

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ФАКУЛТЕТА МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

И

ВЕЋУ ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу одржаној 15.4.2024. године (број одлуке: IV-03-268/18) одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом: „Улога комбиноване примене антагонисте АТ1 рецептора и инхибитора неприлизина у промоцији *browning*-а на експерименталном моделу метаболичког синдрома и *in silico* идентификација сигналних путева”, кандидата **Марине Николић**, студента докторских академских студија Факултета медицинских наука, за коју су именовани коментори **Владимир Јаковљевић**, редовни професор и **Невена Јеремић**, ванредни професор.

На основу података којима располажемо достављамо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

О ОЦЕНИ УРАЂЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. Подаци о докторској дисертацији
1.1. Наслов докторске дисертације:
Улога комбиноване примене антагонисте АТ1 рецептора и инхибитора неприлизина у промоцији <i>browning</i> -а на експерименталном моделу метаболичког синдрома и <i>in silico</i> идентификација сигналних путева
1.2. Опис докторске дисертације (навести кратак садржај са назнаком броја страница, поглавља, слика, шема, графикона, једначина и референци) (до 500 карактера):
Докторска дисертација садржи 201 страну, подељена је на седам поглавља, цитирано је 304 референци. Резултати су представљени кроз 56 слика, 58 графикона, 18 табела и 2 схеме. Циљ студије је био да се испита утицај комбиноване примене валсартан/сакубитрила на промоцију <i>browning</i> -а код здравих и пацова са метаболичким синдромом чуваних на собној или ниској температури. <i>In silico</i> студије спроведене су са циљем да се идентификују сигнални путеви којима примењени третман индукује <i>browning</i> .
1.3. Опис предмета истраживања (до 500 карактера):
У овој докторској дисертацији испитан је потенцијални ефекат валсартан/сакубитрила на превођење белог у беж масно ткиво на експерименталном моделу метаболичког синдрома, као и да се идентификују сигнални путеви који се налазе у основи механизма остварених ефеката. Главни циљ истраживања био је усмерен на упоређивање ефекта примењеног третмана на

промоцију *browning*-а у експерименталном моделу метаболичког синдрома самостално или у комбинацији са истовременим излагањем животиња хладноћи.

1.4. Анализа испуњености полазних хипотеза:

Хипотезе истраживања:

1. Субакутна примена валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења утиче на телесну масу, масу органа, липидни и гликемијски профил здравих и животиња са метаболичким синдромом.
2. Самостално примењена орална суспензија валсартан/сакубитрила или у комбинацији са ефектом хлађења утиче на хемодинамске параметре здравих и животиња са метаболичким синдромом.
3. Третман валсартан/сакубитрила самостално или у комбинацији са ефектом хлађења се одражава на системски редокс статус здравих и животиња са метаболичким синдромом.
4. Излагање здравих и животиња са метаболичким синдромом протоколу хлађења као и истовременој примени валсартан/сакубитрила утиче на системски ниво адипокина и пуринских нуклеотида.
5. Субакутна примена валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења утиче на морфолошке карактеристике субкутаног и висцералних масних ткива здравих и пацова са метаболичким синдромом.
6. Излагање хладноћи као и симултана примена валсартан/сакубитрила утиче на синтезу молекула специфичних за индукцију *browning*-а у масном ткиву здравих и пацова са метаболичким синдромом.
7. Релативни ниво експресије маркера *browning*-а у масним ткивима здравих и пацова са метаболичким синдромом се мења након излагања протоколу хлађења самостално или уз истовремену примену валсартан/сакубитрила.
8. Густина и површина адипоцита здравих и пацова са метаболичким синдромом је модификована након третмана валсартан/сакубитрилом самостално или у комбинацији са ефектом хлађења.
9. Субакутна примена валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења има кардиопротективни потенцијал на моделу исхемијско/реперфузионе повреде здравих и животиња са метаболичким синдромом.
10. Валсартан/сакубитрил ступају у молекулске интеракције са регулаторима *browning*-а у оквиру сигналних путева.

1.5. Анализа примењених метода истраживања:

Методолошки приступ истраживањима у оквиру ове докторске дисертације је одговарајући и у потпуности усаглашен са постављеним циљевима и хипотезама. У студију је укључено 48 пацова, мушког пола, *Wistar albino* соја, старости 8 недеља са просечном телесном масом 200 ± 20 грама који су набављени са Војномедицинске академије у Београду. Након периода адаптације животиње су распоређене у осам једнаких група у зависности од дијететског режима, примењеног третмана као и температуре окружења којима су животиње биле излагане. У циљу индукције метаболичког синдрома пацови су током 4 недеље били храњени храном са високим садржајем масти, а након дванаесточасовног гладовоња примењен је стрептозотоцин у једној интраперитонеалној дози од 25 mg/kg, који је растворен у свежем раствору 0,01 М цитратног пуфера, pH=4,5. Након три дана од инјекције стрептозотоцином, животињама је измерен ниво инсулина и гликемије наше као и вредност крвног притиска. Животиње са вредностима инсулина преко 6 mmol/L, гликемијом изнад 7 mmol/L и крвним притиском изнад 130/90 mmHg су даље биле укључене у студију. Орална суспензија валсартан/сакубитрила у дози од 68 mg/kg је припремљена растварањем комерцијално доступне филм таблете валсартан/сакубитрила у

дестилованој води у запреминском односу 34 mg/ml, а затим је свакој животињи давано 0,2 mL ове суспензије током 4 недеље третмана. Излагање ниским температурама подразумевао је свакодневно излагање животиња температури од +4°C током 4 недеље у трајању од 4 сата у специјалним коморама у којима је назначена температура контролисана уз помоћ дигиталног термометра. За време боравка у овим коморама, животиње су биле чуване у индивидуалним кавезима без хигијенске подлоге за животиње како би се спречило евентуално повећање телесне температуре, уз довољан приступ храни (стандардној или обогаћеној високим садржајем масти) и води. У циљу процене афинитета везивања сакубитрилата и валсартана према циљаном молекулу mTORC1, ова два једињења су одвојено молекулски уклапана у подјединице циљаног протеина применом програма *AutoDock 4.2*. Енергетска минимизација конформација сакубитрилата и валсартана спроведена је коришћењем софтвера *Chem3D Ultra 7.0*, уз употребу AM1 семи-емпиријске методе. Протеински октамер mTORC1, преузет са протеинске базе података, је припремљен за процес молекулског докинга у софтверу *BIOVIA Discovery Studio* при чему су из кристалне структуре били уклоњени кокристални лиганди (АТФ и јони магнезијума). Анализа молекулског уклапања спроведена је на ланцу А (mTOR подјединица), ланцу D (mLST8 подјединица) и ланцу W (RAPTOR подјединица), док је преосталих пет ланаца (X, B, E, Y и Z) избрисано у склопу припреме циљаног протеина. Докинг протокол у коме је протеин био конформационо ригидан а лиганд конформационо флексибилан спроведен је коришћењем *Lamarckian* генетичког алгорита са подразумеваним подешавањима. „Слепе“ студије молекулског уклапања су спроведене појединачно на свакој подјединици mTORC1 дефинисањем максималне коцке за претрагу на циљаном протеину. Тродимензионалне доковане конформације сакубитрилата и валсартана, као и њихове нековалентне везујуће интеракције са аминокиселинама циљаног протеина су визуелизоване коришћењем програма *Pymol 2.5.5*. На основу афинитета везивања сакубитрилата и валсартана према подјединицама mTOR и mLST8 који је утврђен у студијама молекулског уклапања, испитана је конформациона стабилност ових лиганд-протеин комплекса током времена. У ту сврху извршена је екстракција везујућих места сакубитрилата и валсартана на одговарајућим подјединицама mTORC1. Непосредно пре жртвовања животиња и 12-14 сати гладовања, спроведен је ОГТТ узимањем узорака крви из репне вене пацова. Затим је животињама дата глукоза у дози од 2 g/kg телесне масе у виду оралне суспензије након чега су узорци крви пацова узимани након 30, 60 и 120 минута од *per os* примењене глукозе. Како би се испитао утицај примењеног третмана на липидни статус мерен је ниво укупног серумског холестерола, триглицерида, LDL-а и HDL-а коришћењем програмираног биохемијског анализатора. Системски крвни притисак и вредност срчане фреквенце мерен је користећи неинвазивну методу репне плетизмографије, док је срчана функција као и структура миокарда процењена ехокардиографски. У тренутку жртвовања животиња сакупљани су узорци пуне крви при чему се након центрифугирања издвајала крвна плазма у циљу одређивања прооксидационих параметара (TBARS, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂), док је се из узорака лизираних еритроцита одређивала активност ензима антиоксидационе заштите (CAT, SOD и GSH). Методом ензимског имуноесеја високе сензитивности и селективности (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) из узорака серума одређивана је концентрација адипокина (адипонектин, лептин и грелин) и различитих сигналних молекула (инсулин и cGMP), док је из три различите врсте масног ткива (субкутано, ретроперитонеално и епидидимално) одређивана концентрација АТФ-а. Исечци масних ткива су коришћени за патохистолошку анализу (метода бојења хематоксилин/еозином) и за имунохистохемијско обележавање различитих антитела. У циљу испитивања ефекта третмана валсартан/сакубитрила као и протокола излагања хладноћи на промоцију маркера специфичних за феномен *browning*-а, исечци масних ткива су инкубирани UCP-1, mTOR, PGC1α и PPARγ антителима. Методом квантитативне полимеразне ланчане реакције у реалном времену (*Quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction* - qRT-PCR) одређивана је експресија гена специфичних за феномен *browning*-а (UCP-1, mTOR, PGC-1α и PPARγ) као и гена одговорних за про/антиинфламацијске цитокине (IL-1, IL-6, IL-10, IL-17 и TNFα). Други део овог истраживања односио се на проучавање ефекта примењеног

експерименталног протокола на *ex vivo* функцију изолованог срца пацова користећи модел ретроградне перфузије по *Langendorff*-у. Протокол се заснивао на тридесетоминутној исхемији која је праћена ретроградном перфузијом у трајању од једног сата. Пласирањем сензора у леву комору срца бележени су кардиодинамски параметри уз помоћ одговарајућег софтверског пакета (dp/dt max, dp/dt min, SLVP, DLVP и HR), док је вредност коронарног венског ефлуента праћена флуориметријски. Након спроведеног експеримента на *Langendorff*-овом апарату, изолована срца животиња су фиксирана у 10% раствору формалина а затим обојена хематоксилин/еозиним. У циљу детекције колагена у ткиву миокарда коришћена је техника бојења *Picro Sirius red*.

1.6. Анализа испуњености циља истраживања:

Циљеви ове докторске дисертације били су следећи:

1. Испитати утицај субакутне примене валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења на телесну масу, масу органа, липидни и гликемијски профил здравих и животиња са метаболичким синдромом.
2. Процена утицаја субакутне примене валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења на хемодинамске параметре здравих и животиња са метаболичким синдромом.
3. Евалуација ефекта субакутне примене валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења на системски редокс статус здравих и животиња са метаболичким синдромом.
4. Испитати изоловани ефекат хлађења као и истовремену примену валсартан/сакубитрила на системски ниво адипокина и пуринских нуклеотида здравих и животиња са метаболичким синдромом.
5. Испитати утицај субакутне примене валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења на морфолошке карактеристике субкутаног и висцералних масних ткива код здравих и пацова са метаболичким синдромом.
6. Испитати изоловани ефекат хлађења као и истовремену примену валсартан/сакубитрила на синтезу молекула специфичних за индукцију *browning*-а у масном ткиву код здравих и пацова са метаболичким синдромом.
7. Испитати ефекат хлађења, самостално или у комбинацији са субакутном применом валсартан/сакубитрила, на експресију гена у субкутаном и висцералним масним ткивима здравих и пацова са метаболичким синдромом.
8. Проценити густину и површину адипоцита код здравих и пацова са метаболичким синдромом који су били третирани субакутном применом валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења.
9. Испитивање потенцијалних кардиопротективних механизма услед субакутне примене валсартан/сакубитрила, самостално или у комбинацији са ефектом хлађења на моделу исхемијско/реперфузионе повреде здравих и животиња са метаболичким синдромом.
10. *In silico* методама молекулског уклапања и молекулске динамике идентификовати сигналне путеве којима валсартан/сакубитрил индукују *browning*.

Након завршене докторске дисертације сви постављени циљеви докторске дисертације су у потпуности испуњени.

1.7. Анализа добијених резултата истраживања и списак објављених научних радова кандидата из докторске дисертације (аутори, наслов рада, волумен, година објављивања, странице од-до, DOI број¹, категорија):

¹Уколико публикација нема DOI број уписати ISSN и ISBN

- Синергистички ефекат дуалне фармаколошке терапије и излагања хипотермији довео је до значајног смањења телесне масе као и масе масног ткива код животиња са метаболичким синдромом.
- Четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом уз излагање протоколу хлађења допринео је значајно бољој гликорегулацији, нивоу инсулина као и липидном статусу животиња са метаболичким синдромом што указује на ефикасност ове дуалне терапије у ублажавању симптома дијабетеса.
- Субакутна примена валсартан/сакубитрила утицала је на хемодинамске параметре код животиња са метаболичким синдромом у погледу регулације крвног притиска, побољшања ејекционе фракције као и дебљине зида леве коморе, док је израженији кардиопротективни ефекат уочен у групи животиња које су биле третиране овом фармаколошком терапијом у хипотермијским условима, што се огледа кроз побољшану срчану функцију и контрактилну способност миокарда ових животиња.
- Значајно ниже вредности прооксидационих молекула уз повећану активност ензима антиоксидационе заштите измерене су након четворонедељног третмана валсартан/сакубитрилом, што доприноси смањењу оксидационог стреса као главног феномена у патогенези метаболичког синдрома.
- Протокол хлађења значајно је утицао на вредности секретованих адипокина, при чему је довео до смањења концентрације адипонектина, лептина и повећања нивоа грелина у свим испитиваним групама. Међутим, истовремено излагање хладноћи и третману валсартан/сакубитрилом животиња са метаболичким синдромом, изазвало је најизразитију промену концентрације грелина као важног орексигеног хормона у патогенези метаболичког синдрома.
- Четворонедељни третман валсартан/сакубитрилом смањio је ниво проинфламацијских и индуковао продукцију антиинфламацијских цитокина у условима метаболичког синдрома и на тај начин допринео смањењу локалне инфламације и бољем метаболичком статусу.
- Фармаколошки третман валсартан/сакубитрилом повећао је серумске вредности сGMP-а, док је уз истовремено излагање хладноћи смањio активност АТР-а, што указује на то да је примењени третман индуковао *browning* а тиме и стварање беж адипоцита који се сматрају неефикасним за продукцију АТР-а.
- *Browning* промовисан субакутном применом валсартан/сакубитрила са доминантно већим ефектом у условима хипотермије, одликује се стицањем мултилокуларне морфологије белог масног ткива, што је праћено и повећаном експресијом UCP-1 као главног термогеног биомолекула.
- Значај PGC-1 α -PPAR γ сигналног пута у адаптивној термогенези, која је највероватније посредована применом валсартана, се огледа кроз значајно већу експресију ових гена у белим масним ћелијама животиња које су биле третиране валсартан/сакубитрилом.
- mTORC1 представља заједнички циљани молекул преко којег валсартан/сакубитрил засебним механизмима индукују *browning*, при чему истовремена хипотермијска активација β 3-адренергичких рецептора додатно индукује експресију mTOR, а тиме и UCP-1 у масном ткиву животиња са метаболичким синдромом.
- Спроведена „слепа“ студија молекулског докинга показала је да је сакубитрилат остварио најстабилнију молекулску интеракцију са mTOR подјединицом, док је валсартан показао највећи афинитет везивања према mLST8 подјединици. Способност грађења стабилних комплекса сакубитрилата и валсартана са mTOR и mLST8 подјединицама mTORC1 током времена указује на висок афинитет везивања ова два једињења према горе поменутиим подјединицама mTORC1.

Резултати из докторске дисертације су публиковани у једном оригиналном научном раду:

- **Nikolic M**, Jeremic N, Lazarevic N, Stojanovic A, Milojevic Samanovic A, Novakovic J, Zivkovic V, Nikolic M, Nedeljkovic N, Mitrovic S, Jakovljevic V. Sacubitril/Valsartan promotes white adipose tissue browning in rats with metabolic syndrome through activation of mTORC1. BioFactors. 2024. (doi: 10.1002/biof.2040) (M21)

1.8. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области и анализа извештаја о провери докторске дисертације на плагијаризам (до 1000 карактера):

Претрагом доступне литературе помоћу биомедицинских база података „Medline“ и „KoBSON“, коришћењем одговарајућих кључних речи: *valsartan, sacubitril, adipose tissue, browning, metabolic syndrome, rat, in silico studies* нису пронађене студије истог дизајна и методологије.

Извештај о плагијаризму показао је минималан степен преклапања и то само као последица навођења библиографских података о коришћеној литератури или општих података у методологији који се подударују са методологијом коришћеном у сличним истраживањима. Осим тога, у целини су поштована сва академска правила која се односе на цитирање резултата истраживања других аутора.

Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Марине Николић под називом „Улога комбиноване примене антагонисте АТ₁ рецептора и инхибитора неприлизина у промоцији *browning*-а на експерименталном моделу метаболичког синдрома и *in silico* идентификација сигналних путева“ представља резултат оригиналног научног рада.

1.9. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области:

Узимајући у обзир велику метаболичку активност белог масног ткива, при чему се претерана акумулација белих адипоцита тесно повезује са развојем кардиометаболичких компликација, све већа пажња се усмерава ка превођењу белог у мрко масно ткиво (*browning*) у циљу смањења настанка системских компликација које настају као последица гојазности. Овим истраживањем је по први пут показан потенцијал комбиноване примене валсартан/сакубитрила да на моделу експерименталног метаболичког синдрома индукује појаву беж адипоцита у анатомским депоима субкутаног и вицералног белог масног ткива. Иако је комбиновани фармаколошки облик валсартан/сакубитрила регистрован и одобрен за клиничку примену у терапији кардиоваскуларних болести, резултати овог истраживања указали су и на изузетан потенцијал ових лекова у регулацији биохемијских и хемодинамских параметара, на значајна антиоксидациона и антиинфламацијска својства примењених лекова, као и на потенцијал њихове комбиноване примене у индукцији мултилокурне морфологије белог масног ткива са високом експресијом гена који посредују у сингалној каскади промоције *browning*-а. Према нашим сазнањима, ово је прва студија која је на експерименталном моделу метаболичког синдрома доказала кардиопротективна својства валсартан/сакубитрила уз истовремени снажан потенцијал индукције *browning*-а три различите врсте масног ткива и расветлила циљане молекуле преко којих валсартан и сакубитрил индукују сигналну каскаду у индукцији *browning*-а. У складу са изнетим чињеницама, овом студијом је утврђено да валсартан/сакубитрил остварују мултифакторски учинак у стању метаболичког синдрома, остварујући бројне повољне хемодинамске ефекате али и снажан утицај на морфологију и функцију белог масног ткива као главног ендокриног органа у стању метаболичког синдрома. Узимајући у обзир епидемијски карактер гојазности, ово истраживање може представљати одступницу за будућа клиничка истраживања која би послужила за постављање евентуалне нове индикације за клиничку примену валсартан/сакубитрила у терапији гојазности и у превенцији настанка кардиометаболичких болести.

1.10. Оцена испуњености услова за одбрану докторске дисертације у складу са студијским програмом, општим актом факултета и општим актом Универзитета (до 1000 карактера):

На основу анализе достављене документације Комисија констатује да су испуњени сви услови за одбрану докторске дисертације кандидата Марине Николић под називом „ Улога комбиноване примене антагонисте АТ1 рецептора и инхибитора неприлизина у промоцији browning-a на експерименталном моделу метаболичког синдрома и in silico идентификација сигналних путева” у складу са студијским програмом Докторских академских студија, општим актом Факултета медицинских наука и општим актом Универзитета у Крагујевцу.

2. ЗАКЉУЧАК

На основу анализе докторске дисертације и приложене документације Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом „Улога комбиноване примене антагонисте АТ1 рецептора и инхибитора неприлизина у промоцији browning-a на експерименталном моделу метаболичког синдрома и in silico идентификација сигналних путева”, кандидата Марине Николић, предлаже надлежним стручним органима да се докторска дисертација прихвати и да се одобри њена одбрана.

Чланови комисије:

Проф. др Слободанка Митровић, редовни професор

Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија



Председник комисије

Проф. др Владимир Живковић, редовни професор

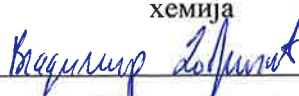
Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија



Члан комисије

Владимир Добричић, ванредни професор

Фармацеутског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Фармацеутска хемија



Члан комисије