

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

| ПРИМЉЕНО | | | |
|-----------|----------|----------|----------|
| Орг. јед. | Број | Датум | Вредност |
| 05 | 582915-3 | 09.05.17 | |

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-374/29 од 05.04.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др **Нине Симоновић** под називом:

“Утицај прекондиционирања антагонистима L-типа калцијумских канала и никорандилом самостално и у комбинацији са хипербаричном оксигенацијом на функционални опоравак изолованог срца пацова“

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

1. Проф. др Сузана Пантовић, ванредни 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.

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат др **Нина Симоновић** 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

Др Нина Симоновић је рођена Рођена у Београду 5. априла 1987. године. У периоду од 2002-2006. године завршила Гимназију и то прве три године у Београду, а завршну годину у Сједињеним Америчким Државама. Медицински факултету Универзитета у Београду, одсек за енглеску наставу уписала је 2006/2007. године. Дипломирала у јуну 2012. године, са просечном оценом 8,76.

У октобру, 2012. године започиње Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу на изборном подручју Клиничка и експериментална физиологија са спортском медицином. Успешно је положила усмени докторски испит на наведеном смеру.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Утицај прекондиционарања антагонистима L-типа калцијумских канала и никорандилом на функционални опоравак изолованог срца пацова“

Предмет: Испитивање ефеката акутне примене различитих лекова из групе антагониста калцијумских канала и никорандила као фармаколошких агенаса, ефеката хипербаричне оксигенације, као и њихове комбиноване примене, у моделу прекондиционарања на функционисање миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова. Испитивање улоге оксидационог стреса у процесима који се одвијају у миокарду током примене наведених модела прекондиционарања мерењем биомаркера оксидационог оштећења: нитрита (NO^{2-}), супероксид анјон радикала (O^{2-}), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2).

Хипотезе:

– Прекондиционарање хипербаричном оксигенацијом и прекондиционарање антагонистима калцијумских канала односно никорандилом има протективни утицај на промене редокс статуса, функционалне и морфолошке карактеристике срца пацова.

– Комбинована примена прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом и испитиваним фармаколошким агенсима има бенефите у погледу редокс статуса, функционалних и морфолошких карактеристика изолованог срца пацова у односу на самостално примењене споменуте маневре прекондиционарања.

– Вредности антиоксидационих ензима код животиња које су претходно биле изложене прекондиционирању хипербаричном оксигенацијом биће статистички више у односу на вредности ових параметара код животиња које нису биле изложене хипербаричној оксигенацији; такође, вредности слободних радикала биће ниже у групи животиња које су биле прекондициониране у односу на групу која није била изложена прекондиционирању хипербаричној оксигенацији.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

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

Simonovic N, Jeremic J. Role of calcium channel blockers in myocardial preconditioning. Ser J Exp Clin Res. 2016; DOI: 10.1515/SJECR20160073 M52

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Исхемијско-реперфузионе повреде које настају као последица акутног инфаркта миокарда, најчешћи су узрок морталитета и морбидитета пацијената са коронарном болешћу срца. Патогенеза последичног оштећења ткива је веома комплексна и још увек недовољно истражена. Досадашњи литературни подаци указују да услед исхемије долази до усмеравања метаболизма у правцу анаеробне гликолизе и смањења доступног АТФ-а чиме се инхибира Na^+/K^+ АТФ-аза и повећава количина калцијума у цитоплазми. Повећана продукција калцијума у цитоплазми је значајна у исхемијско-реперфузионим повредама миокарда јер активира протеазе зависне од калцијума које индукују апоптозу. Прекондиционирање представља методу којом се формира заштитни механизам миокарда на касније продужене периоде исхемије и реперфузије. У зависности од примењене методе разликујемо исхемијско, фармаколошко и нефармаколошко прекондиционирање. Механизам који омогућава заштитне ефекте исхемијског прекондиционирања још увек није у потпуности разјашњен и мишљења су често подељена. Узимајући у обзир да исхемијско прекондиционирање најчешће није клинички применљиво, последњих деценија пажња научне јавности усмерена је ка фармаколошким и нефармаколошким маневрима који би се користили пре коронарне оклузије у циљу смањења величине

инфаркта миокарда. Хипербарична оксигенација, се све више испитује као једна од новијих стратегија за нефармаколошко прекоњдиционирање, а досадашњи литературни подаци указују да смањује стопу смртности и сведоче о потенцијалној протективној улози на исхемични миокард.

2.5. Значај и циљ истраживања

Имајући у виду значај кардиоваскуларних болести у погледу броја оболелих, као и у погледу социоекономског значаја, ово истраживање би требало да омогући додатна сазнања о физиолошким и патофизиолошким збивањима у миокарду у условима исхемије.

Циљеви истраживања подразумевају:

1. Испитивање последица акутне примене различитих лекова из групе антагониста калцијумских канала и никорандила, као фармаколошких агенаса, хипербаричне оксигенације, као и њихове комбиноване примене у моделу прекоњдиционирања на функцију и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
2. Поређење ефеката акутне примене антагониста калцијумских канала и никорандила као фармаколошких агенаса у моделу прекоњдиционирања и прекоњдиционирања хипербаричном оксигенацијом, као и њихове комбиноване примене на миокард и коронарну циркулацију изолованог срца пацова.
3. Испитивање улоге различитих биомаркера оксидационог оштећења: нитрита (NO^2), супероксид анјон радикала (O^{2-}), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2) у промени вредности кардиодинамских параметара срчаног рада и коронарне циркулације при примени модела фармаколошког, прекоњдиционирања хипербаричном оксигенацијом и њихове комбиноване примене.
4. Стандардним хистолошким методама утврдити и упоредити акутна оштећења миокарда настала након различитих модела прекоњдиционирања и исхемије.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Последњих деценија у фокусу научних истраживања су новије стратегије прекоњдиционирања које могу довести до смањења исхемијско-реперфузионих повреда.

Многобројне биохемијске и имунолошке студије указују да водећу улогу у самом механизму прекондиционарања има протеин киназа С, јер је доказано да њеном инхибицијом долази до супримирања овог ефекта. Да би се у потпуности разјаснио механизам потребно је испитати и улогу АТР-сензитивних K^+ (K_{ATP}) канала јер активација протеин киназе С отвара ове канале.

Хипербарична оксигенација се последњих година налази у жижи научних интересовања јер ретко изазива нежељене ефекте па се самим тим издваја као пожељан кандидат за клиничку примену у прекондиционарању. Међутим, ефекти комбинованог прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом и фармаколошким агенсима су готово у потпуности неистражени. Малобројне студије иду у прилог томе да њихова комбинована примена може имати корисне ефекте у превенцији исхемијско-реперфузионог оштећења миокарда, али ова запажања би требало додатно испитати.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

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

2.7.2. Популација која се истражује

Планирано истраживање би обухватило 84 пацова (*Wistar albino* сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе 250 ± 50 g). Све животиње би у зависности од тога да ли подлежу прекондиционарању хипербаричном оксигенацијом биле подељене у две експерименталне групе, а потом и на одговарајуће подгрупе у зависности од акутно апликованог фармаколошког агенса.

Први део истраживања (*in vivo*) би обухватио само оне пацове који би били подвргнути прекондиционарању хипербаричном оксигенацијом. Хипербарична оксигенација ће се спроводити у посебно конструисаној хипербаричној комори за пацове (НУВ-С 300). Животиње ће једном дневно, током 14 дана, бити изложене 100% кисеонику у трајању од 60 минута при притиску од 2 АТМ. Како би се избегли ефекти варијација диурналног ритма, хипербарична оксигенација би увек почињала у исто време.

Други део истраживања (*in vitro*) би обухватио све животиње које су укључене у студију. Након жртвовања изолована срца пацова ће се перфундовати методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cm H₂O. Током перфузије срца ће бити подвргнута неким од фармаколошких облика прекондиционарања, а након тога и глобалној исхемији (детаљније објашњено у наставку текста). 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.

Експериментални протокол је предат Етичком одбору за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.7.3. Узорковање

Истраживање ће бити подељено у две групе. Прва група (n=36) би обухватила животиње које ће бити подвргнуте само фармаколошком маневру прекондиционарања, а у зависности од примењеног фармаколошког агенса биће подељена у три подгрупе. Свака од њих ће садржати по 12 животиња.

Подгрупа амлодипин – прекондиционарање амлодипином 5 минута у дози од 0,1 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, исхемија 20 минута, реперфузија 30 минута;

Подгрупа верапамил – прекондиционарање верапамилом 5 минута у дози од 0,63 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, исхемија 20 минута, реперфузија 30 минута;

Подгрупа никорандил – прекондиционарање никорандилом 5 минута у дози од 200 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, исхемија 20 минута, реперфузија 30 минута.

Друга група (n=48) би обухватила животиње које су 60 минута дневно, током две недеље биле изложене прекондиционарању хипербаричном оксигенацијом. Ова група животиња ће бити подељена на четири подгрупе, а свака од њих ће садржати по 12 пацова. Након двонедељног прекондиционарања хипербаричном оксигенацијом, све животиње из ове групе ће бити жртвоване, након чега ће се други део истраживања обавити на *in vitro* моделу изолованог срца пацова.

Подгрупа ХБО – након периода стабилизације, уследиће исхемија у трајању од 20 минута, а потом реперфузија у трајању од 30 минута;

Подгрупа ХБО + амлодипин – прекондиционирање амлодипином 5 минута у дози од 0,1 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, исхемија 20 минута, реперфузија 30 минута;

Подгрупа ХБО + верапамил – прекондиционирање верапамилом 5 минута у дози од 0,63 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, исхемија 20 минута, реперфузија 30 минута;

Подгрупа ХБО + никорандил – прекондиционирање никорандилом 5 минута у дози од 200 $\mu\text{mol/l}$, а након *washout* периода, исхемија 20 минута, реперфузија 30 минута.

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.

Вредност коронарног протока би се одређивала флоуметријски. Коронарни венски ефлуент ће бити прикупљан у следећим тачкама експеримента: у тачки стабилизације, у петом минути фармаколошког прекондиционирања, у првој тачки реперфузије након двадесетоминутне исхемије као и на сваких 5 минута током периода реперфузије. У групи ХБО коронарни венски ефлуент ће бити прикупљан у тачки стабилизације, у првој тачки реперфузије као и у интервалима од 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, животињама би се узимала венска крв из које би се одређивале вредности антиоксидационих ензима и слободних радикала у циљу испитивања потенцијалних разлика између групе која је прекондиционирана хипербаричном оксигенацијом и групе која није подвргнута овом маневру прекондиционирања. 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).

Срца животиња ће бити коришћена за хистолошку анализу. Након завршетка експеримента срца се фиксирају у 4% пуферизованом формалину, а након тога се уграђују у парафинске калупе. Потом секу на пресеке дебљине 4 микрона и боје хематоксилином/еозином и хематоксилин/еозин/флоксином

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на претходно публикованим резултатима. 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 84 (по 12 у свакој групи). Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе (комплијанса – некомплетни подаци), укупни студијски узорак је утврђен на најмање 91 експерименталних животиња.

2.7.6. Статистичка обрада података

Статистичка обрада експерименталних података ће се вршити 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 да резултати ове студије потврде протективну улогу прекондиционирања антагонистима калцијумских канала, агонистима АТР-сензитивних K^+ канала, као и прекондиционирања хипербаричном оксигенацијом на кардиоваскуларни систем изолованог срца пацова. Такође, се очекује да ће њихова комбинована примена показати још веће бенефите у заштити миокарда од исхемијско-реперфузионих повреда. Најинтензивније промене очекујемо 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

Имајући у виду значај кардиоваскуларних болести, како у односу на величину популације која је захваћена, тако и у погледу мотралитета и инвалидитета које кардиоваскуларне болести изазивају, свако истраживиње које доприноси разумевању физиолошких и патофизиолошких процеса у кардиоваскуларном систему доприноси развијању могућности превенције и лечења кардиоваскуларних болести. Резултати ове студије могу да помогну бољем разумевању и расветљавању до сада неразјашњених

механизама различитих облика преко кондиционарања, 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 Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

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

1. Stojic I, Srejovic I, Zivkovic V, Jeremic N, Djuric M, Stevanovic A, Milanovic T, Djuric D, **Jakovljevic V**. The effects of verapamil and its combinations with glutamate and glycine on cardiodynamics, coronary flow and oxidative stress in isolated rat heart. *J Physiol Biochem*. 2017; 73(1):141-153.
2. Milicic V, Zivkovic V, Jeremic N, Arsenijevic N, Djuric D, **Jakovljevic VLj**. Coronary flow and oxidative stress during local anaphylactic reaction in isolated mice heart: the role of nitric oxide (NO). *Mol Cell Biochem*. 2016; 412(1-2):221-7.
3. Stanojevic D, **Jakovljevic V**, Barudzic N, Zivkovic V, Srejovic I, Parezanovic Ilic K, Cubrilo D, Ahmetovic Z, Peric D, Rosic M, Radovanovic D, Djordjevic D. Overtraining does not induce oxidative stress and inflammation in blood and heart of rats. *Physiol Res*. 2016; 65(1):81-90.
4. Bolevich S, Kogan AH, Zivkovic V, Djuric D, Novikov AA, Vorobyev SI, **Jakovljevic V**. Protective role of carbon dioxide (CO₂) in generation of reactive oxygen species. *Mol Cell Biochem*. 2016; 411(1-2):317-30.
5. Nikolic T, Zivkovic V, Jevdjevic M, Djuric M, Srejovic I, Djuric D, Jeremic N, Djuric D, Bolevich S, **Jakovljevic V**. The effects of chronic administration of nandrolone decanoate on redox status in exercised rats. *Mol Cell Biochem*. 2016; 411(1-2):95-105.

6. Jeremic N, Petkovic A, Srejovic I, Zivkovic V, Djuric D, **Jakovljevic V**. Effects of ischemia and omeprazole preconditioning on functional recovery of isolated rat heart. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2015; 30(2):266-75.
7. **Jakovljevic VLj**, Djordjevic DZ, Djuric DM. The effects of vitamin C and nitric oxide synthase inhibition on coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat heart. Gen Physiol Biophys. 2011; 30(3):293-300.
8. Djuric D, Mitrovic V, **Jakovljevic V**. The effects of calcium channel antagonists on coronary nitrite outflow in isolated rat heart. Arzneimittelforschung. 2002; 52(5):365-70.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална физиологија са спортском медицином

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Сузана Пантовић**, ванредни 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;

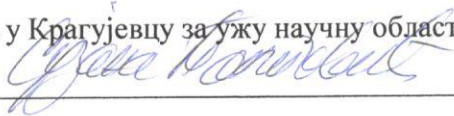
ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, др Нина Симоновић, 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 др Нине Симоновић, под називом “Утицај прекондиционирања антагонистима L-типа калцијумских канала и никорандилом самостално и у комбинацији са хипербаричном оксигенацијом на функционални опоравак изолованог срца пацова“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др Сузана Пантовић, ванредни 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



У Крагујевцу, 11. 04. 2017. године