

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-1414/2-2, од 24. 02. 2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Тамаре Николић, под називом:

„Ефекти хиперхомоцистеинемije на функцију миокарда, коронарну циркулацију и редокс статус изолованог срца пацова: улога инхибитора хидроксиметил-глутарил коензим-А (HMG-COA) редуктазе“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
2. **Проф. др Марко Фолић**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација,
3. **Проф. др Драган Ђурић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија,

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу следећи

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Тамара Николић је рођена 14. 08. 1985. године у Новом Пазару, Република Србија. У периоду 2000 - 2004. године завршила је Средњу медицинску школу у Новом Пазару, са одличним успехом као носилац дипломе „Вук Караџић“. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је 2004/2005. године, а завршила 29.12.2010. године, са просечном оценом 8,16. У периоду од 2005. до 2007. радила је као студент-сарадник на предмету Физиологија у оквиру лабораторије која се бави научно-истраживачким радом из области клиничке експерименталне физиологије.

У периоду од новембра 2012. до маја 2014. радила је као лекар опште праксе у Дому здравља ``Нови Пазар``.

Студент је треће године Докторских академских студија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу на изборном подручју Клиничка и експериментална примењена физиологија са спортском медицином. Активно се бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију.

Од 11. јуна 2014. године запослена на Факултету медицинских наука као сарадник у настави за ужу научну област Клиничка фармација, од када активно учествује у наставном процесу.

Говори енглески и немачки језик и рад на рачунару

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Ефекти хиперхомоцистеинемije на функцију миокарда, коронарну циркулацију и редокс статус изолованог срца пацова: улога инхибитора хидроксиметил-глутарил коензим-А (HMG-CoA) редуктазе“

Предмет: Одређивање ефеката хомоцистеина на функцију миокарда, коронарну циркулацију и редокс статус изолованог срца пацова као и евалуација улоге различитих инхибитора HMG-CoA редуктазе у условима нормалних и повишених вредности хомоцистеина у крви пацова као и могућих механизма

Хипотеза: Хиперхомоцистеинемija може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова; Хронична примена два различита инхибитора HMG-CoA редуктазе (симвастатина и аторвастатина) значајно утиче на кардиодинамске параметре и вредности параметара оксидационог стреса код животиња са повишеним и нормалним вредностима хомоцистеина у крви.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидату је објављен један рад у целини за штампу у часопису са CC/SCI листе, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Nikolic T, Zivkovic V, Jevdjevic M, Djuric M, Srejevic I, Djuric D, Jeremic N, Djuric D, Bolevich S, Jakovljevic V. The effects of chronic administration of nandrolone decanoate on redox status in exercised rats. *Mol Cell Biochem* 2016;411(1-2): 95-105 **M23=3 бода**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Хиперхомоцистеинемija, присутна код 5-7% укупне популације, представља врло значајан, независан фактор ризика за развој различитих кардиоваскуларних обољења као што су хронична срчана инсуфицијенција, оштећења коронарних и периферних артерија. Хиперхомоцистеинемija се дефинише као медицинско стање код којег вредности укупног хомоцистеина у плазми износе више од 15 μ mol/l. На основу измерених вредности хомоцистеина у плазми хиперхомоцистеинемiju делимо на: умерену (16-30 μ mol/l), средњу (31-100 μ mol/l) и тешку (>100 μ mol/l). Најређе се развија тешка хиперхомоцистеинемija која настаје услед великих генетских мутација на нивоу ензима укључених у метаболизам хомоцистеина (цистатинин β -синтетазе, 5,10-метилентетрахидро-фолат редуктазе или метионин синтетазе). Најчешће настаје умерена хиперхомоцистеинемija у чију патогенезу су укључени генетски и фактори средине (исхрана дефицитарна фолатима, витаминима B₁₂, B₆; дисфункција бубрега, тиреоиде, карциноми, дијабетес; употреба кафе, цигарета, алкохола, лекова; старија животна доб и менопауза).

Хомоцистеин представља интермедијер који настаје у току процеса метаболизма есенцијалне аминокиселине метионина. Након што настане, хомоцистеин може да се реметилује у присуству витамина B₁₂ и фолат зависног пута до метионина (када постоји дефицит метионина); да се метаболише у присуству серина и витамина B₆ до цистеина (када је хомоцистеин присутан у већим концентрацијама); или да се секретује у плазму.

Хомоцистеин представља кључни елемент у процесима метилације. Након што се хомоцистеин реметилује настаје метионин који у присуству аденозин-три-фосфата подлеже S-аденозилацији и гради S-аденозилметионин (SAM). Метил група везана за терцијарни сумпор у SAM-у врло лако доводи до метилације других једињења при чему долази до губитка енергије и сама реакција је неповратна. Насупрот метилацији постоји и процес деметилације у којем настаје S-аденозилхомоцистеин (SAH) чијом хидролизом настају хомоцистеин и аденозин. Однос концентрација SAM-SAХ у ћелији одређује и њен метилациони потенцијал. Метаболизам метионина представља за сада једини познати извор хомоцистеина код сисара.

Хомоцистеин је деведесетих година прошлог века препознат као фактор ризика за настанак атеросклеротских промена и хиперкоагулабилности. Хомоцистеин доводи до ендотелне дисфункције кроз: процесе оксидативног стреса, активацију нуклеарног фактора (NF- κ B), инфламацију као и инхибицију ендотелне азот моноксид синтетазе (eNOS). Поред тога показано је да хомоцистеин повећава активност хидроксиметил-глутарил коензим-А (HMG-CoA) редуктазе која је кључна за биосинтезу холестерола. Повећана синтезе холестерола самим тим утиче на настанак атеросклеротских промена и развој коронарне артеријске болести. Бројне студије су показале да се умерена хиперхомоцистеинија може изазвати код експерименталних животиња употребом метионинске дијете или дијете дефицитарне фолатима. Bhandari et al су у свом истраживању показали да примена аторвастина, код животиња на метионинској дијети, у дози 0,2 mg/kg значајно снижава ниво хомоцистеина у серуму. Li et al су у свом истраживању показали да примена симвастатина, код животиња на комбинованој метионинској и дијети богатој мастима, у дози 5 mg/kg на дан значајно снижава ниво хомоцистеина у серуму.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Познато је да се инхибитори HMG-CoA редуктазе (статици) користе у примарној и секундарној превенцији коронарне артеријске болести и атеросклерозе јер снижавају ниво холестерола, међутим сам ефекат статина на хомоцистеин је слабо изучен. Мишљења научника о ефекту статина на хомоцистеин су опречна. Luftjohan et al су показали да симвастатин у дози од 80 mg/дан код пацијената са хиперхолестеролемијом значајно снижава ниво хомоцистеина. Malic et al су показали примена аторвастатина у дози од 10 mg/дан код ових пацијената значајно не утиче на ниво хомоцистеина. Rohilla et al су у својој студији такође проучавали утицај симвастатина али на анималним моделима, и закључили да овај статин у значајној мери утиче на нивое хомоцистеина али на нивое индекса липидне пероксидације док су у свом последњем истраживању поредили потенцијалне кардиопротективне ефекте аторвастатина и симвастатина у условима хиперхомоцистеиније на изолованим срцима пацова и дошли до закључка да употреба оваквог фармаколошког третмана у значајној мери доводи до редукције оксидационог стреса.

Циљ и хипотезе студије

Главни циљ истраживања је одређивање ефеката хомоцистеина на функцију миокарда, коронарну циркулацију и редокс статус изолованог срца пацова као и евалуација улоге различитих инхибитора HMG-CoA редуктазе у условима нормалних и повишених вредности хомоцистеина у крви пацова као и могућих механизма.

Главна хипотеза истраживања је да хиперхомоцистеинемија може имати штетно дејство на срчани мишић и коронарну циркулацију изолованог срца пацова. Хронична примена два различита инхибитора HMG-CoA редуктазе (симвастатина и аторвастатина) значајно утиче на кардиодинамске параметре и вредности параметара оксидационог стреса код животиња са повишеним и нормалним вредностима хомоцистеина у крви.

2.6. Веза са досадашњим истраживањима

Хомоцистеин је деведесетих година прошлог века препознат као фактор ризика за настанак атеросклеротских промена и хиперкоагулабилности. Хомоцистеин доводи до ендотелне дисфункције кроз: процесе оксидативног стреса, активацију нуклеарног фактора (NF-kb), инфламацију као и инхибицију ендотелне азот моноксид синтетазе (eNOS). Поред тога показано је да хомоцистеин повећава активност хидроксиметил-глутарил коензим-А (HMG-CoA) редуктазе која је кључна за биосинтезу холестерола. Повећана синтеза холестерола самим тим утиче на настанак атеросклеротских промена и развој коронарне артеријске болести. Бројне студије су показале да се умерена хиперхомоцистеинемија може изазвати код експерименталних животиња употребом метионинске дијете или дијете дефицитарне фолатима. Bhandari et al су у свом истраживању показали да примена аторвастатина, код животиња на метионинској дијети, у дози 0,2 mg/kg значајно снижава ниво хомоцистеина у серуму. Li et al су у свом истраживању показали да примена симвастатина, код животиња на комбинованој метионинској и дијети богатој мастима, у дози 5 mg/kg на дан значајно снижава ниво хомоцистеина у серуму.

Познато је да се инхибитори HMG-CoA редуктазе (статици) користе у примарној и секундарној превенцији коронарне артеријске болести и атеросклерозе јер снижавају ниво холестерола, међутим сам ефекат статина на хомоцистеин је слабо изучен. Мишљења научника о ефекту статина на хомоцистеин су опречна. Luftjohan et al су показали да симвастатин у дози од 80 mg/дан код пацијената са хиперхолестеролемијом значајно снижава ниво хомоцистеина. Malic et al су показали примена аторвастатина у дози од 10 mg/дан код ових пацијената значајно не утиче на ниво хомоцистеина. Rohilla et al су у својој студији такође проучавали утицај симвастатина али на анималним моделима, и закључили да овај статин у значајној мери утиче на нивое хомоцистеина али на нивое индекса липидне пероксидације док су у свом последњем истраживању поредили потенцијалне кардиопротективне ефекте аторвастатина и симвастатина у условима хиперхомоцистеинемике на изолованим срцима пацова и дошли до закључка да употреба оваквог фармаколошког третмана у значајној мери доводи до редукције оксидационог стреса.

2.7. Методе истраживања

У питању је експериментална студија на животињама и анималном материјалу *in vivo* и *in vitro*.

Планирано је да истраживање обухвати 85 пацова, Wistar albino соја, мушког пола, старости 4 недеље, просечне телесне масе око 110 грама. Експерименталне животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура 25°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).

Животиње би се груписале у три (3) експерименталне групе (свака група би била подељена на три подгрупе (по 8 животиња у свакој подгрупи): 1. контролна група пацова храњена стандардном храном, 2. експериментална група пацова храњена храном богатом метионином (7,7g/kg метионина), експериментална група пацова храњена храном богатом метионином без фолата (7,7g/kg метионина и 0g/kg фолата, витамина В₆ и В₁₂). У циљу изазивања клинички најближег облика хиперхомоцистеинемije животиње бити подвргнуте исхрани богатој метионином или исхрани богатој метионином без фолата, витамина В₁₂ и В₆ према раније утврђеном протоколу. 31. дана, након жртвовања, животињи се узима крв како би се измериле вредности хомоцистеина и утврдило постојање хиперхомоцистеинемije. Животиње би осим контролисаног режима исхране имале и одговарајући фармаколошки третман. У зависности од фармаколошког третман свака група је подељена на три подгрупе: 1. подгрупа свакодневно интраперитонеално прима физиолошки раствор, 2. подгрупа свакодневно интраперитонеално прима аторвастатин у дози 3 mg/kg, 3. подгрупа свакодневно интраперитонеално прима симвастатин у дози од 5 mg/kg. Свака група је на подгрупе подељена на исти начин.

Након завршеног контролисаног режима исхране и фармаколошког третмана (31. дана) животиње би биле жртвоване да би се спровела испитивања на изолованом срцу (испитала функција миокарда и коронарна ауторегулација). Жртвовање животиња ће се спровести на начин којим се избегава патња експерименталних животиња, а у сагласности са релевантном директивом.

Жртвованим животињама би се изоловало срце и перфундовало према модификованој техници изолованог ретроградно перфундованог срца по Langendorff-у. Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле омогућило би се убацивање сензора (transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary) у леву комору ради директног и континуираног праћења параметара функције леве коморе: а) $+dP/dt_{max}$ - максимална стопа промене притиска у левој комори, б) $-dP/dt_{min}$ - минимална стопа промене притиска у левој комори, в) SLVP - систолни притисак леве коморе, г) DLVP - дијастолни притисак леве коморе, д) HR - срчана фреквенца. Вредност коронарног протока (CF) би се одређивала 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 одређивати коронарни проток.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, за сваку вредност перфузионог притиска, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO₂⁻), супероксид анјон радикал (O₂⁻), водоник пероксид (H₂O₂).

У тренутку жртвовања животиње, употребом гиљотине, животињи се узима крв искрвављењем. Из узете крви се издвајају плазма и еритроцити. У плазми би се одређивао ниво хомоцистеина (метода за одређивање HPLC) како би се потврдила хиперхомоцистеинија ($>15\mu\text{mol/l}$), док би се ELISA методом мерила и концентрација ензима параоксоназе (PON). Из узорка плазме одређују се и следећи параметри: укупни холестерол, HDL холестерол, триглицериди, LDL холестерол. Поред тога, приликом жртвовања животиња прикупили би се узорци крви за процену системског редокс статуса, путем мерења нивоа про-оксидационих параметара (TBARS-а, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2), и антиоксидационих ензима заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH).

Након жртвовања животиње узимали би се срце, аорта, јетра, бубрег и мозак како би се утврдили хистолошке и морфолошке промене.

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.

За статистичку обраду резултата ће бити коришћен статистички програм SPSS 18.0 for Windows: За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користиће се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења. За испитивање нормалности расподеле користиће се тестови Kolmogorov Smirnov и Shapir Wilk, и графици: хистограм и normal QQ plot. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће се Студентов т-тест, Mann-Whitney тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, користиће се Bonferroni тест.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Ова студија би пре свега помогла у разјашњавању утицаја примене високих доза метионина кроз храну, као и одсуства кључних витамина B_6 , B_{12} и B_9 , на функцију срца, коронарну ауторегулацију и редокс статус. Поред аспекта индивидуалног утицаја метионина на ове параметре, ова студија би омогућила и да се увиде утицаји хроничне примене два различита инхибитора HMG-CoA редуктазе (симвастатина и аторвастатина) на ове параметере као и на вредности хомоцистеина код животиња са повишеним и нормалним вредностима хомоцистеина у крви.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Циљ ове студије би био да испита утицај хроничне примене различитих инхибитора ензима хидроксиметил-глутарил коензим-А редуктазе (HMG-CoA) на функцију срца и коронарну ауторегулацију променом коронарног перфузионог притиска код животиња са повишеним и нормалним вредностима хомоцистеина. Повишене вредности хомоцистеина у крви код пацова би се омогућиле применом исхране богате метионином или исхране богате метионином без фолата. Резултати ове студије би требали да помогну у расветљавању ефеката примене HMG-CoA инхибитора на функцију кардиоваскуларног

система како у условима хиперхомоцистеинемије тако и условима нормалних вредности хомоцистеина у крви

2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Доц. др Владимир Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Експериментална физиологија и фармакологија.

2.12. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
2. **Проф. др Марко Фолић**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација,
3. **Проф. др Драган Ђурић**, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија,

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове Др Тамаре Николић, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита утицај хроничне примене различитих инхибитора ензима хидроксиметил-глутарил коензим-А редуктазе (HMG-CoA) на функцију срца код животиња са повишеним и нормалним вредностима хомоцистеина.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза Др Тамаре Николић бити од великог научног и практичног значаја у смислу проучавања улоге инхибитора ензима хидроксиметил-глутарил коензим-А редуктазе (HMG-CoA) као потенцијално новог терапеутског средства у хиперхомоцистеинемiji.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Др Тамаре Николић „**Ефекти хиперхомоцистеинемije на функцију миокарда, коронарну циркулацију и редокс статус изолованог срца пацова: улога инхибитора хидроксиметил-глутарил коензим-А (HMG-CoA) редуктазе**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. др Владимир Јаковљевић, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија

Проф. др Марко Фолић, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација

Проф. др Драган Ђурић, члан, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија

У Крагујевцу, 07. 03. 2016.