

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-03-620/30 од 29.08.2018. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Петра Милића** под називом:

**“Испитивање ефеката дијете обогаћене екстрактом ароније на настанак и развој
метаболичког синдрома на анималном моделу“**

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

1. **Проф. др Драган Миловановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармакологија и токсикологија*, председник;
2. **Доц. др Марина Томовић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска технологија*, члан;
3. **НС Александра Арсић**, научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду за ужу научну област *Биохемија*, члан;

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Петар Милић** 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

Петар Милић рођен је 12.05.1966. године у Лесковцу, где је завршио основну и средњу школу. Основне студије на Технолошком факултету у Лесковцу (биохемијски одсек, прехранбени смер) уписао је школске 1985/1986. године, а завршио 1990. године. Основне студије на Фармацеутском факултету у Београду (смер - дипломирани фармацеут), уписао је школске 1994/1995. године, а завршио 2000. године. Специјалистичке студије (област - фармакоекономија и фармацеутска легислатива) на Фармацеутском факултету у Београду завршио је 2007. године. Докторске студије на Технолошком факултету у Лесковцу, студијски програм Технолошко инжењерство, уписао је школске 2010/2011. године, а завршио 2014. године, одбранивши докторску дисертацију „Оптимизација и моделовање кинетике екстракције резиноида и минералних материја из белог ивањског цвећа (*Galium mollugo L.*)“. Радни однос у Високој медицинској школи струковних студија у Ћуприји засновао сам 09.10.2012. године, где и данас ради као професор струковних студија ангажован на предметима: Фармакологија са фармакокинетиком, ОТЦ препарати, Фармацеутска пракса и Медицински паковни материјал.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Испитивање ефеката дијете обогаћене екстрактом ароније на настанак и развој метаболичког синдрома на анималном моделу“

Предмет: Испитивање ефеката примене екстракта ароније у исхрани на поремећаје оксидоредукционог статуса и промене у кардиоваскуларном систему и панкреасу у превенцији и настајању метаболичког синдрома на анималном моделу.

Хипотезе:

- Хронична исхрана обогаћена екстрактом ароније значајно утиче на редокс равнотежу пацова, доминантном променом антиоксидационих параметара мерених из крви пацова;
- Хронична исхрана обогаћена екстрактом ароније утиче превентивно на настанак метаболичких поремећаја;
- Хронична исхрана обогаћена екстрактом ароније са или без дијете обогаћене мастима утиче на морфометријске и патохистолошке промене срца и панкреаса.
- Хронична исхрана обогаћена екстрактом ароније значајно смањује штетне ефекте хроничне примене дијете обогаћене мастима посредством различитих механизма.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Петар Милић, је објавио рад у целини у часопису категорије M21, у коме је први аутор, чиме је стако услов за пријаву теме докторске дисертације.

1. **Milić PS, Rajković KM, Stamenković OS, Veljković VB.** Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). *Ultrason Sonochem.* 2013; 20(1): 525-34.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Воће богато антиоксидансима и фитоестрогенима као што су флавоноиди и полифеноли су показали одређену ефикасност у смањењу симптома метаболичког синдрома. Повећан унос воћа и поврћа је позитивно повезан са смањењем укупног ризика за настанак кардиоваскуларних болести, бољу контролу дијабетеса тип-2 и неалкохолне болести јетре. Антоцијанини су биоактивни флавоноиди који дају љубичасту боју воћу али поврћу, а чија редовна употреба се у клиничким студијама повезује са смањење традиционалних фактора ризика, као што су гојазност, неалкохолна болест јетре, дијабетес и кардиоваскуларне болести. Епидемиолошки подаци говоре и да је употреба суплемената са антоцијанинима у порасту у свету, па се тако процењује да је просечан дневни унос одрасле особе око 1000 mg полифенола, укључујући 215 mg антоцијанина у САД-у.

Аронија, популарно бобичасто воће које води порекло из САД, расте и на европском континенту, Пољској, Чешкој, Словачкој али и у Норвешкој, Русији и Србији, где је због отпорности на ниске температуре добила назив сибирска аронија. Постоји неколико врста аронија, тамноцрвена (лат. *Aronia arbutifolia*), црна (лат. *Aronia melanocarpa*) и тамнољубичаста (лат. *Aronia prunifolia*). Плодови ароније су богати антоцијанинима, хлорогенском киселином и проантоцијанидинима, а садрже и одређену количину кверцетина и флавонона, а у мањој количини и друга полифенолна једињења.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања се огледа у новим сазнањима о могућностима превенције настајања метаболичког синдрома, као и потенцијалне улоге биљних препарата са високим садржајем антиоксиданаса у лечењу и превенцији метаболичког синдрома.

Циљ овог истраживања је да се испита ефекат хроничне исхране обогаћене екстрактом ароније на настанак и развој метаболичког поремећаја пацова. Поред тога, циљ је испитати и утицај хроничне примене примене екстракта са или без исхране обогаћене мастима на биохемијске, морфометријске и патохистолошке промене ткива срца, аорте, панкреаса и јетре, као и објаснити потенцијалне механизме настанка тих промена. У складу са овим општим циљем постављени су и следећи специфични циљеви:

1. Испитати утицај исхране обогаћене екстрактом ароније и дијете обогаћене липидима самостално или у комбинацији на морфометријске параметре (телесна маса, обим абдомена, телесна дужина, BMI и Lee индекс, као и добитак на тежини);
2. Испитати утицај исхране обогаћене екстрактом ароније и дијете обогаћене липидима самостално или у комбинацији на биохемијске параметре (гликемија, инсулин, гликозиловани хемоглобин, липиди (укупни холестерол, LDL-холестерол, триглицериди (Tg), HDL-холестерол), ALT, AST, лептин, тест интолеранције на глукозу);
3. Испитати утицај исхране обогаћене екстрактом ароније и дијете обогаћене липидима самостално или у комбинацији на маркере оксидативног стреса (супероксид анјон радикал (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2), индекс липидне пероксидације (*engl.* Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)), нитрити (NO_2^-)), и параметре антиоксидативног система заштите: активност каталазе (CAT),

активност супероксид дисмутазе (SOD) и концентрација редукованог глутатиона (GSH);

4. Испитати утицај исхране обогаћене екстрактом ароније и дијете обогаћене липидима самостално или у комбинацији на маснокиселинској профил укупних липида плазме;
5. Испитати утицај исхране обогаћене екстрактом ароније и дијете обогаћене липидима самостално или у комбинацији на патохистолошке промене појединих органа (срце, панкреас).

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Литературни подаци наводе да због својих састојака, производи од плодова ароније могу бити ефикасни као функционална храна и суплементација у превенцији и третману кардиоваскуларних обољења, хипертензије, хиперлипидемије, дијабетеса, уринарних инфекција али и као бактериостатик, у побољшању дигестије и памћења. Због својих изразитих антиоксидативних способности користи се за читав спектар поремећаја, а последњих година све више се помиње и антивирусно, антиканцерогено и антиинфламаторно дејство ароније.

Претклиничке експерименталне студије наводе податак да сок од ароније може смањити телесну тежину и инсулинску резистенцију код пацова на дијети са високим процентом фруктозе у исхрани.

Рандомизирани клиничке студије показале су да код испитаника са метаболичким синдромом, екстракт ароније снижава крвни притисак и концентрацију липида у крви без промене у телесној тежини. Међутим, мало је претклиничких и клиничких истраживања која су се бавила проблематиком ефеката ароније уопште, али нарочито је мало истраживања која су пратила хроничне ефекте суплементације концентрованог сока од ароније на настанак и даљи ток и развој метаболичког поремећаја у чијој основи је дијабетес мелитус тип-2, хиперлипидемија и хипертензија, односно улогу ароније на превенцију и третман ових метаболичких и кардиоваскуларних поремећаја.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија на животињама *in vivo* и анималном материјалу *in vitro*.

2.7.2. Популација која се истражује

Планирано је да истраживање обухвати 86 пацова, *Wistar albino* соја, мушког пола, старости 8 недеља, просечне телесне масе око 200 ± 20 грама. Експерименталне животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура 25°C , циклус светлост:тама 12:12 часова) и према прописима Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

2.7.3. Узорковање

Животиње би се разврстале у 2 групе (свака група би била подељена на одговарајуће подгрупе (по 12 животиња у свакој подгрупи):

Контролне групе:

- а) А група: стандардна храна за пацове без примене екстракта ароније
- б) Б група: стандардна храна за пацове уз примену екстракта ароније $0,45 \text{ ml/kg/дан}$ гаважом;

Експерименталне групе:

- а) В група: храна обогаћена липидима без примене екстракта ароније;
- б) Г група: храна обогаћена липидима уз примену екстракта ароније;
- в) Д група: након индукције дијабетеса стандардна храна за пацове без примене екстракта ароније;
- г) Е група: након индукције дијабетеса стандардна храна за пацове уз примену екстракта ароније.

Након периода аклиматизације у трајању од недељу дана животиње би биле подвргнуте одређеном хигијенско-дијететском режиму у трајању од четири недеље:

1. контролна група – стандардна храна за пацове
2. експериментална група – храна обогаћена липидима

У зависности од групе, животиње би осим контролисаног режима исхране имале и одговарајући суплементацију екстрактом *Aronia melanocarpa L.* у трајању од 4 недеље (0,45 ml/kg/дан гаважом). Након претходног хигијенско-дијететског режима са или без примене стрептозотоцина почиње примена екстракта ароније. Екстракт плода ароније је раствор за оралну употребу високог квалитета, који садржи високу концентрацију полифенола (431 mg/30ml), антоцијанина (120 mg/30ml), калијум сорбата (35,1 mg/30ml) и етанола (0,04% V/V).

Након четири недеље третмана храном обогатеном липидима, животиње из експерименталне групе након 6-8 часова гладовања добијају једну дозу стрептозотоцина интраперитонеално. Стрептозотозин се припрема *ex tempore* тако што се раствара у цитратном пуферу и у зависности од телесне масе примењује у дози 30-35 mg/kg тм.

Три дана (72 часа) након примене стрептозотоцина се проверава гликемија пацовима након 12 часова гладовања, животиње које имају вредности гликемије веће од 11,1 mmol/L се укључују даље у студију.

2.7.4. Варијабле

Морфометријска и патохистолошка испитивања

У току експерименталног периода, животињама би се недељно пратила телесна тежина и гликемија а свакодневно унос воде и хране, на основу чега би се израчунао и калоријски унос за сваку животињу из сваке групе за цео експериментални период, док би се једном недељно пратили: телесна маса, обим абдомена, телесна дужина и на основу тих вредности прорачунавали ВМІ и Lee индекс, као и добитак на тежини. ВМІ индекс се израчунава као однос измерене телесне тежине (g) и квадриране вредности телесне дужине (cm²). Телесна дужина се мери као дужина између њушке и аналног отвора. Lee индекс се израчунава као кубни корен односна телесне тежине (g) и телесне дужине (cm). Добитак на тежини (g/kg) се израчунава као однос dM и Mdt , при чему dM представља разлику у телесној маси између два мерења $dt=t_2-t_1$, а M је телесна тежина након првог мерења t_1 .

Биохемијска испитивања

У току експерименталног периода, крв би се узорковала у четири кључне тачке од интереса: (1) на почетку експеримента (1. дан), (2) након индукција болести, а пре почетка третмана (31. дан), (3) две недеље након започињања третмана (45. дан) и (4) четири недеље након третмана (60. дан). Венска крв пацова би се прикупила из фацијалне вене (*v. facialis*).

У прикупљеним узорцима крви одређивали би се следећи биохемијски параметри: гликемија, инсулин, гликозиловани хемоглобин, липиди (укупни холестерол, LDL, Tg, HDL), ALT, AST, лептин, параметри оксидативног стреса (супероксид анјон радикал O_2^- , водоник пероксид H_2O_2 , индекс липидне пероксидације TBARS, нитрити NO_2^-), параметри антиоксидативног система заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH) и инфламаторни маркери (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α).

У поменутиим тренуцима од интереса би се радио тест толеранције на глукозу. Тест толеранције на глукозу се спроводи након гладовања у трајању од 12 до 14 часова. Ниво глукозе мери се пре започињања теста а потом након 5, 15, 30, 45, 60, 90 и 120 минута од администрације глукозе. Глукоза се примењује *per os* и то у дози 1 g/kg тм, при чему се примењује 20% w/vol раствор D-глукозе. Крв се узима из репне вене и ниво глукозе се одређеује помоћу гликометра.

Маснокиселински профил укупних липида плазме био би анализиран гасно-течном хроматографијом на гасном хроматографу SHIMADZU 2014, Кјото, Јапан, након директне трансестерификације по модификованој методи Glaser-а и сарадника (2010).

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.

Патохистолошка испитивања

Након жртвовања животиња мерила би се количина абдоминалне масти (mg) и изражавала кроз однос са дужином тибије (cm) - (mg/cm). Узимали би се органи (јетра, панкреас, бубрег и срце) за хистопатолошку анализу. Прикупљено ткиво би се фиксирало у 4% неутрално пуферисаном формалдехиду у току најмање 24h. После фиксације, до готове

припреме ткива дешава се низ процеса: дехидратација (узлазним редоследом алкохола), осветљење (хлороформ или ксилен), укључивање у парафинске блокове у Парапласту апаратом за калупљење (Leica HistoCore Arcadia H), сечења микртоном (дебљина око 5 микрона, Leica RM 2125 RTS), депарафинизирања (термостат, ксилен), хидратација (наниже црвена алкохол), бојење и покривеност. Сви узорци ткива биће обрађени најмање седам дана од поступка узимања ткива. За визуелизацију структура у хистолошким секцијама ткива спровешће се бојења за рутинско прегледање дела ткива, стандардна метода Хематоксилин-Еозин (H&E).

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка заснован је на резултатима претходно објављених студија у којима је праћен утицај примене екстракта ароније и антоцијанина на настанак дијетом-индукованог метаболичког поремећаја на моделу *Wistar albino* пацова. За прорачун 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. Узимањем у обзир резултате наведене студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 72 (шест подгрупа, по 12 у животиња у свакој подгрупи). Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе, укупан студијски узорак је утврђен на 86 експерименталних животиња.

2.7.6. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата биће коришћен статистички програм *SPSS 22.0 for Windows*. За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користиће се методе дескриптивне статистике. У случају да подаци не буду нормално распоређени, користиће се трансформација података (*log* функција) пре статистичке анализе. За поређење зависних варијабли у односу на групу и третман користиће се двофакторска анализа варијансе (ANOVA), а у случају постојања статистички значајних разлика средње вредности поредиће се *Newman-Keuls multiple comparison post-hoc* тестом. У случају немогућности трансформације података, употребиће се *Kruskal-Wallis* непараметријски тест. За тестирање повезаности између параметара, у зависности од њихове природе,

користиће се *Pearson*-ов или *Spearman*-ов коефицијент корелације. Статички значајним нивоом сматраће се вредности мање од 0.05 ($p < 0.05$).

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Резултати ове студије би помогли у откривању потенцијалних механизма којима екстракт *Aronia melanocarpa L.* самостално или у комбинацији са дијетом обогаћеном мастима утиче на настанак и развој метаболичког синдрома код пацова.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Студија ће детаљно разјаснити различите кардиоваскуларне механизме овог екстракта, али и механизме који су укључени у патофизиологију настанка али и лечења метаболичког поремећаја на анималном моделу. Од изузетне важности, резултати ове студије дали би потенцијална превентивна и терапеутска решења у смањивању метаболичких поремећаја и компликација ефеката *high-fat* дијете и могу имати и клиничку примену обзиром на свеобухватност овог истраживања.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже НС Весна Вучић, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду.

НС Весна Вучић 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 НС Весне Вучић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Veselinovic M, Vasiljevic D, **Vucic V**, Arsic A, Petrovic S, Tomic-Lucic A, Savic M, Zivanovic S, Stojic V, Jakovljevic V. Clinical Benefits of n-3 PUFA and α -Linolenic Acid in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Nutrients*. 2017; 9(4). pii: E325.

2. Petrovic S, Arsic A, Glibetic M, Cikiriz N, Jakovljevic V, **Vucic V**. The effects of polyphenol-rich chokeberry juice on fatty acid profiles and lipid peroxidation of active handball players: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016; 94(10): 1058-1063.
3. Vasiljevic D, Veselinovic M, Jovanovic M, Jeremic N, Arsic A, **Vucic V**, Lucic-Tomic A, Zivanovic S, Djuric D, Jakovljevic V. Evaluation of the effects of different supplementation on oxidative status in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2016; 35(8): 1909-1915.
4. Petrović S, Takić M, Arsić A, **Vučić V**, Drakulić D, Milošević M, Glibetić M. Effect of sex hormones on plasma phospholipid fatty acid composition in intact rats and rats with bilaterally occluded carotid arteries. *Physiol Res*. 2014; 63(3): 331-9.
5. Ristić-Medić D, Takić M, **Vučić V**, Kandić D, Kostić N, Glibetić M. Abnormalities in the serum phospholipids fatty acid profile in patients with alcoholic liver cirrhosis - a pilot study. *J Clin Biochem Nutr*. 2013; 53(1): 49-54.

Учешће на пројекту који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Р Србије (бр. пројекта III41030)

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Истраживања у фармацији

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Драган Миловановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармакологија и токсикологија*, председник;
2. **Доц. др Марина Томовић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска технологија*, члан;
3. **ВНС Александра Арсић**, виши научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду за ужу научну област *Биохемија*, члан;

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Петар Милић, 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.

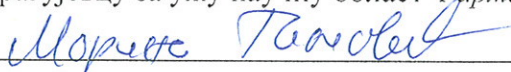
Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Петра Милића, под називом “Испитивање ефеката дијете обогаћене екстрактом ароније на настанак и развој метаболичког синдрома на анималном моделу“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

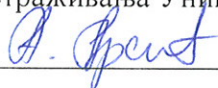
Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармакологија и токсикологија*,
председник



Доц. др Марина Томовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацевтска технологија*, члан



ВНС Александра Арсић, виши научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду за ужу научну област *Биохемија*, члан



У Крагујевцу, 07.09.2018. године