

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-872/27 од 20.11.2023. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата Стефана Симовића за израду докторске дисертације под називом:

„Утицај антиаритмика класе 3 на функционалне, морфолошке и параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова са хипертенијом“

Чланови испитне комисије су:

1. **др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **др Миодраг Срејковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан;
3. **др Бранко Белеслин**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан.

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

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације

Хипертензија је најчешћи кардиоваскуларни фактор ризика који представља основу за развој многих кардиоваскуларних болести укључујући акутни коронарни синдром, срчану инсуфицијенцију са очуваном ејекционом фракцијом и различите врсте аритмија. Мали број новијих антиаритмика испитиван је на моделима хипертензије, као и срчане инсуфицијенције са очуваном ејекционом фракцијом. Осим тога, до сада није испитиван ефекат антиаритмика класе 3 на параметре кариодинамике и оксидационог стреса на хипертензивним моделима, као ни утицај антиаритмика на морфологију срца. Управо због тога, циљ ове студије је да се испитају и упореде ефекти акутне и хроничне примене антиаритмика класе 3 на анималном

моделу. Планирано је да истраживање обухвати 78 пацова, Wistar kyoto соја. Експерименталне животиње ће насумично бити рандомизоване у 4 групе (3 експерименталне и 1 контролна), потом подељене на 4 подгрупе у зависности од дозе антиаритмика. Антиаритмици који ће се примењивати у овом истраживању су: амиодарон, дронедарон и дофетилид. Планирано је да се антиаритмици примењују хронично, у трајању од 4 недеље у 3 различите дозе (ниска, средња, висока) и акутно, у високој дози. Жртвованим животињама ће се изоловати срце и перфундовати према модификованој техници изолованог ретроградно перфундованог срца по Langendorff-у и пратити параметри функције леве коморе. Након тога, прикупљаће се узорци коронарног венског ефлуента, за сваку вредност перфузионог притиска, спектрофотометријским методама ће се одређивати системски и срчани биомаркери оксидационог стреса. Након експеримента, сва срца ће бити хистолошки анализирана.

Овим истраживање би послужило бољем разумевању фармаколошких ефеката антиаритмика класе 3 на функцију и морфологију кардиоваскуларног система. Резултати овог истраживања могу имати несумњиву клиничку импликацију у смислу одабира типа антиаритмика и олакшали лечење болесника код којих је неопходна примена антиаритмика.

2.2. Процена научног доприноса крајњег исхода рада

Овим истраживањем би смо одгонетнули на сва ова неодговорена питања и резултати би послужили бољем разумевању фармаколошких ефеката наведених антиаритмика на функцију и морфологију кардиоваскуларног система. Резултати овог истраживања могу имати несумњиву клиничку импликацију у смислу одабира типа антиаритмика и олакшали лечење болесника код којих је неопходна примена антиаритмика. Поред тога, одабиром хипертензивних пацова, а имајући на уму да је хипертензија један од водећих узрока срчане инсуфицијенције са очуваном ејекционом, резултате овог истраживања би смо могли да пренесемо и на популацију пацијената са срчаном инсуфицијенцијом и очуваном ејекционом фракцијом.

2.3. Наслов, циљеви и хипотезе докторске дисертације

Наслов: Утицај антиаритмика класе 3 на функционалне, морфолошке и параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова са хипертензијом

Циљеви:

1. Испитати ефекте антиаритмика класе 3 на кардиодинамске параметре изолованог срца а пацова са хипертензијом.
2. Испитати ефекте антиаритмика класе 3 на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова са хипертензијом.
3. Испитати ефекте антиаритмика класе 3 на морфолошке параметре изолованог срца пацова са хипертензијом.
4. Утврдити корелацију између функционалних, биохемијских и морфолошких параметера изолованог срца пацова са хипертензијом код којих су примењени антиаритмици класе 3.

Хипотезе:

1. Антиаритмици класе 3 имају негативно инотропно и хронотропно дејство на параметре кардиодинамике код изолованог срца пацова са хипертензијом.
2. Антиаритмици класе 3 смањују параметре срчане и системске параметре оксидационог стеса изолованог срца пацова са хипертензијом.
3. Антиаритмици класе 3 не изазивају фиброзу код изолованог срца пацова са хипертензијом.
4. Постоји корелација између функционалних, биохемијских и морфолошких параметера изолованог срца пацова са хипертензијом код којих су примењени антиаритмици класе 3.

2.4. Методе истраживања

2.4.1. Врста студије

Ово истраживање је проспективна, експериментална, анимална, рандомизована *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro* студија.

2.4.2. Популација која се истражује

Планирано је да истраживање обухвати 78 пацова, Wistar kyoto соја (спонтано хипертензивне), мушког пола, старости 8 недеља, просечне телесне масе око 200 грама. Експерименталне животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура 23°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*).

2.4.3. Узорковање

Експерименталне, спонтано хипертензивне животиње ће насумично бити подељене у четири групе (у свакој експерименталној групи по 24 пацова и у контролној групи 6 пацова), при чему ће експерименталне групе потом насумично бити подељене на 4 подгрупе (у свакој подгрупи по 6 пацова). Антиаритмици групе 3 ће бити применени у акутној и хроничној дози. Хроничне дозе антиаритмика ће бити подељене у три различите дозе и то: ниска, средња (оптимална доза) и висока доза, док ће акутна примена антиаритмика бити иста као и висока доза хроничне примене с'тим што ће бити примењена једнократно. Дозе антиаритмика су одређене према претодно објављеним радовима (15-17). Групе и подгрупе су следеће:

- I. Група животиња код којих неће бити примењени антиаритмици – контролна група (n=6)
- II. Група животиња код којих ће бити примењен амиодарон (n=24):
 1. Подгрупа животиња код којих ће амиодарон бити примењен у дози од 3 mmol (n=6),
 2. Подгрупа животиња код којих ће амиодарон бити хронично примењен у ниској дози од 10 mg/kg/дневно (n=6),

3. Подгрупа животиња код којих ће амиодарон бити хронично примењен у средњој дози од 50 mg/kg/дневно (n=6) и
4. Подгрупа животиња код којих ће амиодарон бити хронично примењен у високој дози од 100 mg/kg/дневно (n=6).

III. Група животиња код којих ће бити примењен дронедазон (n=24):

1. Подгрупа животиња код којих ће дронедазон бити акутно примењен у дози од од 1,8 mmol (n=6),
2. Подгрупа животиња код којих ће дронедазон бити хронично примењен у ниској дози од 5 mg/kg/дневно (n=6),
3. Подгрупа животиња код којих ће дронедазон бити хронично примењен у средњој дози од 10 mg/kg/дневно (n=6) и
4. Подгрупа животиња код којих ће дронедазон бити хронично примењен у високој дози од 50 mg/kg/дневно (n=6).

IV. Група животиња код којих ће бити примењен дофетилид (n=24):

1. Подгрупа животиња код којих ће дофетилид бити акутно примењен у дози од дози од 2,27 mmol (n=6),
2. Подгрупа животиња код којих ће дофетилид бити хронично примењен у ниској дози од 0.1 mg/kg/дневно (n=6),
3. Подгрупа животиња код којих ће дофетилид бити хронично примењен у средњој дози од 1 mg/kg/дневно (n=6) и
4. Подгрупа животиња код којих ће дофетилид бити хронично примењен у високој дози од 10 mg/kg/дневно (n=6).

Хронична примена антиаритмика класе 3 ће подразумевати свакодневну примену антиаритмика у трајању од 4 недеље, док ће акутна примена подразумевати једнократну примену антиаритмика директно у срце на *Langendorff*-овом апарату (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*). Дронедазон и дофетилид ће бити растворени у H₂O, док ће амиодарон бити растворен у раствор 5% глукозе пре примене лекова. Животињама ће се након еутаназије изоловати срце и перфундовати према модификованој техници изолованог, ретроградно перфундованог срца по *Langendorff*-у.

2.4.4. Варијабле које се мере у студији

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 софтверског праћења параметара функције леве коморе:

1. dp/dt max - максимална стопа промене притиска у левој комори,
2. dp/dt min - минимална стопа промене притиска у левој комори,
3. SLVP - систолни притисак леве коморе,
4. DLVP - дијастолни притисак леве коморе,
5. HR - срчана фреквенца

Вредност коронарног протока (CF) би се одређивала флоуметријски.

Функција миокарда и коронарна ауторегулација ће се испитивати при промени перфузионог притиска од 40-120 cmH₂O (40, 60, 80, 100 и 120 cmH₂O), док ће се за сваку вредност перфузионог притиска регистровати параметри функције леве коморе и одређивати коронарни проток.

Након испитивања функционалних параметара леве коморе, прикупљаће се узорци коронарног венског ефлуента, за сваку вредност перфузионог притиска, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи маркери оксидационог стреса:

1. индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS,
2. азот моноксид у форми нитрита (NO₂⁻),
3. супероксид анјон радикал (O₂⁻) и
4. водоник пероксид (H₂O₂).

Приликом жртвовања животиња узимали би се и узорци венске крви ради спектофотометријског одређивања системских параметара оксидационог стреса:

1. индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS,
2. азот моноксид у форми нитрита (NO₂⁻),
3. супероксид анјон радикал (O₂⁻),
4. водоник пероксид (H₂O₂)
5. каталаза (CAT),
6. супероксид дизмутаза (SOD) и
7. редуковани глутатион (GSH).

Како би патохистолошки испитали промене, сва срца ће бити фиксирана у 4% пуферизованом формалину и уграђивати у парафинске калупе, а потом сећи на пресеке дебљине 4 микрона и бојити хематоксилином/еозином и методом по *Masson-y*.

2.4.5. Снага студије и величине узорка

Прорачун укупног узорка заснован је на резултатима претходно објављених студија. За прорачун је коришћен Т-тест за независне узорке, уз претпоставку алфа грешке од 0.05 и снаге студије 0.95, уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (18). Узимањем у обзир резултате наведених студија и могућност искључења појединих експерименталних животиња из завршне анализе, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 72 (три групе, свака подељена на четири подгрупе, по 6 животиња у свакој подгрупи) и 6 животиња у контролној групи, укупно 78 животиња.

2.4.6. Статистичка анализа

За статистичку обраду резултата ће бити коришћен статистички програм SPSS 18.0 for Windows. 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. За испитивање нормалности расподеле користиће се тестови Kolmogorov Smirnov и Shapir Wilk, и графици: хистограм и normal QQ plot. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће 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.

2.5. Значај истраживања за развој науке

Хипертензија је најчешћи кардиоваскуларни фактор ризика који представља основу за развој многих кардиоваскуларних болести укључујући акутни коронарни синдром, срчану инсуфицијенцију са очуваном и сниженом ејекционом фракцијом, мождани удар и хроничну бубрежну инсуфицијенцију. Такође, код хипертензивних пацијената, нарочито у присуству хипертрофије леве коморе и/или срчане инсуфицијенције, настају суправентрикуларне или вентрикуларне аритмије.

Хипертензија активира симпатички нервни систем, ренин-ангиотензин-алдостерон систем, доводи до истезања и повећања дијаметра леве преткоморе, структуралног ремоделовања преткомора и комора и на тај начин прави супстрат за про-аритмогени електрофизиолошки фенотип. Хипертрофија леве коморе је једна од главних одредница у развоју коморских аритмија и изненадне срчане смрти код хипертензивних пацијената, која поред неуроендокриних и структуралних промена представља и могућ разлог за миокардну исхемију која је сама по себи довољан супстрат за развој аритмија. Промене у структури комора код хипертензивних пацијената имају за последицу развој срчане инсуфицијенције са очуваном ејекционом фракцијом. Срчана инсуфицијенција са очуваном ејекционом фракцијом се карактерише поремећајем обрасца пуњења леве коморе захтевајући значајнији преткоморски допринос, тј. немогућност повећања волумена леве коморе без пораста притиска у левој преткомори, а који је код атријалне фибрилације, најчешћег поремећаја ритма, потпуно елиминисан. Иако нејасног смера каузалности, хипертензија појачава системску инфламацију, убрзава развој коронарне ендотелне дисфункције, подиже ниво оксидационог стреса, смањује активност протеин киназе Г, доводи до повећане крутости миокарда и ремоделовањ а кардиомиоцита и последичног развоја миокардне фиброзе. Такав миокард, прожет фибротичним ткивом, потенцира активност ектопичних пејсмејкер ћелија, касне потенцијале и ге-entry механизам и повећава инциденцу аритмија.

2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје

Имајући у виду значај хипертензије као патофизиолошког и клиничког ентитета и као фактора ризика за настајње великог броја других кардиоваскуларних поремећаја, ово експериментално истраживање би могло да пружи нова сазнања о ефектима антиаритмијских лекова у условима хипертензије. Значај истраживања се огледа у могућностима бољег схватања дејства појединих лекова из групе антиаритмика на кардиодинамске параметре, морфолошке промене и редокс равнотежу и тиме употпуни свеобухватну слику о месту антиаритмика у хипертензији.

Познато је да у физиолошким условима, као и условима срчане инсуфицијенције са смањеном ејекционом фракцијом, амиодарон и дронедазон имају негативно инотропно и хронотропно дејство. Међутим, велики број антиаритмика није испитиван у дозно-зависном облику и њиховим ефектима на функционалне, кардиодинамске параметре. Осим поменутог, до сада није испитивани акутни и хронични, дозно-

зависни ефекти антиаритмика класе 3 на параметре оксидационог стреса и антиоксидативне заштите, као ни на морфологију хипертензивног, изолованог срца пацова.

2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата

Стефан Симовић је рођен 12.11.1989. у Чачку, Република Србија. Основну и средњу школу завршио у Чачку. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу је уписао у октобру 2008. а завршио у септембру 2014. године. Докторске академске студије уписао је у октобру 2014. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, смер Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Специјалистичке студије из интерне медицине је уписао у јуну 2016. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Од септембра 2016. године ради као клинички лекар на Одељењу за поремећаје ритма и електростимулацију Клинике за кардиологију Клиничког центра Крагујевац. Члан је већег броја струковних и професионалних удружења. Као аутор и коаутор је објавио више стручних радова у међународним и националним часописима и презентовао на међународним и националним стручним скуповима.

Кандидат, Стефан Симовић, је објавио 1 рад у целости у часопису категорије M22, у коме је први аутор, чиме је стакао услов за пријаву теме докторске дисертације.

- **Simović S, Petrović N, Smiljanić Z, Ignjatović V.** From Insulation Breaks to Complete Lead Fracture: A Case Report. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2016;27(10):1238-9. M22

3. Предлог ментора

За коменторе ове докторске дисертације се предлажу проф. др Горан Давидовић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина и проф. др Иван Срејовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

Проф. др Горан Давидовић и проф. др Иван Срејовић поседују 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 Горана Давидовића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Savovic Z, Pindovic B, Nikolic M, Simic I, **Davidovic G**, Ignjatovic V, Vuckovic J, Zornic N, Nikolic Turnic T, Zivkovic V, Srejovic I, Bolevich S, Jakovljevic V, Iric Cupic V. Prognostic Value of Redox Status Biomarkers in Patients Presenting with STEMI or Non-STEMI: A Prospective Case-Control Clinical Study. *J Pers Med.* 2023;13(7):1050.

2. Nikolic M, Zivkovic V, Jovic JJ, Sretenovic J, **Davidovic G**, Simovic S, Djokovic D, Muric N, Bolevich S, Jakovljevic V. SGLT2 inhibitors: a focus on cardiac benefits and potential mechanisms. *Heart Fail Rev.* 2022;27(3):935-949.
3. Iric Cupic V, **Davidovic G**, Petrovic M, Ivosevic A, Janjic V, Simic I, Vucic R, Zdravkovic V, Milanov S, Matovic M, Ignjatovic DV, Ignjatovic SV. The effects of neuroleptics on regional and global parameters of left ventricular function assessed by 3D-echocardiography and radionuclide ventriculography. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research* 2017;74(6):1921-28.
4. **Davidović G**, Simović S, Mitrović S, Irić-Čupić V, Miloradović V. Fulminant myocarditis as a primary manifestation of H1N1 infection. A first reported case from Serbia. *Hellenic J Cardiol* 2016;57(3):181-84.
5. Ignjatovic V, Pavlovic S, Miloradovic V, Andjelkovic N, **Davidovic G**, Djurdjevic P, Stolic R, Iric-Cupic V, Simic I, Ignjatovic VD, Petrovic N, Smiljanic Z, Zdravkovic V, Simovic S, Jovanovic D, Nestic J. Influence of Different β -Blockers on Platelet Aggregation in Patients With Coronary Artery Disease on Dual Antiplatelet Therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2016;21(1):44-52.

Радови проф. др Ивана Срејовића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Savovic Z, Pindovic B, Nikolic M, Simic I, Davidovic G, Ignjatovic V, Vuckovic J, Zornic N, Nikolic Turnic T, Zivkovic V, **Srejovic I**, Bolevich S, Jakovljevic V, Iric Cupic V. Prognostic Value of Redox Status Biomarkers in Patients Presenting with STEMI or Non-STEMI: A Prospective Case-Control Clinical Study. *J Pers Med.* 2023;13(7):1050.
2. Jeremic J, Govoruskina N, Bradic J, Milosavljevic I, **Srejovic I**, Zivkovic V, Jeremic N, Nikolic Turnic T, Tanaskovic I, Bolevich S, Jakovljevic V, Bolevich S, Zivanovic MN, Okwose N, Seklic D, Milivojevic N, Grujic J, Velicki L, MacGowan G, Jakovljevic DG, Filipovic N. Sacubitril/valsartan reverses cardiac structure and function in experimental model of hypertension-induced hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 2023;478(12):2645-2656.
3. Gadzieva L, Bradic J, Milosavljevic I, Zivkovic V, **Srejovic I**, Jakovljevic V, Bolevich S, Bolevich S, Jeremic N, Alisultanovich-Omarov I, Jeremic J. Creatine phosphate administration in cardiac ischemia-reperfusion injury in rats: focus on differences between preconditioning, perconditioning, and postconditioning protocols. *Can J Physiol Pharmacol.* 2022;100(8):787-795.
4. Rosic G, Joksimovic J, Selakovic D, Jakovljevic V, Zivkovic V, **Srejovic I**, Djuric M, Djuric D. The Beneficial Effects of Sulfur-containing Amino Acids on Cisplatininduced Cardiotoxicity and Neurotoxicity in Rodents. *Curr Med Chem.* 2018; 25(3): 391-403.
5. Nikolic T, Zivkovic V, **Srejovic I**, Stojic I, Jeremic N, Jeremic J, Radonjic K, Stankovic S, Obrenovic R, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in diet-induced hyperhomocysteinemia in Wistar albino rats: a comparative study. *Mol Cell Biochem.* 2018; 437(1-2): 109-118.

4. Научна област дисертације
Медицина.

5. Научна област чланова комисије

1. **др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **др Миодраг Срећковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан;
3. **др Бранко Белеслин**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан.

Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашњег научно-истраживачког рада Стефана Симовића, комисија закључује да кандидат испуњава услове да приступи изради докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Стефана Симовића под називом: „Утицај антиаритмика класе 3 на функционалне, морфолошке и параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова са хипертензијом“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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



2. **др Миодраг Срећковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан



3. **др Бранко Белеслин**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан



У Крагујевцу, 22.11.2023. године