ових параметара.
7. Стандардним хистолошким методама утврдити и упоредити оштећења квадрицепса и миокарда настала након различитих манерава прекондиционирања и исхемије.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

На основу епидемиолошких података примећено је да физичка активност смањује инциденцу смртности од инфаркта миокарда, па је самим тим често проучавана од стране многих научника, као један од нефармаколошких маневара прекондиционирања. Механизми за које се сматра да су одговорни за кардиопротективне ефекте физичке активности још увек нису у потпуности истражени. Доступни литературни подаци указују да су у многоне слични, али не и потпуно исти, механизмима исхемијског прекондиционирања.

Резултати досадашњих истраживања намећу питање да ли хронична употреба инхибитора Ca^{2+}/CaM комплекса (који су познати као инхибитори фосфодиестеразе 1) може да послужи као фармаколошки маневар прекондиционирања. Због свега наведеног, ова студија је дизајнирана тако да испита улогу инхибитора фосфодиестеразе 1 у прекондиционирању миокарда, како самостално тако и у комбинацији са нефармаколошким маневром прекондиционирања. За нефармаколошко прекондиционирање одабрали смо физичку активност јер су *Bowles* и *Starnes*, још деведесетих година прошлог века, показали да су срца тренираних пацова мање подложна накупљању калцијума од срца пацова који нису тренирали.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Хронична, експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vivo* и *in vitro*.

2.7.2. Популација која се истражује

Планирано истраживање би обухватило 96 пацова (*Wistar albino* сој, телесне масе 250 ± 50 g) мушког пола. У зависности од тога да ли ће бити подвргнуте прекондиционарању физичком активношћу, све животиње бисмо поделили на две експерименталне групе, а у зависности од инхибитора фосфодиестеразе 1 којим ће се спроводити фармаколошко прекондиционарање, обе експерименталне групе бисмо поделили на четири одговарајуће подгрупе.

Прва група би обухватила пацове (старости 6 недеља) који би били подвргнути прекондиционарању физичком активношћу. За физичку активност, користиће се модел трчања на тредмилу за пацове. Адаптација животиња на трчање се спроводи 10 минута дневно пет дана уз 2 дана одмора током две недеље (прва недеља 5 m/мин, друга недеља 10 m/мин). Да би се детерминисао интензитет тренинга, одређиваће се аеробни капацитет животиња коришћењем тестова као што су максимално оптерећење на тредмилу или мерење нивоа лактата у крви. На основу добијених вредности аеробне способности израчува се брзина којом ће животиње трчати током тренажног процеса, како би се обезбедио умерени интензитет тренинга који је, према литературним подацима најефикаснији у постизању позитивних ефеката на кардиоваскуларни систем. Након адаптације животиња и детерминисања интензитета тренинга, животиње ће 8 недеља у трајању од 60 минута бити подвргнуте тренингу на тредмил траци пет пута у току недеље. Шесте недеље од почетка тренинга, ову групу бисмо поделили на 4 подгрупе, при чему би прва подгрупа била контролна, односно не би била подвргнута фармаколошком прекондиционарању, док би преостале три групе биле подвргнуте фармаколошком прекондиционарању (интраперитонеална инјекција одговарајућег инхибитора фосфодиестеразе 1) у трајању од 3 недеље.

Друга група пацова (старости 11 недеља) би била подвргнута само фармаколошком прекондиционарању у трајању од 3 недеље. У зависности од примењеног лека за фармаколошко прекондиционарање поделили бисмо је на 4 подгрупе. Прва група би била контролна (и.п. физиолошки раствор), док би се друга, трећа и четврта међусобно разликовале по интраперитонеално апликованом инхибитору фосфодиестеразе 1.

Након хроничних третмана прекондиционарања животиње ће се жртвовати, а изолована срца пацова ће бити перфундована методом ретроградне перфузије по

Langendorff-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH₂O. Након стабилизације срца ће бити подвргнута глобалној исхемији у трајању од 20 минута, а потом и реперфузији у трајању од 30 минута. Све експерименталне процедуре ће се радити у складу са прописаним актима (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципима етике.

Истраживање је одобрено од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.7.3. Узорковање

Истраживање ће бити подељено у две групе. Прва група (n=48) би обухватила животиње које ће бити подвргнуте прекондиционирању физичком активношћу у трајању од 8 недеља. Након пет недеља од почетка физичке активности, животиње ће бити подељене на четири подгрупе у зависности од лекова који ће се користити за фармаколошко прекондиционирање. Животињама из све четири подгрупе ће се три недеље у једној дневној дози интраперитнеално (i.p.) апликовати одговарајући лек, односно физиолошки раствор уколико је реч о контролној групи.

Подгрупа Т контрола (n=12) – физиолошки раствор (1ml/дан i.p.);

Подгрупа Т + винпоцетин (n=12) – 10 mg/kg/дан винпоцетина (i.p.);

Подгрупа Т + нимодипин (n=12) – 10 mg/kg/дан нимодипина (i.p.);

Подгрупа Т + никардипин (n=12) – 6 mg/kg/дан никардипина (i.p.).

Након осам недеља од почетка тренирања, животиње ће бити жртвоване, при чему ће изолована срца бити подвргнута глобалној исхемији и реперфузији, према већ споменутом протоколу, на *Langendorff*-овом апарату.

Друга група (n=48) би обухватила животиње које ће бити подвргнуте само фармаколошком маневру прекондиционирања (i.p. инјекција одговарајућег инхибитора фосфодиестеразе 1 у трајању од 3 недеље). У зависности од примењеног фармаколошког агенса биће подељена у четири подгрупе.

Подгрупа контрола (n=12) – физиолошки раствор (1ml/дан i.p.);

Подгрупа винпоцетин (n=12) – 10 mg/kg/дан винпоцетина (i.p.);

Подгрупа нимодипин (n=12) – 10 mg/kg/дан нимодипина (i.p.);

Подгрупа никардипин (n=12) – 6 mg/kg/дан никардипина (i.p.).

Након тронедељног фармаколошког прекодиционарања животиње ће бити жртвоване, а њихова изолована срца ће на *Langendorff*-овом апарату подвргнута глобалној исхемији и реперфузији.

Лекови из групе инхибитора фосфодиестеразе 1 ће бити растворени у разблаженом раствору диметил сулфоксида (DMSO) [DMSO:физиолошки раствор (10:90)]. Једнака количина DMSO биће примењивана и у контролним групама.

2.7.4. Варијабле

Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе 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:

- а) $dp/dt \max$ - максимална стопа промене притиска у левој комори,
- б) $dp/dt \min$ - минимална стопа промене притиска у левој комори,
- в) *SLVP* - систолни притисак леве коморе,
- г) *DLVP* - дијастолни притисак леве коморе и
- ђ) *HR* - срчана фреквенца.

Вредности коронарног протока би се одређивале флоуметријски. Коронарни венски ефлуент ће бити прикупљан у следећим тачкама експеримента: у тачки стабилизације, у првој тачки реперфузије након двадесетоминутне исхемије као и на сваких 5 минута током периода реперфузије. У наведеним интервалима биће бележени и сви претходно наведени кардиодинамски параметри.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери оксидативног стреса:

1. индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS,
2. азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-),
3. супероксид анјон радикал (O_2^-),
4. водоник пероксид (H_2O_2).

Такође, свим животињама би се узимала венска крв из које би се одређивале вредности антиоксидационих ензима и слободних радикала у циљу испитивања потенцијалних разлика између група као и између подгрупа. Након центрифугирања, из плазме би се одређивале вредности оксидационог стреса:

1. индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS,
2. азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-),
3. супероксид анјон радикал (O_2^-),
4. водоник пероксид (H_2O_2),

док би се из еритроцита одређивале вредности антиоксидационих ензима:

5. каталаза (CAT),
6. супероксид дисмутаза (SOD),
7. глутатион пероксидаза (GSH).

Након жртвовања изоловао би се и квадрицепс пацова који би се уз срце користио за хистолошку анализу. Квадрицепс и срца животиња се фиксирају у 4% пуферизованом формалину и уграђују у парафинске калупе. Потом се секу на пресеке дебљине 4 микрона и боје хематоксилином/еозином и хематоксилин/еозин/флоксином.

Током експерименталног рада биће поштовани сви прописи о добробити лабораторијских животиња као и правилник за рад са експерименталним животињама Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, који су усклађени са Европском директивом у овој области.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на литературним подацима. За прорачун је коришћен t -тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма.

Узимајући у обзир резултате ових студија, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 96 (по 12 у свакој групи). Међутим, због могућности искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе (комплијанса – некомплетни подаци), укупни студијски узорак је утврђен на најмање 104 експерименталне животиње.

2.7.6. Статистичка обрада података

Статистичка обрада експерименталних података ће се обављати на следећи начин:

- 1) За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користиће се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
- 2) За испитивање нормалности расподеле користиће се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
- 3) За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће се Студентов Т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, користиће се *Bonferroni* тест.
- 4) Статистичка обрада података ће се радити у статистичком пакету *SPSS 18.0 for Windows*.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се резултати ове студије потврде кардиопротективну улогу инхибитора фосфодиестеразе 1, као и физичке активности на анималном моделу. Такође, очекује се да ће комбинована примена ова два различита маневра прекондиционирања показати још боље ефекте у заштити миокарда од исхемијско-реперфузионих повреда. Најинтензивније промене се очекују у редокс статусу, као једном од иницијалних механизма, од кога се очекују функционалне и морфолошке промене у периоду реперфузије.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Циљ овог истраживања је да испита ефекте примене инхибитора фосфодиестеразе 1, самостално или у комбинацији са физичком активношћу на промене у миокарду изазване исхемијом и реперфузијом. Ово би била једна од ретких студија која би испитивала комбиновану примену два различита маневра прекондиционирања, односно једина која би испитивала комбиновану примену физичке активности и инхибитора фосфодиестеразе 1. Резултати ове студије могу да омогуће боље разумевање до сада нерасветљених

механизама различитих облика прекондиционирања, а самим тим и да буду значајна основа за будућа клиничка испитивања из ове области.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже проф. др Марко Фолић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација.

Проф. др Марко Фолић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1 Компетентност ментора

Радови проф. др Марка Фолића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Mijailovic M, Lukic S, Laudanovic D, **Folic M**, Folic N, Jankovic S. Effects of nimodipine on cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage treated by endovascular coiling. *Adv Clin Exp Med*. 2013; 22(1):101-9.
2. Andjelkovic M, Jankovic S, Mitrovic M, Mladenovic V, Nikolic I, Zelen I, Zaric M, Canovic P, **Folic M**. Effects of cardiovascular drugs on TSH serum levels in patients on replacement therapy after thyroidectomy. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2016; 54(8):628-33.
3. Jankovic SM, Jankovic SV, Djuric JM, **Folic MM**, Stojic I. Captopril may influence tone of human oviduct ampulla. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2013; 15(10):760.
4. **Folic MM**, Jankovic SM, Varjacic MR, Folic MD. Effects of methyldopa and nifedipine on uteroplacental and fetal hemodynamics in gestational hypertension. *Hypertens Pregnancy*. 2012; 31(1):31-9.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Душан Ђурић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник;
2. **Проф. др Славољуб Јовић**, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине 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;

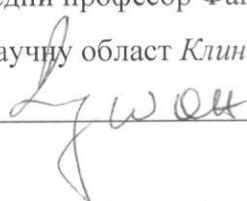
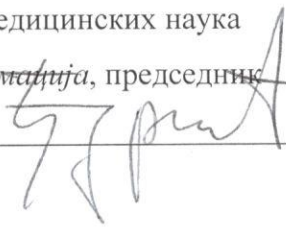
ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, мр сци мед Јелена Ристић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

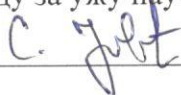
Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Јелене Ристић, под називом “Утицај хроничног прекондиционирања инхибиторима фосфодиестеразе 1 самостално и у комбинацији са физичком активношћу на функционални опоравак изолованог срца пацова“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

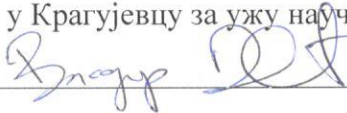
1. Проф. др Душан Ђурић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармакологија, председник

2. Проф. др Славољуб Јовић, ванредни професор Факултета ветеринарске медицине 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



У Крагујевцу, 09.05.2017. године