

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЉЕНО:	27. 07. 2020
Орг.јед.	
05	6098-1
	ОДНОСТ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-473/37 од 15.07.2020. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Дијане Лаловић** под називом:

„Испитивање ефеката употребе минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" на поремећаје различитих органских система код пацова“

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

1. Проф. др Владимир Живковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. Доц. др Марија Секулић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хигијена и екологија*, члан;
3. Проф. др Ненад Стојиљковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Физиологија*, члан.

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Дијана Лаловић** 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

Рођена 1983. године у Београду. Након завршене средње школе уписује основне а затим и специјалистичке студије на Високој здравственој школи струковних студија чиме стиче звање специјалиста струковних студија у области Методика наставе. Студент је треће године Докторских академских студија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Превентивна медицина. Тренутно запослена као наставник здравствене неге у средњој струковној школи „Надежда Петровић” у Београду.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Испитивање ефеката употребе минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" на поремећаје различитих органских система код пацова “

Предмет: Испитати ефекте употребе минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" на морфолошке и функционалне промене кардиоваскуларног, гастроинтестиналног, хепатобилијарног и уринарног система код пацова користећи одговарајуће моделе болести ових органских система.

Очекује се да ће употреба минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" бити повезана са ублажавањем морфолошких и функционалних промена свих поменутих патофизиолошких процеса различитих органа и органских система пацова.

Претпоставља се да ће коришћење минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" бити повезано са променама оксидационог статуса пацова којима су индуковани наведени патофизиолошки поремећаји чиме ће се разјаснити један од механизма путем кога поменута вода утиче на испитивана стања.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, **Дијана Лаловић**, је објавила рад у целини у часопису категорије M51, у коме је први аутор, чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

Lalovic D, Vranic A, Jeremic J, Stanojevic D, Bolevich S, Bolevich S, Ristic J, Cikiriz N, Pesic D, Zagorac Z, Zivkovic V, Jakovljevic V. The influence of "Sneznik-1/79" mineral water on anthropometric, functional and biochemical parameters of professional basketball players: Role of oxidative stress. *Ser J Exp Clin Res.* 2020. doi: 10.2478/sjecr-2020-0015. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Осим непроценљивог значаја ендogene воде, опште је познато да егзогено унета вода може веома утицати на функцију већине органа односно целог организма. У том смислу велика пажња се посвећује како количини унете воде тако и њеним физичко-хемијским карактеристикама односно специфичном минералном саставу који одређује њена благотворна својства. На овај начин воде одговарајућих минералних карактеристика се деценијама уназад користе као адјувантна терапијска средства за лечење различитих патофизиолошких стања човека. Третман минералним водама преузима примат у терапијском алгоритму нарочито у стањима када употреба конвенционалних фармаколошких агенаса није дала одговарајуће резултате.

Коришћење минералних вода у ове сврхе је међутим већим делом засновано на теоријским претпоставкама (које узимају у обзир однос њиховог минералног састава и патофизиолошког субстрата у оквиру неке болести) а много мање на релевантним подацима базичних и клиничких истраживања. Већина података који указују да одређени типови ових вода могу ублажити прогресију различитих болести па чак бити повезане и са потпуном ремисијом тегоба долазе из неакадемских и научно неутемељених извора. Осим тога, механизми путем којих се остварују ова позитивна дејства су готово непознати.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања се огледа у потенцијално новим сазнањима о утицају примене минералне воде на органске системе на анималном моделу како би се обезбедили адекватни подаци који би усмерили правце дизајнирања студија на људима.

Циљ истраживања је испитати ефекте употребе минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" на морфолошке и функционалне промене кардиоваскуларног, гастроинтестиналног, хепатобилијарног и уринарног система код пацова користећи одговарајуће моделе болести ових органских система. У складу са овим општим циљем постављени су и следећи специфични циљеви:

1. Испитати утицај минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" на функцију изолованог срца дијабетичних пацова.
2. Испитати утицај минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" на формирање запаљенских промена желуца пацова са хемијски индукованим гастритисом.
3. Испитати утицај минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" на настанак запаљенских промена колона пацова са хемијски изазваним улцерозним колитисом.
4. Испитати утицај минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" на формирање запаљенских промена јетре пацова са хемијски индукованим алкохолним хепатитисом и панкреатитисом.
5. Испитати утицај минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" на настанак запаљенских промена гломеруло-тубулског система пацова са хемијски изазваним мембранозним гломерулонефритисом.
6. Мерењем маркера оксидационог статуса утврдити улогу оксидационог стреса као потенцијалног механизма путем кога поменута вода остварује своје ефекте у свим наведеним патофизиолошким стањима

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Вода чини отприлике 60–70% масе људског тела и есенцијални је медијум за одвијање свих биохемијских и физиолошких процеса који су од виталног значаја за функционисање ћелија, ткива, органа и организма у целини. Телесна вода је од суштинског значаја за варење, апсорпцију, транспорт и излучивање биомолекула, као и за

регулацију телесне температуре. Редукција садржаја телесне воде је у зависности од њеног степена повезана са различитим поремећајима који могу захватити скоро све органске системе док озбиљна дехидрација уколико се не третира неизоставно води у смрт.

Осим непроценљивог значаја ендogene воде, опште је познато да егзогено унета вода може веома утицати на функцију већине органа односно целог организма. У том смислу велика пажња се посвећује како количини унете воде тако и њеним физичко-хемијским карактеристикама односно специфичном минералном саставу који опредељује њена благотворна својства. На овај начин воде одговарајућих минералних карактеристика се деценијама уназад користе као адјувантна терапијска средства за лечење различитих патофизиолошких стања човека. Третман минералним водама преузима примат у терапијском алгоритму нарочито у стањима када употреба конвенционалних фармаколошких агенаса није дала одговарајуће резултате.

Коришћење минералних вода у ове сврхе је међутим већим делом засновано на теоријским претпоставкама (које узимају у обзир однос њиховог минералног састава и патофизиолошког субстрата у оквиру неке болести) а много мање на релевантним подацима базичних и клиничких истраживања. Већина података који указују да одређени типови ових вода могу ублажити прогресију различитих болести па чак бити повезане и са потпуном ремисијом тегоба долазе из неакадемских и научно неутемељених извора. Осим тога, механизми путем којих се остварују ова позитивна дејства су готово непознати. На овим чињеницама се и заснива оправданост потреба за испитивањем минералних вода најпре на анималним моделима како би се обезбедили адекватни подаци који би усмерили правце дизајнирања студија на људима.

Будући да су резултати независних анализа више Института за јавно здравље на територији Републике Србије показали да се у води из бунара Снежник, Сж-1/79 (Врњачка Бања) налазе физиолошки значајне концентрације натријума, магнезијума, хлорида, калцијума, калијума, бикарбоната, и флуорида, (чији је однос идеално избалансиран) претпоставља се да би свакодневни унос ове воде могао да буде од значаја за одржавање физиолошке функције гастроинтестиналног, хепатобилијарног и уринарног система, али и да оствари позитивне ефекте у различитим патофизиолошким стањима.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vivo* и *ex vivo*.

2.7.2. Популација која се истражује

Планирано истраживање би обухватило 112 пацова мушког пола (*Wistar albino* сој, телесне масе 250 ± 20 g, старости 8 недеља). Експерименталне животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура 22 ± 1 °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*). Све експерименталне процедуре ће се одвијати 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 принципима етике. Осим тога, пре почетка студије ће се обезбедити дозвола Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

2.7.3. Узorkовање

Животиње ће бити методом случајног узорка сврстане у укупно 14 експерименталних група (по 8 животиња у свакој групи). Разврставање у групе ће се спровести у складу са типом патофизиолошког поремећаја односно органа који се испитује:

1. група: здрави, нормогликемични пацови, који би користили стандардну храну и воду (здрави + обична вода (OB))
2. група: здрави, нормогликемични пацови, који би користили воду "Снежник" уз стандардну храну (здрави + "Снежник" вода (CB))
3. група: дијабетични, хипергликемични пацови, који би користили храну богату мастима и стандардну воду (DM + обична вода (OB))
4. група: дијабетични, хипергликемични пацови, који би користили храну богату мастима и воду "Снежник" (DM + "Снежник" вода (CB))
5. група: пацови са гастритисом, који би користили стандардну воду за пиће (здрави + обична вода (OB))

6. група: пацови са гастритисом који би користили воду "Снежник" (гастритис + "Снежник" вода (СВ))
7. група: пацови са колитисом који би користили стандардну воду за пиће (колитис + обична вода (ОВ))
8. група: пацови са колитис који би користили воду "Снежник" (колитис + "Снежник" вода (СВ))
9. група: пацови са алкохолним хепатитисом који би користили стандардну воду за пиће (хепатитис + обична вода (ОВ))
10. група: пацови са алкохолним хепатитисом који би користили воду "Снежник" (хепатитис + "Снежник" вода (СВ))
11. група: пацови са гломерулонефритисом који би користили стандардну воду за пиће (гломерулонефритис + обична вода (ОВ))
12. група: пацови са гломерулонефритисом који би користили воду "Снежник" (гломерулонефритис + "Снежник" вода (СВ))
13. група: пацови са панкреатитисом који би користили стандардну воду за пиће (панкреатитис + обична вода (ОВ))
14. група: пацови са панкреатитисом који би користили воду "Снежник" (панкреатитис + "Снежник" вода (СВ))

Животиње из свих група би биле праћене током четири недеље колико је и трајао третман водом из изворишта "Снежник-1/79".

2.7.4. Варијабле

Индукција дијабетес мелитуса типа 2

Протокол изазивања дијабетеса типа 2 би подразумевао комбиновани третман стрептозотоцином (30mg/kg, *i.p.* једнократно) и специјалном масном храном која је богата трансмасним киселинама (high fat diet, током четири недеље). Пре индукције дијабетеса пацови ће гладовали током 12 часова. Овакав модел омогућава развој хипоинсулинемијског дијабетеса без кетозе и значајног електролитног дисбаланса. Гликемија преко 7 mmol/l као и хиперинсулинемија после 48-72 часа након терапије сматрала би се доказом за постојање дијабетеса. Гликемија би се одређивала сваке недеље,

у два мерења. Након потврде хипергликемије, хипергликемичним животињама би стандардна лабораторијска храна била замењена исхраном која је богата мастима (стандардна храна обогаћена са 20% сунцокретовог уља и 1,5% холестерола). Поред тога, експерименталним групама би се уместо стандарне воде за пиће из водовода, давала минерална вода из изворишта "Снежник-1/79".

Индукција хемијског гастритиса

У сврху изазивања оваквог типа гастритиса животињама ће се током 4 недеље *per os* апликовати етанол растворен у води за пиће (80% (v/v) етанола у дози од 8 ml/kg), у складу са дизајном за кога је литературно доказано да индукује гастричне запаљенске лезије. Пре индукције гастритиса пацови ће гладовали током 12 часова.

Индукција хемијског улцерозног колитиса

У циљу индукције поменутог облика колитиса пацовима ће се током два дана са паузама од 24 сата између апликација трансректално администрирати сирћетна киселина (2 mL 4% раствора сирћетне киселине) у складу са претходним протоколом за кога је литературно доказано да индукује колитичне лезије по типу улцерозног колитиса. Пре самог започињања експеримента пацови ће гладовали током 12 часова. Како би биле лишене стреса на самом почетку индукције животиње ће бити подвргнуте општој анестезији (кетамин-ксилазил, 10mg/kg-5mg/kg, интраперитонеална ињекција једнократно), док ће за апликацију коришћен мекани педијатријски катетер (пречника 2.7 mm). Након апликације пацови ће бити остављени 30 минута у лежећем положају како би се превенирало истицање примењеног агенса.

Индукција алкохолног хепатитиса

Ради изазивања алкохолног хепатитиса пацовима ће се током четири недеље интрагастричном гаважом апликовати етанол у дози од 0.6 ml (0.5 gm)/100 gr/дан. Примењени протокол је изабран на основу литературних података који су показали да се на овај начин изазивају очекиване односно тражене лезије јетре. Пре самог започињања експеримента пацови су гладовали током 12 часова.

Индукција мембранозног гломерулонефритиса

У сврху индуковања овог облика гломерулонефритиса пацовима ће се током четири недеље интраперитонеално апликовати говеђи серумски аблумин у дози од 2 mg/kg телесне тежине на дан. Примењени протокол је изабран на основу литературних података који су показали да се на овај начин изазивају тражене лезије гломерула и евентуално тубулског система.

Индукција алкохолног панкреатитиса

У циљу изазивања поменутог облика панкреатитиса пацови ће током четири недеље конзумирати храну са високим садржајем масти (комерцијална храна обogaћена са 25% липида: 25% липиди, 15% протеини, 51% скроб, 5% влакна) уз истовремену интрагастричну гаважу етанола у дози од 0.6 ml (0.5 gm)/100 gr/дан. Примењени протокол је изабран на основу литературних података који су показали да се на овај начин изазивају очекиване односно тражене лезије јетре. Пре самог започињања експеримента пацови су гладовали током 12 часова.

Функционални параметри срчаног рада

Као што је наведено, након жртвовања пацова, приступило би се ургентној торакотомији и изолацији срца. После изоловања и препарисања, срце ће се перфундовати према модификованој техници изолованог ретроградно перфундованог срца по *Langendorff*-у. Помоћу сензора постављеног у леву комору пратиће се следећи кардиодинамски параметри:

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) ће се одређивати флоуметријски.

Функција миокарда и коронарна ауторегулација ће се испитивати при промени перфузионог притиска, почев од притиска од 60 cmH₂O, затим 80 cmH₂O, 100 cmH₂O, 120

cmH₂O и на крају 40 cmH₂O, док ће се за сваку вредност перфузионог притиска регистровати параметри функције леве коморе и мерити коронарни проток.

Параметри срчаног оксидационог стреса

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери срчаног оксидационог статуса:

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

Параметри системског оксидационог стреса

У прикупљеним узорцима крви ће се одређивати следећи маркери за процену системског редокс статуса: концентрације про-оксидационих параметара (индекс липидне пероксидације (TBARS), азот моноксид у облику нитрита (NO₂⁻), супероксид анион радикал (O₂⁻), водоник пероксид (H₂O₂)) и активност компоненти антиоксидационог система заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH). Поред ових маркера, у зависности од типа изазваног патофизиолошког процеса односно у одговарајућим групама би се након жртвовања животиња приступило изолацији следећих органа: срца, желуца, јетре, колоне, бубрега и панкреаса ради патохистолошких анализа.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима претходно публиковане студије сличног дизајна. За прорачун је коришћен *t*-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. Узимајући у обзир резултате ове студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 84 (по 6 у свакој групи). Међутим, због могућности искључења експерименталних животиња из завршне анализе, укупни студијски узорак је утврђен на 112 експерименталне животиње (по 8 у свакој групи).

2.7.6. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата ће се користити статистички програм SPSS 20.0 for Windows. Процена нормалности расподеле података ће се урадити на основу Shapiro-Wilk testa. Од метода аналитичке статистике за поређење нумеричких обележја посматрања између група користиће се Mann-Whitney тест. За поређење просечних вредности параметарских обележја употребљаваће се анализа варијансе (ANOVA) као и непараметријска варијанта теста по Kruskal-Wallis-у у зависности од расподеле података. Сви добијени резултати ће бити приказани табеларно и графички. Вредност $p < 0,05$ сматраће се статистички значајном а вредност $p < 0,01$ високо значајном.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Резултати предложеног истраживања би могли да помогну у расветљењу ефеката минералне воде "Снежник-1/79" на болести различитих органа код пацова. Испитивањем утицаја ове воде на најважније органске системе би се омогућило сагледавање укупног дејства на организам што је од несумњивог значаја. На овај начин би се указало на значај примене "Снежник-1/79" воде али и минералних вода уопште као потенцијално нових адјувантних терапијских средства у третману испитиваних болести чија је оправданост употребе не само довољна ефикасност већ и лакша доступност, одсуство нежељених ефеката и минорно финансијско оптерећење. Поред тога, налази садашње студије могу да буду одлична основа за будућа истраживања из ове проблематике на хуманој популацији.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Употреба минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" може бити повезана са ублажавањем морфолошких и функционалних промена свих поменутих патофизиолошких процеса различитих органа и органских система пацова, као и са променом редокс равнотеже на анималном моделу. Обзиром на високу инциденцу кардиоваскуларних и гастро-хепато-интестиналних поремећаја, од несумњивог је значаја открити нове потенцијалне превентивне стратегије наведених болести. Због свега наведеног, сматрамо да је ова тема вредна истраживања.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се Доц. др Тамара Николић Турнић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Доц. др Тамара Николић Турнић поседује 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 Доц. др Тамара Николић Турнић који су у вези са темом докторске дисертације:

1. **Nikolic Turnic TR**, Jakovljevic VL, Djuric DM, et al. Efficiency of atorvastatin and simvastatin in improving cardiac function during the different degrees of hyperhomocysteinemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(10):1040-1049.
2. **Nikolic Turnic T**, Arsic A, Vucic V, et al. Hydroxymethylglutaryl Coenzyme a Reductase Inhibitors Differentially Modulate Plasma Fatty Acids in Rats With Diet-Induced-Hyperhomocysteinemia: Is ω -3 Fatty Acids Supplementation Necessary?. *Front Physiol.* 2019;10:892.

3. Mitrovic M, **Nikolic Turnic T**, Zivkovic V, et al. High-protein diet and omega-3 fatty acids improve redox status in olanzapine-treated rats. *Mol Cell Biochem.* 2020;468(1-2):143-152.
4. Radonjic T, Rankovic M, Ravic M, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Jeremic N, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, **Nikolic Turnic T**. The Effects of Thiamine Hydrochloride on Cardiac Function, Redox Status and Morphometric Alterations in Doxorubicin-Treated Rats. *Cardiovasc Toxicol.* 2020;20(2):111-120.
5. Jakovljevic V, Milic P, Bradic J, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, **Nikolic Turnic T**, Milosavljevic I, Jeremic N, Bolevich S, Labudovic Borovic M, Mitrovic M, Vucic V. Standardized Aronia melanocarpa Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2018;20(1):6.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Живковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. **Доц. др Марија Секулић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хигијена и екологија*, члан;
3. **Проф. др Ненад Стојиљковић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Физиологија*, члан.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ


На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, **Дијана Лаловић**, 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 **Дијане Лаловић**, под називом „**Испитивање ефеката употребе минералне воде са изворишта "Снежник-1/79" на поремећаје различитих органских система код пацова**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Владимир Живковић,

ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник



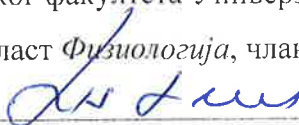
Доц. др Марија Секулић,

доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хигијена и екологија*, члан



Проф. др Ненад Стојиљковић,

ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Физиологија*, члан



У Крагујевцу, 17.07.2020. године