

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
У КРАГУЈЕВЦУ

2018-5		14. 01. 2021	
05	375		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-918/36 од 10.12.2020. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Невене Драгашевић** под називом:

„Ефекти различитих антихипертензивних агенаса на исхемијско/реперфузиони поремећај изолованог срца пацова са хипертензијом“

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

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. **Проф. др Владимир Живковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан;
3. **Проф. др Драган Ђурић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду 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 **Невена Драгашевић** 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

Невена Драгашевић је рођена у Крагујевцу 07.02.1977. године. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је 1995. године, а 1999. године школовање наставила на Медицинском факултету Универзитета у Београду, где је дипломирала у фебруару 2003. године са просечном оценом 8,69. Приправнички стаж завршава у оквиру Клиничког центра „Крагујевац“ као и у Дому здравља у Крагујевцу. У августу 2004. године почиње да ради у Галеници а.д. на позицији стручног сарадника где је и данас запослена. У октобру 2015. године започиње Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу на изборном подручју Клиничка и експериментална физиологија са спортском медицином. У септембру 2020. године започиње специјализацију из Клиничке фармакологије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

### 2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

**Наслов:** „Ефекти различитих антихипертензивних агенаса на исхемијско/реперфузиони поремећај изолованог срца пацова са хипертензијом“

**Предмет:** Испитивање утицаја хроничне примене различитих антихипертензивних лекова и њихових комбинација на исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца хипертензивних пацова.

**Хипотезе:**

1. Очекује се да хронична примена различитих антихипертензивних лекова и њихових комбинација побољша функционални опоравак срца након исхемије у односу на нетретиране животиње.

2. Претпоставља се да употреба поменутих група лекова може да буде повезана са бољом очуваношћу хистолошке грађе изолованог срца након исхемије.
3. Очекује се да хронична примена ових лекова и њихових комбинација може позивитно да утиче на системски и срчани оксидациони статус.
4. Претпоставља се да употреба поменутих група лекова може да буде повезана са нижим вредностима крвног притиска у односу на нетретиране животиње.

### **2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације**

Кандидат, Невена Драгашевић, је објавила рад у целини у часопису категорије M23, у коме је први аутор, чиме је стакла услов за пријаву теме докторске дисертације.

**Dragasevic N, Jakovljevic V, Zivkovic VI, Draginic ND, Andjic M, Bolevich S, Jovic S.** The role of aldosterone inhibitors on cardiac ischemia/reperfusion injury. *Can J Physiol Pharmacol.* 2020. doi: 10.1139/cjpp-2020-0276. **M23**

### **2.4. Преглед стања у подручју истраживања**

Резистентна хипертензија (РХ) представља значајан здравствени проблем и заступљена је код 10-20% лечених хипертоничара. Пацијенти са РХ су у већем ризику од појаве нежељених кардиоваскуларних догађаја у поређењу са пацијентима код којих је хипертензија контролисана. Наиме, РХ путем симпатичког нервног и система ренин-ангиотензин-алдостерон (РААС) узрокује истезање и повећање дијаметра леве коморе, што за последицу има развој коморских аритмија или чак изненадне срчане смрти.

Два велика клиничка испитивања, RALES и EPHESUS студије, уверљиво су показала да минералкорτικοидни (МР) антагонисти смањују смртност код пацијената са срчаном слабошћу и систолну дисфункцију леве коморе после инфаркта. Предност МР антагониста током блокаде РААС још увек није потпуно схваћена. Истраживања на изолованом срцу пацова која су префундована алдостероном показало је да се он брзо накупља у срчаном ткиву. Еплеренон је други орални антагонист алдостерона доступан за лечење артеријске хипертензије и срчане инсуфицијенције. Лечење еплереноном повезано

је са смањењем крвног притиска и већом стопом преживљавања код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом.

## **2.5. Значај и циљ истраживања**

Значај истраживања се огледа у потенцијално новим сазнањима о ефектима антихипертензивних лекова на исхемијско/реперфузиону повреду миокарда, као и изналажењу нових терапијских могућности у превенцији инфаркта миокарда код пацијената са хипертензијом, као једног од најчешћих узрока смрти широм света.

Циљеви истраживања:

1. Употребом модела глобалне исхемије на изолованом срцу пацова, утврдити ефекте хроничне примене различитих антихипертензивних лекова и њихових комбинација на исхемијско/реперфузиони поремећај функције срца пацова са хипертензијом.
2. Утврдити утицај хроничне администрације различитих антихипертензивних лекова и њихових комбинација на крвни притисак хипертензивних пацова.
3. Испитати утицај хроничне администрације различитих антихипертензивних лекова и њихових комбинација на оксидациони статус изолованог срца пацова са хипертензијом.
4. Утврдити ефекте хроничне примене различитих антихипертензивних лекова и њихових комбинација на системски оксидациони статус пацова са хипертензијом.
5. Испитати утицај хроничне администрације различитих антихипертензивних лекова и њихових комбинација на хистопатолошке промене изолованог срца пацова са хипертензијом.

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

Новије студије потврђују корисност употребе АСЕ инхибитора, зофеноприла, на вредност крвног притиска и последичну срчану хипертрофију . SMILE студија показала је да је рана примена зофеноприла након акутног инфаркта миокарда била повезана са прогностички бољим исходом у поређењу са плацебом или другим АСЕ инхибиторима. Поред

зофеноприла, тиазиди и тиазидима слични диуретици су такође важна група лекова који се користе у лечењу есенцијалне артеријске хипертензије. Иако је њихов благотворни терапеутски ефекат у монотерапији добро познат, они се све више користе у фиксним комбинацијама, посебно са АСЕ инхибиторима или сартанима.

Литературни подаци указују да лечење спиронолактоном, хидрохлортиазидом или њиховом комбинацијом умањује хипертензију и ублажава ендотелну дисфункцију уз изражен антиоксидациони ефекат. Осим тога, у новијим студијама се може уочити да још један тиазидни диуретик, индапамид може имати обећавајућа дејства у погледу кардиопротекције.

Узевши у обзир све претходно поменуто, поставља се питање да ли примена спиронолактона, зофеноприла, хидрохлортиазиди или индапамида самостално или у комбинацији може утицати на постинфарктно ремоделовање коморе?

Имајући у виду да у релевантним научним базама података има мали број студија које проучавају ову проблематику која иначе поседује висок степен клиничке импликације, сматрамо да би дизајнирање експерименталног истраживања на анималном моделу могло да обезбеди нова и важна сазнања и послужи као изванредна основа за будуће клиничке студије.

## **2.7. Методе истраживања**

### **2.7.1. Врста студије**

Експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vivo* и *ex vivo*.

### **2.7.2. Популација која се истражује**

Студија би била спроведена на 80 пацова (*Wistar Kyoto* сој, телесне масе  $250 \pm 30$  g, старости 8 недеља) мушког пола. Експерименталне животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура  $22 \pm 1$  °C, циклус светлост:тама 12:12 часова), док ће вода и храна бити доступна у довољној количини да би могле да их узимају према потреби (*ad libitum*). 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. Такође, пре почетка студије ће се

обезбедити дозвола Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

### 2.7.3. Узорковање

Животиње ће бити разврстане у 8 (осам) група (по 10 животиња у свакој групи):

1. Ia група: Wistar Kyoto нормотензивни пацови мушког пола ће бити подвргнути И/Р (негативна контрола);
2. Ib група – Wistar Kyoto спонтанохипертензивни пацови, без икаквог третмана који ће бити подвргнути И/Р (позитивна контрола);
3. II група – Wistar Kyoto спонтанохипертензивни пацови који ће бити третирани хидрохлортиазидом *per os* током четири недеље у дози од 10 mg/kg ТТ након чега ће бити подвргнути И/Р;
4. III група – Wistar Kyoto спонтанохипертензивни пацови који ће бити третирани индапамидом *per os* током четири недеље у дози од 10mg/kg ТТ након чега ће бити подвргнути И/Р;
5. IV група – Wistar Kyoto спонтанохипертензивни пацови који ће бити третирани спиронолактоном *per os* током четири недеље у дози од 10 mg/kg ТТ након чега ће бити подвргнути И/Р;
6. V група – Wistar Kyoto спонтанохипертензивни пацови који ће бити третирани зофеноприлом *per os* током четири недеље у дози од 15 mg/kg ТТ након чега ће бити подвргнути И/Р;
7. VI група – Wistar Kyoto спонтанохипертензивни пацови који ће бити третирани комбинацијом зофеноприл + хидрохлортиазид + спиронолактон *per os* током четири недеље у претходно поменутих дозама након чега ће бити подвргнути И/Р;
8. VII група – Wistar Kyoto спонтанохипертензивни пацови који ће бити третирани комбинацијом зофеноприл + индапамид + спиронолактон *per os* током четири недеље у претходно поменутих дозама након чега ће бити подвргнути И/Р.

#### *Хемодинаска мерења и потврда хипертензије*

Хипертензија ће бити потврђена индиректним мерењем крвног притиска из репне артерије (*tail cuff method*). Само животиње са вредностима дијастолног/сistolног притиска >

90/150 mmHg ће бити укључене у студију. Након потврде хипертензије, њене вредности ће бити праћене у свим групама једном недељно током четири недеље трајања експерименталног протокола. Помоћу репне плетизмографије (постављењем манжетне на реп пацова) мерени су систолни, дијастолни, средњи артеријски притисаци и срчана фреквенција (ИТС Life Science, Inc., USA). Наведени параметри ће бити одређивани пацовима у свесном стању, два пута током сваке недеље до краја експерименталног периода (након четврте недеље). Животиње ће пре читавања вредности крвног притиска бити постављене у рестреинер одговарајуће величине у коме су остављене 5-10 минута ради адаптације на нове услове (скучено, мрачно и топло – 36 °C). Узимана је просечна вредност три стабилна измерена крвна притиска, а дијастолни притисак би смо израчунавали односом средње вредности три узастопна мерења систолног притиска са средњим артеријским притиском код једног пацова у једном дану.

Ехокардиографија пацова односно ултразвук срца пацова као неинвазивна дијагностичка метода би се радила употребом специјализованог ултразвучног апарата за мале лабораторијске животиње (HP/Phillips SONOS 5500, Imaging System, Hewlett Packard, 3000 Minuteman Road, Andover, Massachusetts 01810). Након премедијације, животињама би се индуковала општа анестезија након чега би се добиле информације о изгледу и функцији срчаних структура и евентуално установиле патоанатомске промене и функционални поремећаји срца пре почетка и на крају експерименталног периода.

#### *Модел глобалне исхемије и испитивање функције изолованог срца пацова*

Након четворонедељне администрације поменутих агенсима животиње ће бити жртвоване а срца изолована, препарисана и постављена на *Langendorff* апарат (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) који путем ретроградне перфузије омогућава испитивање функције изолованог срца пацова. Перфузија срца ће почети при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH<sub>2</sub>O да би после периода стабилизације (око 30 минута) и стабилног срчаног рада уследило изазивање глобалне исхемије заустављањем перфузије односно протока. На овај начин је почео период исхемије изолованог срца у трајању од 20 минута након чега је перфузија срца поново успостављена (период реперфузије) у трајању од 30 минута.

#### 2.7.4. Варијабле

##### *Кардиодинамски параметри*

Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле омогућиће се убацивање сензора 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 (на крају овог периода), у првој тачки реперфузије као и на сваких 5 минута током периода реперфузије. У наведеним интервалима биће бележени и сви претходно наведени кардиодинамски параметри.

##### *Биохемијске анализе биомаркера срчаног оксидационог статуса*

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери срчаног оксидационог статуса:

1. индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS,
2. азот моноксид у форми нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ),
3. супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^-$ ),
4. водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

##### *Биохемијске анализе биомаркера системског оксидационог статуса*

Током жртвовања гиљотинирањем, сакупиће се крв из које ће се спектрофотометријским методама одређивати следећи биомаркери системског оксидационог статуса: про-оксиданси из плазме - TBARS,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , и антиоксиданси из лизата еритроцита – супероксид дизмутаза (SOD), каталаза (CAT), редуковани глутатион (GSH).



### *Патохистолошка анализа срца*

За патохистолошку анализу би се користило срце након завршеног експеримента на *Langendorff* апарату. Узорци срчаног ткива леве коморе би се фиксирани у пуферизованом формалину и уградили у парафинске калупе, а потом секли и бојили Heametoxylin-Eosin и Masson-Trichrome методом.

### **2.7.5. Снага студије и величина узорка**

Прорачун величине узорка је заснован на резултатима раније публикованог истраживања сличног дизајна. 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. Имајући у виду резултате ове студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 56 (по 8 у свакој групи). Међутим, због могућности искључења експерименталних животиња из завршне анализе, укупни студијски узорак је утврђен на 80 експерименталних животиња (по 10 у свакој групи).

### **2.7.6. Статистичка обрада података**

За статистичку обраду података ће се користити специјализовани софтвер *SPSS 25.0*. Параметри од значаја ће се у зависности од њихове природе изражавати као: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења. У циљу процене нормалности расподеле употребљаваће се *Kolmogorov Smirnov* и *Shapir Wilk* тест, и графици: хистограм и *normal QQ plot*. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користитиће се Студентов *t*-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе.

## **2.8. Очекивани резултати докторске дисертације**

Сазнања овог истраживања би могла да помогну у расветљавању кардиопротективних ефеката поменутих антихипертензивних лекова на анималном моделу И/Р. Очекујемо да наши резултати потврде протективну улогу тиазидних диуретика на функционални опоравак изолованог срца пацова. Такође, очекујемо да ће њихова комбинована употреба

са зофеноприлом показати још веће бенефите у заштити миокарда од исхемијско-реперфузионих поремећаја.

## 2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Кроз промене у срчаној и системској редокс равнотежи, објаснио би се један од претпостављених механизма добијених функционалних и морфолошких промена срца пацова. Сви добијени налази би могли да представљају незаобилазну основу за будуће клиничке студије из ове научне проблематике али и несумњиву клиничку вредност.

## 3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже доц. др Тамара Николић Турнић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација.

Доц. др Тамара Николић Турнић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњавају 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 доц. др Тамаре Николић Турнић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Petrovic J, **Turnic TN**, Zivkovic V, Andjic M, Draginic N, Stojanovic A, Milinkovic I, Bolevich S, Jevdjic J, Jakovljevic V. Correlation of Redox Status with Procalcitonin and C-reactive Protein in Septic Patients. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:5147364.
2. Lalovic D, Jakovljevic V, Radoman K, Bradic J, Jeremic N, Vranic A, Milosavljevic I, Jeremic J, Srejovic I, **Turnic TN**, Zivkovic V, Stanojevic D, Bolevich S, Djuric DM. The impact of low mineral content water on cardiac function in diabetic rats: focus on oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 2020;472(1-2):135-144.

3. Nikolic T, Petrovic D, Matic S, **Turnic TN**, Jeremic J, Radonjic K, Srejovic I, Zivkovic V, Bolevich S, Bolevich S, Jakovljevic V. The influence of folic acid-induced acute kidney injury on cardiac function and redox status in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020;393(1):99-109.
4. Cikiriz N, Milosavljevic I, Jakovljevic B, Bolevich S, Jeremic J, **Nikolic Turnic TR**, Mitrovic M, Srejovic IM, Bolevich S, Jakovljevic V. The influences of chokeberry extract supplementation on redox status and body composition in handball players during competition phase. *Can J Physiol Pharmacol.* 2020. doi: 10.1139/cjpp-2020-0095.
5. Mijailovic N, Selakovic D, Joksimovic J, Mihailovic V, Katanic J, Jakovljevic V, **Nikolic T**, Bolevich S, Zivkovic V, Pantic M, Rosic G. The anxiolytic effects of atorvastatin and simvastatin on dietary-induced increase in homocysteine levels in rats. *Mol Cell Biochem.* 2019;452(1-2):199-217.
6. Bradic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jakovljevic V, Petkovic A, **Turnic TN**, Jeremic J, Jeremic N, Mitrovic S, Sobot T, Ponorac N, Ravic M, Tomovic M. Protective Effects of Galium verum L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:4235405.
7. Djuric M, Kostic S, **Nikolic Turnic T**, Stankovic S, Skrbic R, Djuric DM, Zivkovic V, Jakovljevic V, Stevanovic P. The comparison of the effects of ketamine and etomidate on cardiodynamics, biochemical and oxidative stress parameters in Wistar male rats. *Mol Cell Biochem.* 2020;474(1-2):125-134.
8. Radonjic T, Rankovic M, Ravic M, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Jeremic N, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, **Nikolic Turnic T**. The Effects of Thiamine Hydrochloride on Cardiac Function, Redox Status and Morphometric Alterations in Doxorubicin-Treated Rats. *Cardiovasc Toxicol.* 2020;20(2):111-120.

#### 4. Научна област дисертације

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

## 5. Научна област чланова комисије

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

## ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Невена Драгашевић, 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 Невене Драгашевић, под називом „Ефекти различитих антихипертензивних агенаса на исхемијско/реперфузиони поремећај изолованог срца пацова са хипертензијом“ и одобри њену израду.

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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



**Проф. др Владимир Живковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан



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



У Крагујевцу, 22.12.2020. године