

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМАЉЕНО: 16. 09. 2022			
Осјела	Број	Датум	Брижљивост
01	9735		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-651/41 од 13.09.2022. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Тање Јешић Петровић** под називом:

„Кардиопротективни ефекти уља сремуша и алитридина на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности“

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

1. др **Тамара Николић Турнић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник;
2. др **Јована Брадић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска технологија*, члан;
3. др **Ранко Шкрбић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Бања Луци за ужу научну област *Фармакологија и токсикологија*, члан.

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

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат **Тања Јешић Петровић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Научни приступ проблему предложеног нацрта докторске дисертације

Кардиотоксичност подразумева срчану електрофизиолошку дисфункцију која настаје под дејством токсичних агенаса. Ова појава се карактерише немогућношћу срца да одржи крвну циркулацију, кардиомиопатијом, срчаном инсуфицијенцијом и различитим облицима неправилног рада срчаног мишића. Узимајући уобзир да је кардиотоксичност веома честа нуспојава онколошког лечења, у литератури се налазе бројни експериментални модели за изазивање кардиотоксичности. Један од највише проучаваних је и модел доксорубицином изазване кардиотоксичности. Према литературним подацима, може се закључити да доксорубицин, као цитостатик који се убраја у групу антрациклинских антибиотика кардиотоксичност изазива комплексним механизмом који обухвата настанак велике концентрације реактивних кисеоничних врста (ROS), продукцију азот монооксида, дисфункцију митохондрија и поремећаја концентрације бројних електролита, што све заједно доводи до ћелијске смрти. Управо због тога је модел доксорубицином изазване кардиотоксичности изабран као најадекватнијих модел за испитивање потенцијалних кардиопротективних ефеката уља сремуша и једног од његових активних принципа алитридина.

Allium ursinum L. је биљна врста у народу позната под називом сремуш или медвеђи (дивљи) лук. Узимајући у обзир да је широко распрострањена на Балкану, али и у целој Европи и Азији, још од давнина се користила у исхрани, али и у медицинске сврхе за лечење бројних обољења. Научној јавности ова биљна врста је постала занимљива када су бројна фитохемијска испитивања доказала да је веома богата сумпорним и фенолним једињењима, као и масним и аминокиселинама, полисахаридима, лецитином, и малим количинама металних јона. До данас је доказана антибактеријска и антимицробна дејства различитих екстраката на бази сремуша, а поједине фармаколошке студије доказале су и потенцијалне протективне ефекте у крдиоваскуларним обољењима. Узимајући у обзир све наведено, сматрали смо да би од великог значаја било испитати и његову ефикасност на моделу кардиотоксичности.

2.2. Процена научног доприноса крајњег исхода рада

Очекује се да ће уље сремуша и алитридин испољити протективне ефекте у погледу очувања функције срца. Такође, очекује се да ће двонедељни унос наведених агенаса ублажити поремећаје редокс равнотеже до којих доводи примена доксорубицина. Резултати ове студије пружиће значајан допринос сагледавању терапијских могућности примене сремуша, као и његовог потентног састојка алитридина.

2.3. Наслов, циљ(еви) и хипотеза(е) докторске дисертације

Наслов: „Кардиопротективни ефекти уља сремуша и алитридина на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности“

Циљеви: Главни циљеви овог истраживања подразумевају испитивање двонедељне примене уља сремуша и алитридина на функцију и морфологију миокарда пацова којима је индукована кардиотоксичност доксорубицином. У складу са главним циљем, постављени су и следећи специфични циљеви ове студије:

1. израда уља сремуша поступком хидродестилације,
2. хемијска карактеризација добијеног уља,
3. испитивање кардиопротективних ефеката уља сремуша на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности,
4. испитивање кардиопротективних ефеката алитридина на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности.
5. компарација добијених ефеката уља сремуша и алитридина.

Хипотезе: На основу досадашњих знања из ове области, постављене су следеће хипотезе:

1. хемијском карактеризацијом ће се потврдити присуство алитридина у саставу уља сремуша,
2. уље сремуша показује значајан кардиопротективни ефекат након двонедељне примене на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности,
3. алитридин показује значајан кардиопротективни ефекат након двонедељне примене на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности,
4. кардиопротекција индукована двонедељном применом уља сремуша или алитридина подразумева и значајне ефекте на оксидациони стрес, апоптозу и инфламацију.

2.4. Методе истраживања

2.4.1. Врста студије

Експериментална студија на пацовима *in vivo* и материјалу животињског порекла *in vitro* и *ex vivo*.

2.4.2. Популација која се истражује

Сремуш који је коришћен за припрему уља је убран у подножју Букуље у периоду април-мај 2022. године. За припрему уља коришћени су свежи листови сремуша, а уље ће се направити поступком хидродестилације помоћу апаратуре по *Clavanger*-у. Планирано истраживање обухвата хемијску карактеризацију уља сремуша. Након тога ће се спровести испитивање кардиопротективних ефеката уља на анималном моделу доксорубицином изазване кардотоксичности. Такође, на истом моделу ће се испитати и ефекти једног од најзначајнијих активних принципа сремуша, алитридина. У овом делу пројекта ће се користити *Wistar albino* пацови мушког пола, старости 6-8 недеља, телесне масе 200 ± 20 g. Све животиње ће бити чуване у виваријуму Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, под контролисаним условима, који подразумевају температуру $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и циклус светлости:тама 12:12 часова. Вода и храна за пацове који се користе у истраживању ће бити доступни у потребним количинама (*ad libitum*).

Сви експерименти ће се спровести у складу са одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за употребу животиња у експерименталним процедурама, као и у складу за важећим актима (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и етичким принципима.

2.4.3. Узорковање

Прикупљање сремуша спроведено је по лепом и сунчаном времену у периоду од априла до маја 2022. године на Букуљи, Аранђеловац, Србија. Након прикупљања, биљни материјал се чисти од делова других биљака, песка, камења и осталих нечистоћа, а затим се идентификује од стране стручног лица. Као што је претходно напоменуто, за потребе студије је припремљено уље поступком хидродестилације помоћу *Clavanger*-ове апаратуре. Како би се спречило испаравање добијених компонената, добијено уље се чува у замрзивачу, заштићено од светлости и влаге.

Фитохемијска анализа

Одређивање садржаја појединачних једињења у уљу сремуша извршиће се применом гасне хроматографије са масеном спектроскопијом (GH/MS). На основу удела алитридина у уљу сремуша, прорачунаће се одговарајућа доза која ће се давати животињама.

Анимални модел доксорубицином изазване кардиотоксичности

У оквиру испитивања кардиопротективних ефеката користиће се 40 *Wistar Albino* пацова, мушког пола, старости 6-8 недеља, телесне масе 200 ± 20 g подељени у четири групе:

1. контролна група (n=10, здрави нетретирани пацови),
2. DOX група (n=10, пацови којима је 14. дана од почетка експеримента апликован доксорубицин у дози од 15 mg/kg интраперитонеално),
3. DOX+сремуш (n=10, пацови који су током 14 дана третирани уљем сремуша у дози од 100 mg/kg, а 14. дана апликован доксорубицин у дози од 15 mg/kg интраперитонеално),
4. DOX+алитридин (n=10, пацови који су током 14 дана третирани алитридином, а 14. дана апликован доксорубицин у дози од 15 mg/kg интраперитонеално).

Како би се изазвала кардиотоксичност, доксорубицин се примењује у виду једне дозе 15 mg/kg интраперитонеално, а након 72 часова се очекују структурне и функционалне промене које одговарају моделу кардиотоксичности.

Третман уљем сремуша подразумева *per os* примену уља помоћу пипете у дози од 100 mg/kg. Са друге стране, доза алитридна је прерачуната на основу удела овог полисулфида у направљеном уљу сремуша, при чему се водило рачуна да се иста количина алитридина унесе и путем уља и појединачног једињења.

Током експерименталног периода праћена је телесна маса животиња на недељном нивоу, а након 17. дана експеримента, мерени су хемодинамски параметри ехокардиографском методом код свих пацова који су били укључени у студију. Након тога ће све животиње бити анестезиране, њихова крв ће бити прикупљена, а срца изолована. Након изоловања срца ће бити перфундована методом ретроградне перфузије по *Langendorff*-у (*Langendorff apparatus, Experimentaria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*), при чему ће *ex vivo* протокол подразумевати ауторегулацију, односно постепену промену коронарног перфузионог притиска од 40 до 120 cm воденог стуба у два циклуса. Након кардиодинамских истраживања узорци срца ће бити чувани за испитивање редокс статуса и хистолошке анализе које ће помоћи у доношењу закључака који се односе на ефекте испитиваног уља и алитридина.

2.4.4. Варијабле које се мере у студији

Испитивање функције срца *in vivo* и *ex vivo*

Hewlett-Packard Sonas 5500, Andover, MA, USA апаратом ће се испитати функција миокарда за сваког пацова који је укључен у студију и пратиће се следећи параметри: IVSd – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају дијастоле, LVIDd – унутрашња димензија леве коморе на крају дијастоле, LVPWd – дебљина задњег зида леве коморе на крају дијастоле, IVSs – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле, LVIDs – дебљина зида интервентрикуларног септума на крају систоле, LVPWs – дебљина задњег зида леве коморе на крају систоле, LVFS – проценат фракционог скраћења леве коморе, LVEF – ејекциона фракција леве коморе по следећој формули:

$$EF = 100 \times \frac{(LVEDV - LVESV)}{LVEDV}; LVESV = \frac{(7 \times LVIDs)}{(2.4 \times LVIDs)}; LVEDV = \frac{(7 \times LVIDd)}{(2.4 \times LVIDd)}$$

Крвни притисак и фреквенца срца пацова се мери неинвазивном *tail cuff* методом помоћу *MRBP-R IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA* апарата. Наиме, манжетна се поставља на реп пацова и помоћу ње се мери системски крвни притисак (11).

Ex vivo испитивање функције подразумева да се изоловано срце помоћу аорте постави на *Langendorff*-ов апарат, а потом се у леву комору убацује *Transducer BS4 73-0184, Experimentaria Ltd, Budapest, Hungary*. Након стабилизације срца континуирано се прате параметри функције леве коморе, који подразумевају: dp/dt max – максималну стопу промене притиска у левој комори, dp/dt min – минималну стопу промене притиска у левој комори, SLVP – систолни притисак леве коморе, DLVP – дијастолни притисак леве коморе и HR – срчана фреквенца. Вредности коронарног протока (CF) ће се одређивати флуометријски. Коронарни венски ефлуент ће бити прикупљан, а кардиодинамски параметри ће бити бележени на свим перфузионим притисцима којима ће срце бити подвргнуто.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента ће спектрофотометријски бити одређивани биомаркери оксидационог стреса који подразумевају индекс липидне пероксидације, мерен индиректно преко тиобарбитурне киселине, азот моноксид у форми нитрита, водоник пероксид и супероксид анијон радикал.

Маркери оксидационог стреса

Као што је већ напоменуто, приликом жртвовања животиња биће прикупљени узорци крви из којих ће се центрифугирањем добити еритроцити и крвна плазма. Из плазме ће се спектрофотометријским методама одређивати биомаркери оксидационог стреса, попут индекс алипидне пероксидације који ће бити мерен индиректним методом помоћу тиобарбитурне киселине, азот моноксид у форми нитрита, водоник пероксид и супероксид анијон радикал. Такође ће се одређивати и ант: каталазе (CAT), супероксид дисмутазе (SOD), као и концентрација редукованог глутатиона (GSH).

Део ткива срца након *ex vivo* испитивања биће искоришћен за прављење хомогената срца где ће бити одређени сви већ поменути биомаркери оксидационог стреса и ензими антиоксидационог система заштите.

Хистолошка анализа

Након завршетка експеримената, изолована срца животиња биће сачувана у формалину, а након фиксације ткиво се подвргава дехидратацији помоћу растућих концентрација етанола, а потом калупе. Калупи ће се на микротому сећи на секције одговарајуће дебљине, након чега ће се бојити хематоксилин/еозином.

2.4.5. Снага студије и величина узорка

Број потребних експерименталних животиња биће одређен коришћењем софтвера *G Power*, на основу претходних публикација. За прорачун ће се користити двострани *t*-тест за везани

узорак, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2). Узимајући у обзир резултате досадашњих истраживања, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 32, али узимајући у обзир да може доћи до искључивања неких експерименталних животиња из студије, укупан број потребних животиња за спровођење ове студије је 40.

2.4.6. Статистичка анализа

Статистичка обрада података спровешће се помоћу IBM *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM SPSS), верзија 22.0 за *Windows-ov* оперативни систем. Тестови који ће се користити су *Kolmogorov-Smirnov* и *Shapiro-Wilk*, за процену нормалности расподеле, а у зависности од природе варијабле и нормалности расподеле користиће се одговарајући тестови параметријски или или непараметарски тестови. За испитивање повезаности међу варијаблама биће коришћени Пирсонов или Спирманов тест корелације. Вредност $p < 0,05$ сматраће се статистички значајном.

2.5. Значај истраживања за развој науке

На основу доступне литературе може се закључити да је за бенефитне ефекте ове биљне врсте најзаслужнији сумпор и сумпорна једињења који се налазе у сремушу, па смо желели да испитамо и ефекте алитридина, једног од активних принципа сремуша. Са три атома сумпора у својој структури, алитридин се издваја као најстабилнији и најпотентнији полисулфид изолован из биљних врста породице *Alliaceae/Liliaceae* у коју се и *A. ursinum* убраја. Наиме, органосумпорна једињења, попут алитридина, интерагују са тиолним групама или једињењима која садрже тиол из биолошких система и на тај начин повећавају биорасположивост водоник сулфида.

2.6. Образложење теме докторске дисертације и оригиналност идеје

Узимајући у обзир широку доступност и велику распрострањеност сремуша, резултати предложене студије могли би да дају значајан допринос у лечењу кардиотоксичности изазване бројним онколошким лековима. Ово истраживање ће уједно и допринети сазнањима о ресурсима природних препарата који су доступни на територији наше земље. Откриће природних препарата који би били ефикасни у сузбијању дисфункције срца изазване доксорубицином представљаће значајан напредак у области примене хемиотерапеутика и значајно унапредити квалитет живота ових пацијената.

2.7. Кратка биографија и научно-истраживачки рад кандидата

Тања Јешић Петровић је завршила Медицински факултет Универзитета у Бања Луци 2009. године, а потом специјализацију из офталмологије 2015. године на истом факултету.

Тренутно је запослена као заменик директора Дома здравља у Добоју. Публиковала је као први аутор 1 рад категорије M51 чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

- Jesic Petrovic T, Gadzieva L, Bolevich S, Alisultanovich Omarov I, Kartashova M, Bolevich S. The role of phosphocreatine in the preconditioning and postconditioning of isolated rat heart. Ser J Exp Clin Res. 2022;23(2):109-117. **M51**

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже доц. др Јована Јерemiћ, доцент Факултета медицинских наука Универзиета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија.

Доц. др Јована Јерemiћ 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 Јоване Јерemiћ који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Draginic N, Andjic M, **Jeremic J**, Zivkovic V, Kocovic A, Tomovic M, Bozin B, Kladar N, Bolevich S, Jakovljevic V, Milosavljevic I. Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of *Melissa officinalis* Extracts: A Comparative Study. Iran J Pharm Res. 2022;21(1):e126561.
2. Vuletic M, Jakovljevic V, Zivanovic S, Papic M, Papic M, Mladenovic R, Zivkovic V, Srejovic I, **Jeremic J**, Andjic M, Kocovic A, Sretenovic J, Mitrovic S, Božin B, Kladar N, Bolevich S, Bradic J. The Evaluation of Healing Properties of Galium verum-Based Oral Gel in Aphthous Stomatitis in Rats. Molecules. 2022;27(15):4680.
3. Draginic N, Milosavljevic I, Andjic M, **Jeremic J**, Nikolic M, Sretenovic J, Kocovic A, Srejovic I, Zivkovic V, Bolevich S, Bolevich S, Curcic S, Jakovljevic V. Short-Term Administration of Lemon Balm Extract Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Focus on Oxidative Stress. Pharmaceuticals (Basel). 2022;15(7):840..
4. Kocovic A, **Jeremic J**, Bradic J, Sovrljic M, Tomovic J, Vasiljevic P, Andjic M, Draginic N, Grujovic M, Mladenovic K, Baskic D, Popovic S, Matic S, Zivkovic V, Jeremic N, Jakovljevic V, Manojlovic N. Phytochemical Analysis, Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Activity of Different Extracts of *Xanthoparmelia stenophylla* Lichen from Stara Planina, Serbia. Plants (Basel). 2022;11(13):1624.
5. Draginic ND, Jakovljevic VL, **Jeremic JN**, Srejovic IM, Andjic MM, Rankovic MR, Sretenovic JZ, Zivkovic VI, Ljujic BT, Mitrovic SL, Bolevich SS, Bolevich SB, Milosavljevic IM. *Melissa officinalis* L. Supplementation Provides Cardioprotection in a

4. Научна област дисертације

Медицина.

Предмет истраживања се односи на испитивање кардиопротективних ефеката уља сремуша и алитридина на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности. Предмет истраживања, циљ и постављене хипотезе и методолошки приступ истраживању су међусобно усклађени, а предложени ментор има научне компетенције које су подударне са предметом истраживања.

5. Научна област чланова комисије

1. др **Тамара Николић Турнић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник;
2. др **Јована Брадић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска технологија*, члан;
3. др **Ранко Шкрбић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Бања Луци за ужу научну област *Фармакологија и токсикологија*, члан.

Сви предложени чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Тање Јешић Петровић имају стручне и научне компетенције подударне са предметом истраживања.

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Тања Јешић Петровић, 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.

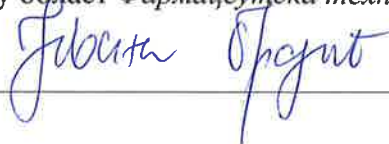
Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Тање Јешић Петровић, под називом „Кардиопротективни ефекти уља сремуша и алитридина на моделу доксорубицином изазване кардиотоксичности“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др **Тамара Николић Турнић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник



др **Јована Брадић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска технологија*, члан



др **Ранко Шкрбић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Бања Луци за ужу научну област *Фармакологија и токсикологија*, члан



У Крагујевцу, 14.09.2022. године