

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ГРЧ	18.09.2020		
Орг.јед.	1.231	Транспарентност	
05	7630		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-594/31 од 09.09.2020. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Николе Шобот** под називом:

„Утицај миноциклина на исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца
хипертензивних и дијабетичних пацова“

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

1. Доц. др Тамара Николић Турнић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник;
2. Доц. др Иван Срејовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан;
3. Проф. др Ненад Понорац, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци 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 **Никола Шобот** 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

Никола Шобот је рођен у Бања Луци, Република Српска, Босна и Херцеговина. Након завршене средње школе уписује основне студије медицине на Медицинском факултету у Бања Луци, а затим и специјалистичке студије из интерне медицине на Медицинском факултету у Београду чиме стиче звање специјалиста интерне медицине. Након тога, уписује субспецијалистичке студије из кардиологије, које завршава 2016. године. Студент је треће године Докторских академских студија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Тренутно је запослен на Клиници за кардиохирургију где обавља функцију начелника, са ужом сфером интересовања из области инвазивне кардиологије и кардиохирургије.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Утицај миноциклина на исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца хипертензивних и дијабетичних пацова“

Предмет: Испитати ефекте прекондиционарања и посткондиционарања миноциклином на функционални и морфолошки опоравак срца пацова након исхемијско/реперфузионе повреде (И/Р) миокарда са посебним освртом на услове хипертензије и дијабетеса типа 2.

Хипотезе: Очекује се да употреба миноциклина у смислу пре- и посткондиционарања буде повезана са бољим функционалним опоравком срца након И/Р повреда и да добијени ефекти буду израженији у условима хипертензије и дијабетеса.

Резултати предложене студије би могли у расветљавању утицаја овог тетрациклинског антибиотика као потенцијално новог агенса у превенцији И/Р повреде миокарда сисара.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, **Никола Шобот**, је објавила рад у целини у часопису категорије M51, у коме је први аутор, чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

1. **Sobot N, Sobot T, Radonjic K, Nikolic Turnic T, Petkovic A, Jeremic J, Ponorac N, Lazarevic T, Bolevich S, Jakovljevic V, Djuric D.** Effects of sulfur amino acids on cardiodynamic parameters of isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res.* 2020; doi: 10.2478/sjecr-2020-0025. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Коронарна болест артерија (КАБ) је једна од најчешћих болести срца и главни је узрок оболевања и смртности широм света. Оштећење ткива миокарда у акутном инфаркту миокарда настаје управо због артеријске оклузије која узрокује исхемију док накнадно успостављање поновног протока крви може да резултира реперфузијском повредом. На тај начин, исхемијско/реперфузиона (И/Р) повреда миокарда представља двоструко вулнерабилан феномен који укључује велики број познатих и још увек непознатих патолошких механизма.

Док стопа смртности повезана са КАБ-ом у последњих неколико деценија константно опада због открића терапијских средстава и протокола који углавном делују превентивно или терапијски на исхемијску фазу, КАБ остаје водећи узрок смрти код људи старијих од 35 година. Стога, дубље разумевање патолошких механизма И / Р повреде миокарда су неопходни да би се идентификовали агенси који су усмерени и ка другој, подједнако опасној фази оштећења миокарда (тј. реперфузији).

У фармаколошкој терапији и превенцији И/Р је током претходне две деценије учињено много напора како би се пронашао што ефикаснији агенс који би могао да умањи морфолошка и функционална оштећења миокарда након исхемије и реперфузије. Иако је

проучаван велики број лековитих супстанци, још увек је мало остварено у смислу постизања поменутог циља. Међу проучаваним групама лекова последњих година су се издвојили антибиотици као потенцијално делотворни кардиопротективни фармацеутици са доминантно обећавајућим ефектима из групе тетрациклина.

Миноциклин је антибиотик бактериостатског дејства који припада тетрациклинима друге генерације и одобрен је за лечење широког спектра инфекција проузрокованих грам позитивним и грам негативним бактријама.

Позитивни плејотропни ефекти миноциклина приписују се различитим механизмима укључујући анти-инфламаторно и анти-апоптоичко, инхибиција активности металопротеиназа и антиоксидациони потенцијал односно способност уклањања слободних радикала. Због свега овога претпоставља се да употреба миноциклина може да буде оправдана и корисна у редукцији исхемијско/реперфузионог оштећења различитих ткива.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања се огледа у важности испитивања ефеката миноциклина пре исхемије и за време реперфузије на анималном моделу глобалне исхемије пацова и тиме сазнали значајне податке о потенцијално корисним ефектима овог антибиотика на И/Р повреду миокарда као и могућим механизмима ових ефеката. Специфични циљеви истраживања су такође следећи:

1. Користећи модел глобалне исхемије, испитати утицај примене миноциклина пре исхемије на исхемијско/реперфузиони поремећај функције изолованог срца здравих, хипертензивних и дијабетичних пацова (прекондиционирање миноциклином).
2. Користећи модел глобалне исхемије, испитати утицај примене миноциклина за време реперфузије на исхемијско/реперфузиони поремећај функције изолованог срца здравих, хипертензивних и дијабетичних пацова (посткондиционирање миноциклином).

3. Хистопатолошким методама утврдити морфолошке промене изолованог срца након пре- и посткондиционирања миноциклином на здравим, хипертензивним и дијабетичним пацовима.
4. Испитати утицај примене миноциклина на срчани оксидациони статус здравих, хипертензивних и дијабетичних пацова.
5. Утврдити корелацију свих добијених функционалних, биохемијских и патохистолошких промена.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

У фармаколошкој терапији и превенцији И/Р је током претходне две деценије учињено много напора како би се пронашао што ефикаснији агенс који би могао да умањи морфолошка и функционална оштећења миокарда након исхемије и реперфузије. Иако је проучаван велики број лековитих супстанци, још увек је мало остварено у смислу постизања поменутог циља. Међу проучаваним групама лекова последњих година су се издвојили антибиотици као потенцијално делотворни кардиопротективни фармацеутици са доминантно обећавајућим ефектима из групе тетрациклина.

Миноциклин је антибиотик бактериостатског дејства који припада тетрациклинима друге генерације и одобрен је за лечење широког спектра инфекција проузрокованих грам позитивним и грам негативним бактријама.

Позитивни плејотропни ефекти миноциклина приписују се различитим механизмима укључујући анти-инфламаторно и анти-апоптоичко, инхибиција активности металопротеиназа и антиоксидациони потенцијал односно способност уклањања слободних радикала. Због свега овога претпоставља се да употреба миноциклина може да буде оправдана и корисна у редукцији исхемијско/реперфузионог оштећења различитих ткива.

У доступним базама података за сада има само неколико студија које су проучавале утицај миноциклина на исхемијско и реперфузионо оштећење ткива, не само миокарда. Тако је експериментално показано да овај антибиотик остварује неуропротективне и кардиопротективне ефекте у анималним модели церебралне или миокардне И/Р повреде.

И док су неуропротективна дејства миноциклина током церебралне исхемијско/реперфузионе повреде више изучавана, боље позната и делом разјашњена,

ефекти овог тетрациклина на миокардно И/Р оштећење као и механизам путем кога делује је готово непознат.

На основу свега изнетог сматрамо да би испитивање ефеката миоциклина пре исхемије и за време реперфузије на анималном моделу глобалне исхемије пацова пружио значајне податке и омогућило добијање важних информација о потенцијално корисним ефектима овог антибиотика на И/Р повреду миокарда као и могућим механизмима ових ефеката.

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

Планирано истраживање би обухватило 72 пацова (телесне масе 250 ± 20 g, старости 8 недеља) мушког пола. Дијабетес тип 2 ће бити индукован на пацовима *Wistar albino* соја, на којима ће се испитивати ефекти миноциклина. Поред тога, ефекти миноциклина ће се испитивати на спонтано хипертензивним пацовима (енгл. *spontaneously hypertensive rats* – SHR), а као контрола користиће се нормотензивни пацови *Wistar Kyoto* соја. Експерименталне животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура 22 ± 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 девет експерименталних група (по 8 животиња у свакој групи):

1. Прва група – здрави, нормотензивни, нормогликемични пацови, без икаквог третмана којима ће се изазвати И/Р повреда (контролна група)
2. Друга група – хипертензивни пацови без икаквог третмана којима ће се изазвати И/Р повреда
3. Трећа група – дијабетични пацови без икаквог третмана којима ће се изазвати И/Р повреда
4. Четврта група – нормотензивни пацови чија ће срца бити прекондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М пре изазивања И/Р повреде
5. Пета група – нормотензивни пацови којима ће се најпре изазвати исхемија миокарда а потом ће у реперфузији бити посткондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М
6. Шеста група – хипертензивни пацови чија ће срца бити прекондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М пре изазивања И/Р повреде
7. Седма група – хипертензивни пацови којима ће се најпре изазвати исхемија миокарда а потом ће у реперфузији бити посткондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М
8. Осма група – дијабетични пацови чија ће срца бити прекондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М пре изазивања И/Р повреде
9. Девета група – дијабетични пацови којима ће се најпре изазвати исхемија миокарда а потом ће у реперфузији бити посткондиционирана миноциклином у дози од 1 μ М.

Изазивање дијабетес мелитуса типа 2

У циљу индукције дијабетес мелитус типа 2 животиње ће најпре током 4 недеље бити третирани дијетом богатом мастима (high fat diet) која се састоји од 5% масти, 15% протеина, 51% скроба и 5% влакана након чега ће се пацовима интраперитонеално апликовати једна доза стрептозотоцина у дози од 25 mg/kg телесне масе. 72 сата након инјекције стрептозотоцина пацовима ће се одредити гликемија и инсулинемија наше као

и тест оралног оптерећења глукозом како би се потврдило постојање дијабетеса типа 2. Само животиње са потврђеним дијабетесом ће бити укључене у даљу студију.

Спонтано-хипертензивни пацови

За испитивање утицаја миноциклина на исхемијско/реперфузиону повреду у условима хипертензије користиће се спонтано-хипертензивни пацови добијени генетским укрштањем који после четврте недеље живота почињу са развојем хипертензије. Хипертензија ће бити потврђена методом репне плетизмографије (tail cuff method). Само животиње са вредностима дијастолног/сistolног притиска $> 90/150$ mmHg ће бити укључене у студију.

2.7.4. Варијабле

Модел глобалне исхемије и испитивање функције изолованог срца пацова

У циљу испитивања утицаја прекондиционирања и посткондиционирања миноклицином на исхемијско/реперфузиону срца пацовима ће након жртвовања срце бити изоловано, препарисано и постављено на Langendorff апарат (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) који путем ретроградне перфузије омогућава испитивање функције изолованог срца сисара. Перфузија срца ће почети при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH₂O 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. У случају прекондиционирања миноциклином срца из одговарајућих група ће 5 минута пре исхемије бити перфундована раствором миноциклин хидрохлорида у дози од 1 μ M током 5 минута. Приликом посткондиционирања срца ће у току реперфузије бити перфундована раствором миноциклин хидрохлорида у истој дози.

Кардиодинамски (функционални) параметри

Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле омогућиће 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 (на крају овог периода), на крају перфузије раствором миноциклин хидрохлорида (приликом прекондиционирања), 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 (NO_2^-),
3. супероксид анјон радикал (O_2^-),
4. водоник пероксид (H_2O_2).

Патохистолошке анализе органа од интереса

За патохистолошку анализу би се користило срце након завршеног експеримента на Langendorff апарату. Узорци поменутог органа би се фиксирали у пуферизованом формалину и уградили у парафинске калупе, а потом секли и бојили хематоксилин/еозином и Масон/трихром методом.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима претходно публиковане студије 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.

Узимајући у обзир резултате ове студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 54 (по 6 у свакој групи). Међутим, због могућности искључења експерименталних животиња из завршне анализе, укупни студијски узорак је утврђен на 72 експерименталне животиње (по 8 у свакој групи).

2.7.6. Статистичка обрада података

Статистичка анализа резултата ће се спровести коришћењем статистичког програма SPSS 22.0 за Windows. 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, користиће се Студентов т-тест, Mann-Whitney тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Резултати предложене студије би могли да помогну у бољем разумевању ефеката прекондиционирања и посткондиционирања миноциклином на исхемијско/реперфузионо оштећење срца. У том смислу, расветлили би се утицаји овог тетрациклинског антибиотика као потенцијално новог агенса у превенцији И / Р повреде миокарда сисара.

Осим тога, оригиналност овог истраживања се огледа у чињеници да ће се по први пут ефекти поменутог лека испитивати у условима хипертензије и дијабетеса као стања која свако на свој начин ремети функцију срца. Додатно кроз испитивање срчаног оксидационог статуса утврдио би се један од потенцијално важних механизма добијених ефеката.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Сазнања овог истраживања могу да буду од практичне важности у смислу указивања на значај нове фармаколошке припреме миокарда за исхемију и на тај начин превенцију исхемијско/реперфузионог оштећења. Због тога добијени налази могу да представљају изванредну основу за будуће базичне и клиничке студије из ове тематике.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се Проф. Др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Проф. Др Владимир Јаковљевић 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 Проф. др Владимира Јаковљевића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Bradic J, Petkovic A, Simonovic N, Radovanovic M, Jeremic J, Zivkovic V, Mitrovic S, Bolevich S, **Jakovljevic V**, Sretenovic J, Srejovic I. Preconditioning with hyperbaric oxygen and calcium and potassium channel modulators in the rat heart. *Undersea Hyperb Med.* 2019;46(4):483-494.
2. Jeremic JN, **Jakovljevic VL**, Zivkovic VI, Srejovic I, Bradic J, Bolevich S, Nikolic Turnic T, Mitrovic S, Jovicic N, Tyagi S, Jeremic N. The cardioprotective effects of diallyl trisulfide on diabetic rats with ex vivo induced ischemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 2019;460(1-2):151-164.
3. Prokic V, Plecevic S, Bradic J, Petkovic A, Srejovic I, Bolevich S, Jeremic J, Bolevich S, **Jakovljevic V**, Zivkovic V. The impact of nine weeks swimming exercise on heart function in hypertensive and normotensive rats: role of cardiac oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness.* 2019; 59(12):2075-2083.

4. Petkovic AM, **Jakovljevic VL**, Bradic JV, Jeremic J, Jeremic N, Nikolic Turnic T, Jovicic N, Rosic V, Srejovic I, Zivkovic V. The Effects of Potassium Cyanide on the Functional Recovery of Isolated Rat Hearts after Ischemia and Reperfusion: The Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 5979721.
5. Nikolic Turnic TR, **Jakovljevic VL**, Djuric DM, Jeremic NS, Jeremic JN, Milosavljevic IM, Srejovic IM, Selakovic DV, Zivkovic VI. Efficiency of atorvastatin and simvastatin in improving cardiac function during the different degrees of hyperhomocysteinemia. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018;96(10):1040-1049.

4. Научна област дисертације

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

5. Научна област чланова комисије

1. Доц. др Тамара Николић Турнић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник;
2. Доц. др Иван Срејовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан;
3. Проф. др Ненад Понорац, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци за ужу научну област *Физиологија*, члан.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

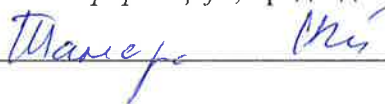
На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, **Никола Шобот**, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата **Николе Шобот**, под називом „Утицај миноциклина на исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца хипертензивних и дијабетичних пацова“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

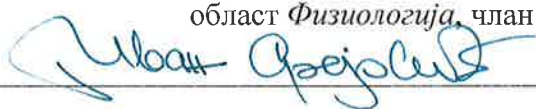
Доц. др Тамара Николић Турнић

доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник



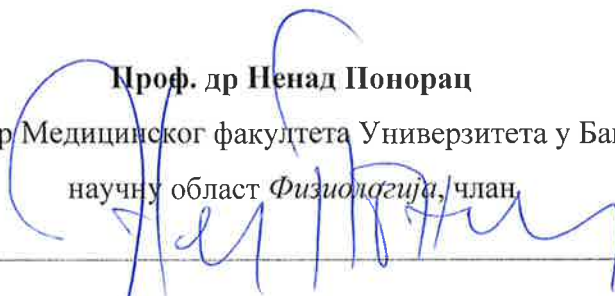
Доц. др Иван Срејовић,

доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан



Проф. др Ненад Понорац

ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци за ужу научну област *Физиологија*, члан



У Крагујевцу, 10.09.2020. године