

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Број:	27	11	18
05	14	055/2-2	

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-774/28 од 10.10.2018. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др Тање Радоњић** под називом:

“Улога тиамина у инхибицији оксидативног стреса митохондрија и ендоплазматског ретикулума у анималном моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности“

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

1. **Проф. др Марко Фолић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник;
2. **Проф. др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Опита и неорганичка хемија*, члан;
3. **Доц. др Невена Јеремић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска хемија*, члан.

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **др Тања Радоњић** 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 Тања Радоњић је рођена у Београду 04. јануара 1990. године. Након завршене основне школе, завршила је прве три године гимназије у Београду, а потом завршну годину у Сједињеним Америчким Државама. Медицински факултет Универзитета у Београду, одсек за енглеску наставу уписала је школске 2008/09. године на којем је дипломирала у јуну

2014. године са просечном оценом 8,76. Након обављеног приправничког стажа, засновала је радни однос у Служби опште праксе Дома здравља Палилула у Београду.

Октобра 2014. године уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Изборно подручје Клиничка и експериментална примењена физиологија са спортском медицином. Са успехом је положила усмени докторски испит.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Улога тиаминa у инхибицији оксидативног стреса митохондрија и ендоплазматског ретикулума у анималном моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности“

Предмет: Испитивање потенцијалне улоге тиаминa у промени функције миокарда и коронарне циркулације на анималном моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности, као и верификација потенцијалних молекуларних механизма ефикасности тиаминa и доксорубицинa на нивоу срца. Такође, истраживање ће се базирати и на испитивању улоге оксидационог стреса у процесима који се одвијају у миокарду током примене доксорубицинa самостално или у комбинацији са тиамином односно мерењу биомаркера оксидационог оштећења: нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикала (O_2^-), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2).

Хипотезе:

- Тиамин сигнификантно утиче на хемодинамику, функцију миокарда и коронарну циркулацију на анималном моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности, и то променом концентрација срчаних ензима тропонина I и СК-МВ.
- Доксорубицин значајно повећава продукцију оксидационог стреса (супероксид анјон радикала (O_2^-), водоник пероксида (H_2O_2), нитрита (NO_2^-) и индекса липидне пероксидације (TBARS)) и сигнификантно утиче на активност ензима антиоксидативне заштите (каталазе (CAT), супероксид дисмутазе (SOD) и редукованог глутатиона (GSH)), док тиамин остварује у извесној мери супротно дејство од доксорубицинa.
- Маркери апоптозе (каспаза 3 и 12, Вах, Bcl-2) кардиомицита на анималном моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности растретљавају механизам дејства како доксорубицинa, тако и тиаминa.
- Доксорубицин значајно узрокује морфометријске промене ткива срца, док тиамин остварује карактеристичне патохистолошке промене.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, др Тања Радоњић, објавио је рад у целини у часопису категорије M51, у коме је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву теме докторске дисертације.

- **Radonjic T, Simonovic N, Nikolic Turnic T.** An overview of pharmacological and non-pharmacological treatment as a useful tool for the protection from cardiotoxicity of antineoplastic drugs. Ser J Exp Clin Res. 2018; doi: 10.2478/sjcer-2018-0019. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Доксорубицин као антитуморски агенс испољава своје дејство као интеркалатор, тако што блокира дејство ензима топоизомеразе II, чиме се спречава процес репарације ДНК молекула, као и стварањем слободних радикала који оштећују ћелијску мембрану, ДНК и протеине у туморским ћелијама. Упркос клиничкој ефикасности овог цитостатика, његова примена је ограничена сходно многобројним нежељеним ефектима, као што је, између осталог, кардиотоксичност која може настати чак и након акутне примене. Мада није познат тачан механизам којим доксорубицин изазива кардиотоксичност, најшире прихваћена хипотеза је базирана на развоју оксидативног стреса који настаје као последица стварања реактивних кисеоничних врста. У прилог овој претпоставци иде и чињеница да је миокард изразито осетљив на дејство слободних радикала сходно слабо развијеном антиоксидативном одбрамбеном механизму. Познавајући патофизиологију настанка кардиоваскуларних болести срца, још увек се трага за потенцијалним терапеутским решењима у домену лечења кардиоваскуларних болести. Многи антиоксиданси могу спречити ћелијску смрт узроковану исхемијско-реперфузионим повредама срца, али и умањити стрес узрокован реактивним азотним и кисеоничним врстама, што се огледа у смањењу активности индуцибилне азот-моноксид синтетазе (iNOS), ендотелијалне азот-моноксид синтетазе (eNOS) и NADPH оксидазе. Литературни подаци из претклиничких студија наводе да би тиамин, сходно својим антиоксидативним карактеристикама, могао да утиче на редукцију продукције слободних радикала, чиме би се ублажила рана, а можда и касна кардиоваскуларна нежељена дејства доксорубицина.

2.5. Значај и циљ истраживања

Имајући у виду клинички и епидемиолошки значај онколошких болести, као и широку примену антрациклинских цитостатика, ово истраживање би могло бити од посебног значаја у домену реализације нових сазнања на пољу превенције озбиљних кардиоваскуларних нежељених ефеката доксорубицина.

Циљеви истраживања су следећи:

- Испитивање утицаја тиамина на хемодинамику (*in vivo*), функцију миокарда и коронарну циркулацију (*ex vivo*) на анималном моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
- Анализа утицаја тиамина на вредности срчаних ензима (тропонина I (TrI), лактат дехидрогеназе (LDH) и СК-МВ)) на анималном моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности, али и на маркере оксидационог стреса (супероксид ањон радикала (O_2^-), водоник пероксида (H_2O_2), нитрита (NO_2^-) и индекса липидне пероксидације (TBARS)), као и на ензиме антиоксидативне заштите (каталазе (CAT), супероксид дисмутазе (SOD) и редукованог глутатиона (GSH)) на анималном моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
- Испитивање утицаја тиамина и доксорубицина на маркере апоптозе (каспаза 3 и 12, Вах, Bcl-2) кардиомицита.
- Стандардним патохистолошким методама испитивање ефеката тиамина на све структуре срца након примене цитостатика и тиамина.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Последњих година, услед великог пораста броја оболелих од тумора дојке, јајника, акутне лимфобластне леукемије, Hodgkin-овог и non-Hodgkin-овог лимфома, саркома и многих других тумора и следствене примене доксорубицина, рапидан је и пораст броја студија које су се бавиле проблематиком од истраживачког интереса. У фокусу научних истраживања налазе се нове превентивне и терапијске стратегије којима се могу ублажити или отклонити нежељена дејства услед примене антрациклина. Многобројне биохемијске и имунолошке студије наводе податке и о другим механизмима доксорубицина, поред већ поменутог који се заснива на повећању оксидационог стреса, који могу бити разлог развоја кардиотоксичности. Као значајни механизми помињу се дисрегулација калцијума, ендоплазматски ретикулум-стрес (*eng. endoplasmic reticulum stress - ER stress*) односно активација имунских ћелија. Током ER stress-a, настаје оштећење ендотелних ћелија посредством апоптозе и инфламације. Инхибиција ER stress-a је потенцијална терапијска циљна тачка у кардиоваскуларним болестима као што су хипертензија, инфаркт миокарда и атеросклероза, али и у свим оштећењима на нивоу срчаног мишића. Примена различитих антиоксиданаса, међу којима је и тиамин, актуелна је истраживачка тема сходно њиховој потенцијалној улози у домену директне инхибиције стреса ендоплазматског ретикулума, као и митохондрија, са крајњим циљем редукације кардиоваскуларних оштећења.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

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

2.7.2. Популација која се истражује

Експериментална студија која ће се изводити на изолованом срцу пацова *Wistar albino* соја, мушког пола, старости 12 недеља и просечне телесне масе 350 ± 50 g (80 пацова). Све животиње ће, у зависности од тога да ли подлежу администрацији тиаминa или доксорубицина, бити подељене у три експерименталне и једну контролну групу.

Први део истраживања (*in vivo*) ће обухватити само оне пацове који ће бити подвргнути фармаколошком агенсу, доксорубицину и/или тиамину. Примена тиаминa ће подразумевати апликацију у дози од 25 mg/kg/дан током 7 дана, интраперитонеалном инјекцијом пре примене доксорубицина, који ће се примењивати у дози од 15 mg/kg/једнократно, интраперитонеалном инјекцијом. У овом делу истраживања, спровешће се хемодинамска испитивања, односно ехографија пре и након третмана животиње, и то како у експерименталним групама, тако и контролној групи у истим временским интервалима.

Други део истраживања (*ex vivo*) ће обухватити све животиње укључене у студију. Након 72 часа од примене цитостатика, жртвоваће се све животиње у циљу испитивања на изолованом срцу, као и спровести сва релевантна биохемијска, хемодинамска и патохистолошка испитивања. Након жртвовања, изолована срца пацова ће се перфундовати методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) при променљивом коронарном перфузионом притиску од 40 до 120 cm H₂O. 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 етичким принципима.

Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.7.3. Узорковање

Животиње ће се груписати у 4 групе, са по 20 животиња у свакој од њих:

1. CTRL група ће представљати контролну групу животиња без фармаколошког третмана
2. Т група чиниће групу животиња која ће се третирати тиамином у дози од 25 mg/kg/дан, током 7 дана интраперитонеалном инјекцијом

3. DOX група представљаће групу животиња која ће се третирати доксорубицином у дози од 15 mg/kg/једнократно, интрапериотонеалном инјекцијом
4. DOX+T група представљаће групу животиња које ће третирати тиамином у дози од 25 mg/kg/дан, током 7 дана, а након тога 8.-ог дана и доксорубицин у дози од 15 mg/kg/једнократно.

2.7.4. Варијабле

Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле биће омогућено убацивање сензора (*transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary*) у леву комору ради директног и континуираног праћења параметара функције леве коморе:

- *dp/dt max* - максимална стопа промене притиска у левој комори
- *dp/dt min* - минимална стопа промене притиска у левој комори
- *SLVP* - систолни притисак леве коморе
- *DLVP* - дијастолни притисак леве коморе
- *HR* - срчана фреквенца.

Вредност коронарног протока ће се одређивати флоуметријски. Коронарни венски ефлуент ће бити прикупљан на различитим коронарним перфузионим притисцима у опсегу од 40 до 120 cmH₂O, након стабилзације на притиску од 70 cmH₂O. На наведеним тачкама биће забележени и сви претходно наведени кардиодинамски параметри.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери оксидативног стреса:

- Индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS,
- Азот моноксид у форми нитрита (NO₂⁻),
- Супероксид анјон радикал (O₂⁻),
- Водоник пероксид (H₂O₂).

Такође, животињама ће се узимати венска крв из које ће се центрифугирањем издојити плазма серум и хемолизат. У плазми ће се одређивати вредности следећих оксидационих маркера и антиоксидационих ензима:

- Индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS
- Азот моноксид у форми нитрита (NO₂⁻)
- Супероксид анјон радикал (O₂⁻)
- Водоник пероксид (H₂O₂)

Из еритроцита ће се одређивати вредности следећих антиоксидационих ензима:

- Каталаза (CAT)

- Супероксид дисмутаза (SOD),
- Глутатион пероксидаза (GSH).

Из узорака серума, одређиваће се концентрација срчаних ензима:

- Креатин-киназе (CK-MB),
- Лактат дехидрогеназе (LDH)
- Тропонин I (iTR).

Део ткива срца ће се искористити за припрему хомогената ткива срца, који ће служити за одређивање поменутих маркера оксидационог статуса и активности антиоксидационог система заштите у ткиву срца.

Део ткива срца (лева комора) ће се употребити за припрему хомогената ткива, а део ће се користити за евалуацију експресије SERCA2 и MMP-2 протеина, Вах, Bcl-2, каспазе -3 и каспазе-12, eNOS и TUNEL-позитивних апоптотских ћелија у ткиву срца.

Срца животиња ће бити коришћена за хистолошку анализу. Након завршетка експеримента, срца че се фиксирати у 4% пуферизованом формалину, а након тога ће се уградити у парафинске калупе. 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 је заснован на резултатима претходних студија Onk *et al.* и Wank *et al* у којима је праћен утицај примене тиаминa на настанак антинеопластицима (цисплатин, доксорубицин) индукованог оштећења срца на анималном моделу. 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 наведених студија и имајући у виду могућност губитка неких експерименталних животиња из завршне анализе, укупан број је прорачунат на 80 експерименталних животиња (четири групе, по 20 у животиња у свакој групи).

2.7.6. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата биће коришћен статистички програм *SPSS 22.0*. 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 варијаблу у односу на групу и третман користиће се двофакторска анализа варијансе (ANOVA), а у сличају постојања статистички значајних разлика средње вредности, за поређење ће се користити се *Newman–Keuls multiple comparison post-hoc* тест. 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. Статистички значајним нивоом сматраће се вредност 0,05 ($p < 0,05$).

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Добијени резултати истраживања ће бити од посебног значаја у домену бољег сагледавања ефекта доксорубицина на ране промене у кардиоваскуларном систему. Узимајући у обзир фармаколошки и клинички значај наведеног медикамента, као и широку примену у терапији карцинома, али и високу инциденцију (30%) настанка кардиотоксичности код људи удружену са његовом применом, нова знања на поменутом пољу од интереса истраживања могу бити од велике драгоцености. Посебан значај овог истраживања је и испитивање ефекта доксорубицина са или без премедикације тиамином на снагу контракције и оксидациони стрес, што може допринети избору адекватног кардиопротективног средства које би омогућило смањење учесталости појаве кардиотоксичности, а уједно и обезбедило максимални ефекат на туморским ћелијама. Истовремено праћење параметара срчаних ензима, оксидативног стреса, ензима антиоксидативне заштите и хемодинамских параметара могло би бити од изузетне помоћи у домену расветљавања механизма дејства доксорубицина на миокард и коронарну циркулацију.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Имајући у виду висок епидемиолошки значај онколошких обољења, као и широку примену антрациклинских цитостатика, ова претклиничка студија има за циљ пружање нових сазнања о молекуларним механизмима доксорубицина који доводе до штетних ефеката, али и о потенцијалним механизмима којима тиамин остварује своје протективне ефекте на овом моделу. Ово истраживање би могло да буде и од посебног значаја у домену прецизног објашњења утицаја тиамин на кардиоваскуларни систем као и редуkcију доксорубицином-индуковане кардиотоксичности, чиме би могло да постане уводник односно полазна тачка будућих клиничких испитивања на поменутоу таматику од интереса.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже доц. др Тамара Николић Турнић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација.

Доц. др Тамара Николић Турнић 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 доц. др Тамаре Николић Турнић који су у непосредној вези са темом докторске дисертације:

1. Jeremic J, **Nikolic Turnic T**, Zivkovic V, Jeremic N, Milosavljevic I, Srejovic I, Obrenovic R, Jancic S, Rakocevic M, Matic S, Djuric D, Jakovljevic V. Vitamin B complex mitigates cardiac dysfunction in high-methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;45(7):683-93.
2. **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):1040-9.
3. Simonovic N, Jakovljevic V, Jeremic J, FINDERLE Z, Srejovic I, **Nikolic Turnic T**, Milosavljevic I, Zivkovic V. Comparative effects of calcium and potassium channel modulators on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *Mol Cell Biochem*. 2018; doi: 10.1007/s11010-018-3384-y.
4. Petkovic AM, Jakovljevic VL, Bradic JV, Jeremic JN, Jeremic NS, **Nikolic Turnic TR**, Jovicic NU, Rosic VZ, Srejovic IM, Zivkovic VI. 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;2018:5979721.
5. Stojic IM, Zivkovic VI, Srejovic IM, **Nikolic TR**, Jeremic NS, Jeremic JN, Djuric DM, Jovicic N, Radonjic KG, Bugarcic ZD, Jakovljevic VLJ, Novokmet SS. Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart: the effects of acute application on oxidative stress biomarkers. *Mol Cell Biochem* 2018;439(1-2):19-33.
6. **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):109-18.

7. Vranic A, Simovic S, Ristic P, **Nikolic TR**, Stojic I, Srejovic IM, Zivkovic VI, Jakovljevic V PhD, Djuric D. The acute effects of different spironolactone doses on cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95(11):1343-50.

4. Научна област дисертације

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

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Марко Фолић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник
2. **Проф. др Тибор Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Општа и неорганска хемија*, члан
3. **Доц. др Невена Јерemiћ**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска хемија*, члан

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

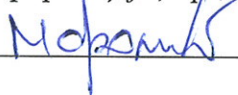
На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, др Тања Радоњић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно је постављен и дефинисан, а научна методологија је јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Тање Радоњић, под називом „Улога тиамина у инхибицији оксидативног стреса митохондрија и ендоплазматског ретикулума у анималном моделу доксорубицином индуковане кардиотоксичности“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

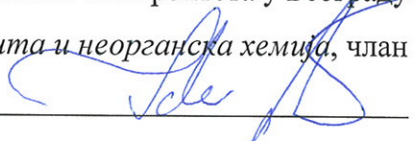
Проф. др Марко Фолић

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

_____ 

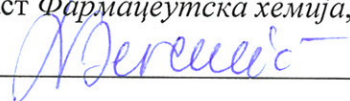
Проф. др Тибор Сабо

Редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду
за ужу научну област *Општа и неорганска хемија*, члан

_____ 

Доц. др Невена Јерemiћ

Доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
за ужу научну област *Фармацеутска хемија*, члан

_____ 

Крагујевац,

29.10.2018. године