

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-1177/36 од 07.12.2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др Жарка Мићовића** под називом:

“Функционалне, биохемијске и хистолошке промене у кардиоваскуларном систему пацова у условима акутне и субхроничне стимулације метионином“

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

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **Доц. др Владимир Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **Доц. др Милица Лабудовић-Боровић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан.

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **др Жарко Мићовић** 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

Потпуковник Др Жарко Мићовић је рођен 1962. године у Беранама, Црна Гора, где је и завршио основну и средњу школу. Медицински факултет у Београду уписао је 1981/1982. године, а завршио јануара 1987. године. Специјализацију из опште медицине завршио је са одличним успехом 1997. године на Медицинском Факултету Универзитета у Београду. Од 1987. до 1998. радио је у Дому здравља Нова Варош. Од 02. августа 1998. године Указом Председника СРЈ прима се у професионалну војну службу у чину капетана прве класе и распоређује на место лекара у Одељењу хитне помоћи Војног центра хитне помоћи и кућног лечења ЦВМУ Београд. Унапређен је у чин мајора 2002. а у чин потпуковника 2006. године. Постављен је за управника Центра хитне помоћи 2005. Године. Учесник је мировних мисија у ДР Конгу 2004., 2006., и 2010. године, као и у мисији Европске уније у Сомалији 2014. године као начелник санитета мисије. Тренутно ради у Управи за војно здравство Министарства одбране, на месту руководиоца групе за лечење и уједно заменик начелника Управе за војно здравство.

Докторске академске студије уписао је школске 20013/14. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу - област Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Усмени докторски испит положио је у јулу 2013. са оценом 8. Ужа област интересовања му је спортска медицина. Учествовао је на већем броју научних и стручних скупова у земљи и иностранству. Ожењен је и отац је двоје деце.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Функционалне, биохемијске и хистолошке промене у кардиоваскуларном систему пацова у условима акутне и субхроничне стимулације метионином “

Предмет: Познато је да акутно оптерећење метионином може изазвати оксидациони стрес, док хронично оптерећење метионином доводи до хиперхомоцистеинемije, посебно у условима инсуфицијенције фолне киселине, витамина В₆ и В₁₂. Полазећи од најновијих литературних података о утицају хиперметионинемije (и/или хиперхомоцистеинемije) у патогенези оксидативног стреса, атерогенези и канцеру, пошли смо од претпоставке да акутно и субхронично оптерећење метионином испољава одређене ефекте на

кардиоваскуларни систем, као и на неке од биохемијских, хемостатских и инфламаторних параметара у крви и ткивима пацова.

Хипотезе: Акутна интраперитонеална стимулација метионином може утицати на биомаркере оксидационог стреса и активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву срца пацова. Субхронична интраперитонеална стимулација метионином, у временском периоду од 3 недеље, може утицати на промену телесне масе, промене у вредностима хомоцистеина, витамина В₁₂ и фолне киселине у серуму, уз последично испољавање одређених ефеката на неке од биохемијских, хемостатских и инфламаторних параметара у серуму и плазми, као и на показатеље оксидационог стреса, активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву срца, и на хистоморфолошке карактеристике срца и аорте код пацова. Субхронична интраперитонеална стимулација метионином, са у литератури доказано протективним сумпоровитим аминокиселинама L-цистеином или N-ацетил-L-цистеином, у временском периоду од 3 недеље, може утицати на смањивање регистрованих нежељених ефеката изазваних субхроничним оптерећењем метионином.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, др Жарко Мићовић, је објавио рад у целини у часопису категорије M52, у коме је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву докторске дисертације.

Micovic Z, Stamenkovic A, Nikolic T, Stojanovic M, Scepanovic Lj, Hadzibegovic A, Obrenovic R, Vujosevic I, Stankovic S, Djuric M, Jakovljevic B, Djuric D. The effects of subchronic methionine overload administered alone or simultaneously with L-cysteine or N-acetyl-L-cysteine on body weight, homocysteine levels and biochemical parameters in the blood of male wistar rats. *Ser J Exp Clin Res* 2016; 17 (3): 215-223. **M52**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Сматра се да је акутно и хронично преоптерећење метионином веома токсично за различита ткива и органе, између осталих срце и јетру, при чему настаје оксидативни стрес, који је један од главних патогенетских механизма за настајње оштећења. Као резултат повећаног уноса метионина, повечава се концентрација хомоцистеина у крви, који је фактор ризика за настанак кардиоваскуларних обољења (укључујући исхемијску

болест срца, цереброваскуларне и друге васкуларне поремећаје, тромботична стања), хроничну бубрежну инсуфицијенцију, канцер, итд. Хиперхомоцистеинемија је вероватно укључена у патогенезу бројних болести како својим прооксидантним дејством, тако и оштећењем антиоксидативне заштите. У патолошким стањима у чијој је основи оксидациони стрес као молекуларни узрок болести, све више се спомиње терапија антиоксидационим средствима као могуће решење, али и суплементација аминокиселинама које садрже сумпор (L-цистеин, N-ацетил-L-цистеин). На ниво хомоцистеина у крви, такође, утиче суплементација сумпоровитим аминокиселинама, које могу знатно да умање продукцију слободних радикала или унапреде антиоксидативну заштиту. Да би се претходно наведено потврдило, пре свега на кардиоваскуларном систему, потребна су нова истраживања, јер постоје варијације у резултатима публикованих студија, разноликост експерименталних модела (врста модела, трајање експеримента, доза, облик испитиване супстанце), али и различити начини примене сумпоровитих аминокиселина.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања се огледа у новим сазнањима о улози сумпоровитих аминокиселина како у патогенези кардиоваскуларних поремећаја, тако и у њиховој евентуалној примени у превенцији ових обољења. Циљ ове студије би био да испита функционалне, биохемијске и хистолошке промене у кардиоваскуларном систему пацова у условима акутне и субхроничне стимулације метионином. У складу са овим општим циљем постављени су и следећи специфични циљеви:

1. Испитивање ефеката акутне стимулације метионином (акутна хиперметионинемија индукована интраперитонеалном апликацијом метионина) на параметре оксидативног стреса у плазми код пацова (ензими: каталаза - CAT, глутатион пероксидаза - GPx, супероксид дисмутаза - SOD, и индекс липидне пероксидације - малондиалдехид - MDA).
2. Испитивање ефеката акутне стимулације метионином (акутна хиперметионинемија индукована интраперитонеалном апликацијом метионина) на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву срца пацова.

3. Испитивање ефеката субхроничне стимулације метионином (субхронична хиперметионинемија индукована интраперитонеалном апликацијом метионина у току 3 недеље): а. на промене телесне масе пацова, б. биохемијске параметре у серуму пацова (хомоцистеин, фолна киселина, витамина В₁₂, глюкоза, уреа, креатинин, мокраћна киселина, капацитет за везивање гвожђа, гвожђе, укупни протеини, албумин, укупни холестерол, LDL, HDL, триглицериди, електролити, трансминазе, алкална фосфатаза, гама-глутамил трансфераза, амилаза, CRP), ц. хемостатске параметре у плазми пацова (фибриногена, D-димер и фон Вилебранд фактор), д. постојање хистоморфолошких промена у срцу и аорти пацова, е. на параметре оксидативног стреса у плазми код пацова (ензими: каталаза - CAT, глутатион пероксидаза - GPx, супероксид дисмутаза - SOD, и индекс липидне пероксидације-малондиалдехид - MDA) на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву срца пацова.
4. Испитивање ефеката истовремене субхроничне примене метионина са L-цистеином (индуковано интраперитонеалном апликацијом супстанци у току 3 недеље): а. на промене телесне масе пацова, б. биохемијске параметре у серуму пацова (хомоцистеин, фолна киселина, витамин В₁₂, глюкоза, уреа, креатинин, мокраћна киселина, капацитет за везивање гвожђа, гвожђе, укупни протеини, албумин, укупни холестерол, LDL, HDL, триглицериди, електролити, трансминазе, алкална фосфатаза, гама-глутамил трансфераза, амилаза, CRP), ц. хемостатске параметре у плазми пацова (фибриногена, D-димер и фон Вилебранд фактор), д. постојање хистоморфолошких промена у срцу и аорти пацова.
5. Испитивање ефеката истовремене субхроничне примене метионина са N-ацетил-L-цистеином (индуковано интраперитонеалном апликацијом супстанци у току 3 недеље): а. на промене телесне масе пацова, б. биохемијске параметре у серуму пацова (хомоцистеин, фолна киселина, витамин В₁₂, глюкоза, уреа, креатинин, мокраћна киселина, капацитет за везивање гвожђа, гвожђе, укупни протеини, албумин, укупни холестерол, LDL, HDL, триглицериди, електролити, трансминазе, алкална фосфатаза, гама-глутамил трансфераза, амилаза, CRP), ц. хемостатске параметре у плазми пацова (фибриногена, D-димер и фон Вилебранд фактор), д. постојање хистоморфолошких промена у срцу и аорти пацова.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Познато је да је метионин, као есенцијална и тиоаминска аминокиселина неопходна за мишићне контракције, синтезу хемоглобина, разградњу холестерола и масти, али и за синтезу креатинина и повећање мишићне масе. Са друге стране, преоптерећење метионином изазива повећање концентрације хомоцистеина, чија је улога у настајању кардиоваскуларних поремећаја предмет већег броја истраживања. Имајући у виду значај кардиоваскуларних обољења у савременом друштву, циљ предложеног истраживања је да испита функционалне, биохемијске и хистолошке промене у кардиоваскуларном систему пацова у условима акутне и субхроничне стимулације метионином, као и примену друге две сумпоровите аминокиселине које испољавају знатан антиоксидациони потенцијал.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

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

2.7.2. Популација која се истражује

У истраживању са акутном и субхроничном апликацијом метионина биће коришћени мужјаци пацова соја *Wistar albino* ($n=48$), почетне телесне масе око 100 г и старости 15-20 дана на почетку експеримента (виваријум Војномедицинске академије у Београду). Пацови се чувају појединачно или у пару у плексиглас-транспарентним кавезима са дном обложеним шушком, са храном и водом доступном ад либитум и константним амбијенталним условима (температура 21 ± 2 °C; влажност 55 ± 5 %; циклус светло-тама на 12ч са почетком светлог периода у 8:00 ч).

Истраживање је одобрено дана 28. 09. 2016. од стране Етичког одбора за заштиту добробити експерименталних животиња (одлука бр. 01-10333/1), Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, као и Етичког савета за заштиту добробити експерименталних животиња Републике Србије.

2.7.3. Узорковање

Истраживање ће бити спроведено акутно, али и током периода субхроничне апликације супстанци у трајању од 3 недеље, при чему ће животиње биле подељене у одговарајуће групе са по 8 животиња у појединачним групама (укупно 48 животиња). За акутне експерименте, животиње ће бити подељене у две групе, контролну групу (0,9% NaCl 0,1-0,2 ml/дан) ($n=8$) и групу стимулисану метионином (0,8 mmol/kg/тм/дан) ($n=8$) (MET група), којима ће се интраперитонеално администрирати одговарајуће супстанце. За субхроничне експерименте, животиње ће бити подељене у четири групе, којима ће се администрирати супстанце према следећој схеми: а) контролна група (0,9% NaCl 0,1-0,2 ml/дан) ($n=8$); б) метионин (0,8 mmol/kg тм/дан) ($n=10$) (MET група); в) метионин (0,8 mmol/kg/тм/дан) + L-цистеин (7 mmol/kg тм/дан) ($n=8$) (L-цис+MET група); г) метионин (0,8 mmol/kg тм/дан) + N-ацетил-L-цистеин (50 mmol/kg тм/дан) ($n=8$) (NAC+MET група).

2.7.4. Варијабле

Пре почетка, али и током истраживачког периода, све животиње ће бити под сталним мониторингом при чему ће се недељно пратити телесна маса сваке животиње. Након завршеног акутног (после 60 минута) или субхроничног третмана одговарајућим супстанцама, животиње ће бити жртвоване гиљотином за пацове, при чему ће се узимати узорци крви и ткива. Метода подразумева искрвављење животиње кроз стаклени левак у одговарајуће вакутајнере (напомена: због опсежне механичке трауме познато је да се применом ове методе очекују нешто више вредности одређених биохемијских параметара). Након прикупљања узорци крви треба да одстоје 15 минута на собној температури, а затим ће бити центрифугирани (15 минута на 3000 обртаја), и потом анализирани (плазма или серум).

Одређивање биохемијских параметара у серуму вршиће се спектрофотометријском методом, као и индиректном потенциометријском методом (натријум, калијум и хлор), док ће се С-реактивни протеин (CRP) одређивати имунотурбидиметријском методом (PETIA), комерцијалним китовима (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd., Frimley, Camberley UK) на аутоматском анализатору (Dimension Xpand, Siemens, Germany). У узорцима ће се одређивати вредности хомоцистеина пре почетка и на крају експеримента методом електрохеомолуминисценције (ECL, ADVIA Centaur XP System, Siemens

Healthcare GmbH, Erlangen, Germany), при чему је опсег референтних вредности Hcy <15 μ mol/L. Претходно наведеном методом и апаратом одређиваће се витамин B₁₂ и фолна киселина.

Из еритроцита ће се спектрофотометријском методом одређивати активност ензима каталазе (CAT), глутатион пероксидазе (GPx), супероксидне дисмутазе (SOD), као и продукти липидне пероксидације (малондиалдехид, MDA). Специфична активност ацетилхолинестеразе (AChE) у ткивном хомогенату срца би се одређивала *in vitro* спектрофотометријски методом по *Ellman*-у.

За морфолошку, морфометријску и имунохистохемијску анализу биће коришћено ткиво аорте и срца. Исечци аорте биће бојени селективним методама за бојење еластичних влакана: *Weigert van Gieson*-овим бојењем са резорцин фуксином, *Voerhoff van Gieson*-овим бојењем и бојењем по *Pinkus*-у са киселим орцеином. Исечци срца биће бојени следећим техникама: хематоксилином и еозином, РТАН методом, *Masson*-овим трихромним бојењем, *Heidehain Mallory Azan* бојењем, *Mallory* бојењем за колагена влакна и *Van Giesonov*-ом методом за бојење колагених влакана, као и методом за селективно бојење ретикулинских влакана.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на претходно публикованим резултатима. 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. Узимајући у обзир резултате ове студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 48 (односно по 8 животиња у свакој групи).

2.7.6. Статистичка обрада података

За статистичку обраду резултата ће бити коришћен статистички програм *SPSS 18.0 for Windows*. Од метода аналитичке статистике за поређење нумеричких обележја посматрања између две групе користиће се т-тест у случају нормалне расподеле података, или Mann-Whitney тест у случају расподеле података различите од нормалне. За поређење просечних вредности параметарских обележја користиће се анализа варијансе (ANOVA) као и

непараметарска варијанта теста по Kruskal-Wallis у зависности од расподеле података. Сви добијени резултати биће приказани табеларно или графички. Вредност $p < 0,05$ сматраће се статистички значајном, вредност $p < 0,01$ високо значајном.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Резултати ове студије би помогли у бољем разумевању многобројних и комплексних ефеката којима метионин делује на кардиоваскуларни систем човека. Научна тежина истраживања лежи у чињеници да би се обухватиле како функционалне промене у крви, срцу и аорти, тако и хистолошке. Поред тога, праћењем динамике биохемијских параметара крви и маркера оксидационог стреса омогућило би се разјашњење добијених морфо-функционалних промена под утицајем метионина. Праћење нивоа хомоцистеина и стандардних биохемијских параметара у крви представља темељ у анализи и одличну смерницу при разликовању токсичних од нетоксичних доза унетог метионина.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Хомоцистеин можемо издвојити као најпоузданији маркер за процену пре свега метионинског вишка као сурогат маркера, али и за процену постојања метаболичких поремећаја. Поред тога, суплементација НАС-ом и L-цистеином као антиоксидационим и антиинфаматорним средствима, може да има важну клиничку примену, међутим опсежнија будућа клиничка испитивања морају потврдити ова сазнања. Сва сазнања која проистекну из ове студије несумњиво могу да буду од клиничког значаја у смислу осмишљавања евентуалних терапијских смерница у условима хиперметионинемije, али и хиперхомоцистеинемije.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже проф. др Драган М. Ђурић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија.

Проф. др Драган М. Ђурић 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 проф. др Драгана М. Ђурића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Rasic-Markovic A, Hrcic D, Krstic D, Colovic M, Djuric E, Rankov-Petrovic B, Susic V, Stanojlovic O, **Djuric D**. The effect of subchronic supplementation with folic acid and l-arginine on homocysteine-induced seizures. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016; 94(10):1083-1089.
2. Hrcic D, Mikić J, Rasic-Markovic A, Velimirović M, Stojković T, Obrenović R, Rankov-Petrović B, Šušić V, **Djuric D**, Petronijević N, Stanojlovic O. Anxiety-related behavior in hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload in rats: role of the brain oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016; 94(10):1074-1082.
3. Mladenović D, Petronijević N, Stojković T, Velimirović M, Jevtić G, Hrnčić D, Radosavljević T, Rašić-Marković A, Maksić N, **Djuric D**, Stanojlović O. Finasteride Has Regionally Different Effects on Brain Oxidative Stress and Acetylcholinesterase Activity in Acute Thioacetamide-Induced Hepatic Encephalopathy in Rats. *PLoS One*. 2015; 10(8):e0134434.
4. Rasic-Markovic A, Rankov-Petrovic B, Hrcic D, Krstic D, Colovic M, Macut Dj, **Djuric D**, Stanojlovic O. The effect of subchronic supplementation with folic acid on homocysteine induced seizures. *Acta Physiol Hung*. 2015; 102(2):151-62.
5. Radenković M, **Djurić D**, Janković R, Prostran M. The analysis of transduction mechanisms associated with an acute action of homocysteine on isolated rat femoral artery. *Acta Physiol Hung*. 2014; 101(4):448-60.
6. Hrnčić D, Rašić-Marković A, Stojković T, Velimirović M, Puškaš N, Obrenović R, Macut D, Sušić V, Jakovljević V, **Djuric D**, Petronijević N, Stanojlović O. Hyperhomocysteinemia induced by methionine dietary nutritional overload modulates acetylcholinesterase activity in the rat brain. *Mol Cell Biochem*. 2014; 396(1-2):99-105.
7. Zivkovic V, Jakovljevic V, Pechanova O, Srejovic I, Joksimovic J, Selakovic D, Barudzic N, **Djuric DM**. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: the role of different gasotransmitters. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:318471.
8. Aleksic D, Djokic D, Golubicic I, Jakovljevic V, **Djuric D**. The importance of the blood levels of homocysteine, folic acid and vitamin B12 in children with malignant diseases. *J BUON*. 2013; 18(4):1019-25.
9. Hrnčić D, Rašić-Marković A, Macut D, Šušić V, **Djuric D**, Stanojlović O. Homocysteine thiolactone-induced seizures in adult rats are aggravated by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Hum Exp Toxicol*. 2014; 33(5):496-503.

10. Zivkovic V, Jakovljevic V, Djordjevic D, Vuletic M, Barudzic N, **Djuric D**. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem*. 2012; 370(1-2):59-67.

4. Научна област дисертације

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

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **Доц. др Владимир Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **Доц. др Милица Лабудовић-Боровић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан.

Закључак и предлог комисије

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, др Жарко Мићовић, 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 др Жарка Мићовића, под називом **“Функционалне, биохемијске и хистолошке промене у кардиоваскуларном систему пацова у условима акутне и субхроничне стимулације метионином“** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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

2. **Доц. др Владимир Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан

3. **Доц. др Милица Лабудовић-Боровић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан

У Крагујевцу, 12. 12. 2016. године