

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу**

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-1044/46, од 02.11.2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Томислава Николића, под називом:

**„ Ефекти акутног оштећења бубрега нефротоксичним агенсима на функцију миокарда и инфламацијско-оксидациони статус пацова ”**

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

1. **Проф. др Драган Јовановић**, редовни професор факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, председник;
2. **Проф. др Зорица Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка 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 следећи:

**2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације**

Кандидат **др Томислав Николић**, испуњава све формалне услове предвиђене Законом о високом образовању, Статутом Универзитета у Крагујевцу и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за пријаву теме докторске дисертације.

**2.1. Кратка биографија кандидата**

**Др Томислав Николић** рођен је 03.04.1980. године у Крагујевцу. Основну и средњу Медицинску школу завршио је у Крагујевцу са одличним успехом. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписао је 1999. године а дипломирао је је јуна месеца 2008. са просечном оценом 8.57. У периоду од 2009.-2013. године радио као волонтер у Интернистичком делу Центра за ургентну медицину КЦ Крагујевац. Школске 2010/11.

године уписао је Докторске академске студије на Факултету Медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област интерна медицина – кардиологија. Од октобра 2011. године запослен на Факултету медицинских наука у Крагујевцу као сарадник у настави на предмету Интерна медицина. Тренутно звање истраживач сарадник. Од фебруара месеца 2013. стално запослен у Центру за ургентну медицину Клиничког Центра Крагујевац а од маја 2015. године у Центру за нефрологију и дијализу. Од маја 2013. године је на специјализацији из интерне медицине. У фебруару 2014. године положио усмени докторски испит са оценом 9.00.

## **2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације**

**Наслов:** „Ефекти акутног оштећења бубрега нефротоксичним агенсима на функцију миокарда и инфламацијско-оксидациони статус пацова,,

**Предмет:** Испитати утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином, диклофенак натријумом и фолном киселином на функцију миокарда и инфламацијско-оксидациони статус пацова.

**Хипотезе:** Акутно оштећење бубрега изазвано нефротоксичним агенсима може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова; акутно оштећење бубрега изазвано нефротоксичним агенсима значајно утиче на вредности параметара оксидационог стреса и инфламациони статус пацова; вредности параметара инфламацијско-оксидационог статуса пацова варирају у зависности од нефротоксичног агенса (гентамицин, диклофенак натријум и фолна киселина) који је изазвао акутно оштећење бубрега.

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

Кандидату је објављен рад *in extenso* у часопису категорије M52 који се објављује на једном од водећих светских језика, у којем је кандидат први аутор:

**Nikolić T, Radovanović M, Srećković M, Marković M, Petrović D. Cardiorenal syndrome type 1: definition, etiopathogenesis, diagnostic and treatment. Ser J Exp Clin Res; DOI:10.1515/SJECR-2016-0051. (M52)**

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

Акутно оштећење бубрега (АОБ) је широк клинички ентитет који обухвата разноврсне и често преклапајуће патофизиолошке механизме са хетерогеним функционалним и морфолошким карактеристикама. Акутно оштећење бубрега представља нагло (унутар 48 h) потенцијално реверзибилно смањење бубрежне функције које се манифестује или апсолутним повећањем серумске концентрације креатинина за  $\geq 26.4$  mmol/l, или процентуалним повећањем серумске

концентрације креатинина на  $\geq 150\%$  или смањењем излучивања урина (олигурија са диурезом  $\leq 0.5$  ml/kg/h за најмање 6 h). Оштећење бубрега може покренути друге сложене метаболичке и хуморалне механизме који утичу на удаљење органе доприносећи повећању укупног морталитета. Последњих година порастао је интерес у проучавању интеракција између органа, тзв. "organ cross talk" у циљу што бољег разумевања овог сложеног поремећаја.

Патофизиолошки механизми који повезују акутно оштећење бубрега и срчану дисфункцију нису још увек у потпуности разјашњени. Оно што се зна је да АОБ утиче на срчану функцију на директан и индиректан начин. Промене на срцу које настају директним дејством АОБ обухватају инфилтрацију неутрофила, инфламаторних медијатора и апоптозу кардиомиоцита. Укључују пораст имунореактивног IL-1, IL-6, фактор некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ ) и пораст нивоа месенџер RNK интрацелуларног адхезионог молекула 1 (ICAM-1). Акутно оштећење бубрега доводи до бројних физиолошких поремећаја који воде до значајног погоршања срчане функције. Повећање волумена течности односно прелоада, активација симпатикуса, ренин ангиотензин алдостерон система и електролитни дизбаланс на индиректан начин утичу на погоршање срчане функције. Акутно оштећење бурега које доводи до акутног оштећења срчане функције описује се као кардиоренални синдром тип 3 и представља део групе од пет кардиореналних синдрома. Општа дефиниција кардиореналних синдрома подразумева било какав поремећај срца или бубрега где акутно или хронично оштећење једног може индуковати акутно или хронично оштећење другог органа.

Према RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage kidney disease) и AKIN (Acute Kidney Injury Network) критеријумима укупна инциденца акутног оштећења бубрега у општој популацији је у порасту. Кардиоваскуларни морталитет расте код пацијената са акутним оштећењем бубрега, нарочито у јединицама интензивног лечења, што је потврђено и у многобројним студијама. Скорије клиничке студије су показале да је АОБ не само показатељ степена тежине болести већ да доводи до ранијег испољавања мултиорганске дисфункције у јединицама интензивног лечења са израженим утицајем на стопу смртности.

## **2.5. Значај и циљ истраживања**

С обзиром на мањак истраживања која проучавају поменути проблематику, ови налази могу да имају несумњив значај у проучавању интеракције између органа тзв. „organ crosstalk“. Поред тога, студија би допринела расветљавању појединих молекулских механизма укључених у патогенезу кардиореналног синдрома (типа 3). Клиничка примена стечених сазнања се огледа у рационалнијој употреби поменутих потенцијално нефротоксичних лекова који се широко користе у свакодневној пракси.

*Циљ студије*

Основни циљ истраживања је испитати утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином, диклофенак натријумом и фолном киселином на функцију миокарда и инфламацијско-оксидациони статус пацова.

У складу са основним циљем постављени су следећи задаци у истраживању:

1. Процена ефеката акутног оштећења бубрега изазваног нефротоксичним агенсима на функцију миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова праћењем параметара: 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, д) HR - срчана фреквенца, њ) CF – коронарни проток;
2. Испитивање утицаја акутног оштећења бубрега изазваног нефротоксичним агенсима на различите параметре оксидационог стреса (индекс липидне пероксидације (TBARS), азот моноксид (NO), супероксид анијон радикал ( $O_2^-$ ), водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) и антиоксидационих ензима заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуктовани глутатион (GSH));
3. Испитивање утицаја акутног оштећења бубрега изазваног нефротоксичним агенсима на инфламацијски статус пацова: фактор некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлеукини 1 и 6 (IL-1 и IL-6).

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Досадашња експериментална истраживања су углавном била базирана на директним ефектима акутног оштећења бубрега на миокард. У студији коју су спровели Kely и сарадници показана је повећана системска и миокардна активност TNF- $\alpha$  и IL-1 након исхемије бубрега мишева. Ова студија је такође показала повећан ниво кардијалне ICAM-1 mRNA-а 6 сати након исхемије бубрега као и повећану активност кардијалне мијелопероксидазе. Истраживање које су спровели Митака и сарадници је показало повећане вредности TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и NF- $\kappa$ B у изолованом срцу пацова након унилатералне исхемије бубрега. IL-6 је локализован у васкуларним ендотелним ћелијама миокарда. Све поменуте студије су показале несумњиву улогу инфламације на функцију миокарда у акутном оштећењу бубрега.

Индукција оксидативног стреса и поремећај системских одговора могу допринети настанку органске дисфункције код индуковане акутне бубрежне инсуфицијенције у експерименталним условима. Хем оксигеназа 1 је ензим који катализује разградњу хема чија експресија утиче на смањење оксидативног стреса, генерише антиинфламаторне и антиоксидативне метаболите као што је билирубин и врши апрегулацију инхибитора ћелијског циклуса као што је p21. У издвојеној студији унилатерална исхемија/реперфузија бубрега доводи до смањења нивоа хепатичне супероксид дисмутазе, каталазе и глутатиона, сугеришући да исхемија/реперфузија бубрега може

компромитовати способност удаљених органа да се носе са оксидативним стресом и оштећењем. Акутно оштећење бубрега изазвано нефротоксичним агенсима или тзв. нефротоксично оштећење бубрега чини 10 % реналног акутног оштећења бубрега. Међу агенсима који испољавају нефротоксично дејство су и многобројни лекови који се користе у свакодневној клиничкој пракси као на пример гентамицин, цисплатина, нестероидни антиинфламаторни лекови (НСАИЛ), радио контрастна средства, фолна киселина и многи други

## **2.7. Методе истраживања**

### **2.7.1. Врста студије**

У питању је експериментална студија на животињама и анималном материјалу *in vivo* и *in vitro*.

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

Планирано је да истраживање обухвати 100 пацова, Wistar albino соја, мушког пола, старости 4 недеље, просечне телесне масе око 200 грама. Експерименталне животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура 25°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*).

### **2.7.3. Узорковање**

У зависности од фармаколошког третмана животиње би се груписале у три (3) експерименталне групе, (свака група би била подељена на две подгрупе) по 15 животиња у свакој подгрупи :

1. експериментална група свакодневно прима гентамицин (растворен у 0.9% NaCl) у дози од 100 mg/kg/дневно (2.5 ml/kg) интраперитонеално, током осам дана. *Контролна група* прима 0.9% NaCl раствор интраперитонеално у истој количини у трајању од 8 дана,
2. експериментална група свакодневно прима диклофен натријум у дози 15 mg/kg интраперитонеално растворен у 0.1 ml раствора 0.9% NaCl-а, три дана, два пута дневно (од 4. до 6. дана депривације воде) уз предходну депривацију воде у трајању од 6 дана. *Контролна група* уз депривацију воде од 6 дана прима интраперитонеално 0.1 ml раствора 0.9% NaCl два пута дневно у трајању од три дана (од 4. до 6. дана депривације воде),
3. експериментална група прима раствор фолне киселине (25%, w/v) у 150 mmol/L раствору натријум бикарбоната у дози од 250 mg/kg телесне тежине интраперитонеално једнократно (1 ml/kg ТТ). *Контролна група* прима 1 ml/kg ТТ 150 mmol/L раствора натријум бикарбоната интраперитонеално.

#### 2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Након спроведеног фармаколошког третмана животиње би биле жртвоване да би се спровела испитивања на изолованом срцу (испитала функција миокарда и коронарна ауторегулација). Жртвовање животиња ће се спровести на начин којим се избегава патња експерименталних животиња, а у сагласности са релевантном директивом. У тренутку жртвовања животиње, употребом гилотине, животињи се узима крв искрвављењем. Из узете крви се издвајају плазма и еритроцити. У плазми би се помоћу стандардног анализатора одређивала концентрација серумског креатинина и урее и електролитног статуса у циљу детектовања акутног оштећења бубрега. Поред тога, приликом жртвовања животиња прикупили би се узорци крви за процену системског редокс статуса, путем мерења концентрације про-оксидационих параметара спектофотометријском методом: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анион радикал ( $\text{O}_2^-$ ), водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и антиоксидационих ензима заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH). Такође би се *ELISA* методом одређивали параметри инфламације: фактор некрозе тумора алфа ( $\text{TNF-}\alpha$ ) и интерлеукини 1 и 6 (IL-1 и IL-6).

Жртвованим животињама би се изоловало срце и перфундовало према модификованој техници изолованог ретроградно перфундованог срца по Langendorff-у. 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)  $\text{dp/dt max}$  - максимална стопа промене притиска у левој комори, б)  $\text{dp/dt min}$  - минимална стопа промене притиска у левој комори, в) SLVP - систолни притисак леве коморе, г) DLVP - дијастолни притисак леве коморе, д) HR - срчана фреквенца. Вредност коронарног протока (CF) би се одређивала флоуметријски. Функција миокарда и коронарна ауторегулација ће се испитивати при промени перфузионог притиска, почев од притиска од  $60 \text{ cmH}_2\text{O}$ , затим  $80 \text{ cmH}_2\text{O}$ ,  $100 \text{ cmH}_2\text{O}$ ,  $120 \text{ cmH}_2\text{O}$  и на крају  $40 \text{ cmH}_2\text{O}$ , док ће се за сваку вредност перфузионог притиска регистровати параметри функције леве коморе и одређивати коронарни проток.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, за сваку вредност перфузионог притиска, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери оксидационог стреса: TBARS-a,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , док ће се инфламаторни маркери: фактор некрозе тумора алфа ( $\text{TNF-}\alpha$ ) и интерлеукини 1 и 6 (IL-1 и IL-6) одређивати *ELISA* методом према утврђеном протоколу произвођача.

Након жртвовања животиње узимали би се срце и бубрег како би се утврдиле хистолошке и морфолошке промене.

При експерименталном раду биће поштовани прописи о добробити лабораторијских животиња 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**

За прорачун укупног узорка је коришћен Т-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. На основу података из литературе за студије сличног дизајна, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 90 (три групе, свака подељена на две подгрупе, по 15 у животиња у свакој подгрупи). Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе, укупан студијски узорак је утврђен на 100 експерименталних животиња..

### **2.7.6. Статистичка анализа**

За статистичку обраду резултата ће бити коришћен статистички програм *SPSS 18.0 for Windows*. За приказивање података користиће се дескриптивне методе: табелирање, графичко приказивање, мере централне тенденције и мере варијабилитета. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће се одговарајући параметријски или непараметријски тестови: т-тест (или Mann Whitney), упарени т-тест (или Wilcoxon), анализа варијансе (или Kruskal Wallis), анализа варијансе са поновљеним мерењима (или Friedman). За мерење јачине линеарног односа између две варијабле користиће се Пирсонов или Спирманов тест линеарне корелације. Статистичка значајност разлике била би постављена на нивоу од  $p < 0.05$ . Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, користиће се *Bonferroni* тест.

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

Очекује се да акутно оштећење бубрега изазвано нефротоксичним агенсима значајно утиче на пораст параметера оксидационог стреса. Добијени резултати би помогли у бољем разумевању утицаја акутног оштећења бубрега на редокс потенцијал и функцију миокарда.

## **2.9. Оквирни садржај дисертације**

Користећи изоловано срце пацова коме је предходно изазвано акутно оштећење бубрега различитим нефротоксичним агенсима: гентамицином, диклофенак натријумом и фолном киселином, испитиваће се утицај акутног оштећења бубрега на функцију миокарда и оксидационо-инфламацијски статус пацова. Убацавањем сензора у леву комору изолованог срца пацова одређиваће се параметри функције леве коморе (максимална стопа промене притиска у левој комори, минимална стопа промене притиска у левој комори, систолни притисак леве коморе, дијастолни притисак леве коморе, срчана фреквенца). Спектрофотометријским методама ће се у венској крви и коронарном венском ефлуенту одређивати биомаркери оксидационог стреса: TBARS-а,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , и антиоксидациони ензими заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH). Инфламаторни маркери: фактор некрозе

тумора алфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлеукини 1 и 6 (IL-1 и IL-6) одређиваће се *ELISA* методом према утврђеном протоколу произвођача. Ови налази могу да имају несумњив значај у проучавању интеракције између органа тзв. „organ crosstalk а самим тим и допринос у расветљавању појединих молекулских механизма укључених у патогенезу кардиореналног синдрома типа 3.

### 3. Предлог ментора

Комисија за ментора ове докторске дисертације предлаже **проф. др Дејана Петровића**, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина. Проф. др Дејан Петровић 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

1. **Petrović D**, Jagić N, Miloradović V, Nikolić A, Stojimirović B. Cardiorenal syndrome - definition, classification and basic principles of therapy. *Ser J Exp Clin Res* 2010; 11(2):67-71.
2. **Petrović D**, Milovanović D, Miloradović V, Nikolić A, Petrović M, Đurđević P, Poskurica M. Kardio-renalni sindrom tip 2: etiopatogeneza, dijagnostika i lečenje. *Medicinski Časopis* 2012; 46(1): 30-34.
3. **Petrović D**, Obrenović R, Trbojević-Stanković J, Majkić-Singh N, Stojimirović. Hyperphosphatemia - the risk factor for adverse outcome in maintenance hemodialysis patients. *J Med Biochem* 2012; 31(3): 239-245.
4. Nikolić T, Radovanović M, Srećković M, Marković M, **Petrović D**. Cardiorenal syndrome type 1: definition, etiopathogenesis, diagnostic and treatment. *Ser J Exp Clin Res*; DOI:10.1515/SJECR-2016-0051.
5. Petrović M, Grdinić A, Bokonjić D, Rabrenović V, Antić S, Terzić B, Stamenković D, Stajić Z, **Petrović D**, Ignjatović Lj, Pejović J, Jovanović D. Blood concentrations of B-type natriuretic peptide and N-terminal prohormone B-type natriuretic peptide as markers of left ventricle diastolic function in patients with chronic renal failure. *Vojnosanit Pregl*; DOI: 10.2298/VSP151019079P.
6. **Petrović D**, V. Miloradović, M. Poskurica i B. Stojimirović. Heart failure in haemodialysis patients: Evaluation and treatment. *Srp Arh Celok Lek* 2011; 139(3-4): 248-255.
7. **Petrović D**, Obrenović R, Stojimirović B. Risk Factors for Aortic Valve Calcification in Patients on Regular Hemodialysis. *Int J Artif Organs* 2009; 32(3): 173-179.
8. **Petrovic D**, Obrenovic R, Stojimirovic B. Cardiac troponins and left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients. *Clin Lab* 2008; 54(5-6):145-152.



9. **Petrović D, Stojimirović B.** Cardiac troponins: outcome predictors in hemodialysis patients. *J Artif Organs* 2009; 12(4): 258-263.

#### 4. **Научна област дисертације**

Медицина. Ужа научна област: Клиничка и експериментална интерна медицина

#### 5. **Научна област чланова комисије**

1. **Проф. др Драган Јовановић**, редовни професор факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, председник;
2. **Проф. др Зорица Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка 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 увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Томислава Николића, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита утицај акутног оштећења бубрега на функцију миокарда и оксидационо инфламацијски статус пацова.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **др Томислава Николића**, под називом **„Ефекти акутног оштећења бубрега нефротоксичним агенсима на функцију миокарда и инфламацијско-оксидациони статус пацова“** и одобри њену израду уз корекцију наслова у **„Утицај акутног оштећења бубрега изазваног нефротоксичним агенсима на функцију миокарда пацова“**.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др Драган Јовановић, редовни професор факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, председник;
2. Проф. др Зорица Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
3. Доц. др Владимир Живковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област физиологија, члан;

У Крагујевцу, 29.11.2016. године