

Гр. бр.	05. 12. 19
Ср.	05 15403/2-2

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-03-910/36 од 13.11.2019. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Марка Равића** под називом:

**„Ефекти агониста рецептора за пептид сличан глукагону-1 на
исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца пацова са метаболичким
синдромом“**

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

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

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Марко Равић** 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

Марко Равић је рођен 02.10.1990. године у Крагујевцу, Република Србија. Завршио је Средњу медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић“ у Крагујевцу 2009. године. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао школске 2009/2010. године, а завршио 05.07.2016. године са просечном оценом 8,28. Од 2016. године активно се бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Од фебруара 2017. године запослен је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу као сарадник у настави, а од фебруара 2019. године као асистент за ужу научну област Клиничка фармација. Студент је треће године докторских академских студија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје – Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Положио је све програмом предвиђене испите на прве две године докторских академских студија као и усмени докторски испит

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Ефекти агониста рецептора за пептид сличан глукагону-1 на исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца пацова са метаболичким синдромом“

Предмет: Испитивање утицаја примене агониста рецептора за пептид сличан глукагону-1 на исхемијско оштећење и реперфузиону повреду миокарда пацова са метаболичким синдромом.

Хипотезе:

- Биохемијским и квантитативним анализама ће се потврдити повољан утицај шестонедељне примене агониста рецептора за GLP-1 на патогенезу метаболичког синдрома.
- Агонисти рецептора за GLP-1 ће након шестонедељне примене показати антиоксидациона својства код пацова са метаболичким синдромом.
- Агонисти рецептора за GLP-1 ће показати кардиопротективне ефекте на исхемијско-реперфузиону повреду изолованог срца пацова са метаболичким синдромом.
- Хистолошким анализама ће се верификовати протективни ефекти агониста рецептора за GLP-1 код пацова са метаболичким синдромом.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Марко Равић, је објавио рад у целини у часопису категорије M51, у коме је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву теме докторске дисертације.

1. **Ravic M, Jakovljevic V, Ristic P, Srejovic I, Vranic A, Babic G, Bolevich S.** The effects of valsartan on cardiac function and pro-oxidative parameters in the streptozotocin-induced diabetic rat heart. Ser J Exp Clin Res. 2018. doi: 10.2478/SJECR-2018-0049.

M51

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Метаболички синдром је скуп међусобно повезаних поремећаја који обухватају хипертензију, дислипидемију, хипергликемију, инсулинску резистенцију и гојазност. Као такав представља један од значајних здравствених проблема данашњице који погађа бројну популацију широм света. Метаболички синдром је повезан са ризиком од развоја *diabetes mellitus* тип 2, инфаркта миокарда, атеросклерозе и бројних других кардиоваскуларних компликација. Бројне студије све више наглашавају да је метаболички синдром повезан са оксидационим стресом, али да ли неравнотежа између производње и отклањања реактивних кисеоничних врста долази као последица или је то узрок

метаболичког синдрома још увек није јасно. Због свега наведеног, од великог је значаја пронаћи и применити одговарајуће лекове који би помогли у лечењу метаболичког синдрома и превенцији наведених кардиоваскуларних компликација.

Упркос бројним доступним лековима, савремени водичи издвајају агонисте рецептора за пептид сличан глукагону – 1 (енгл. *glucagon like peptid*, GLP-1) као камен темељац у терапији гојазних пацијената са дијабетесом тип 2.

2.5. Значај и циљ истраживања

Имајући у виду социоекономски значај гојазности и дијабетеса, значај истраживања се огледа у испитивању ефеката примене GLP-1 агониста, као кључних лекова у терапији метаболичког синдрома и дијабетеса тип 2, на исхемијско/реперфузионо оштећење миокарда код пацова са метаболичким синдромом.

Циљеви истраживања су:

1. Испитати и упоредити утицај шестонедељне примене различитих агониста рецептора за GLP-1 на патогенезу метаболичког синдрома.
2. Испитати ефекте различитих агониста рецептора за GLP-1 на системске параметре оксидационог стреса пацова са метаболичким синдромом.
3. Евалуација и компарација ефеката хроничне примене различитих агониста рецептора за GLP-1 на исхемијско-реперфузиону повреду изолованог срца пацова са метаболичким синдромом.
4. Хистолошка верификација ефекта шестонедељне примене различитих агониста рецептора за GLP-1 на морфолошке особине миокарда, панкреаса, јетре и аорте пацова код којих је индукован метаболички синдром.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Агонисти рецептора за GLP-1 у које се убрајају лираглутид, ексенатид, дулаглутид, семаглутид, не само да побољшавају регулацију гликемије, дислипидемије и хипертензије, већ постоје и бројне спекулације да показују позитивне ефекте на ендотелну функцију,

коронарну исхемију и инфаркт миокарда. Поред тога новије студије су показале њихова антиоксидациона, неуропротективна и нефропротективна дејства.

GLP-1 је дериват који настаје посттранслационом обрадом прекурсора проглукагона, а код човека његов главни извор су L ћелије слузнице црева. Биолошки активне форме које произилазе из селективног пресецања молекула проглукагона су: GLP-1-(7-37) и GLP-1-(7-36). Физиолошка улога GLP-1 је да стимулише биосинтезу проинсулина (транскрипцију гена за инсулин), пролиферацију и неогенезу бета ћелија ендокриног панкреаса, да зависно од глукозе стимулише секрецију инсулина, инхибира секрецију глукагона, смањи мотилитет и пражњење желуца, као и да испољава „инсулиномиметско“ дејство на јетру, мишиће и масно ткиво. Поред наведених ефеката GLP-1 има и многобројне екстрапанкреатичке метаболичке учинке. Узимајући у обзир да се рецептори за GLP-1 налазе и на другим органима као што су срце, бубрег, јетра и плућа GLP-1 и његови агонисти су често предмет бројних истраживања.

Резултати неколико студија указују на терапијски учинак појединих агониста рецептора за GLP-1 на метаболички синдром, међутим њихови ефекти у погледу прекондиционирања још увек нису довољно испитани.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Хронична, експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vivo* и *ex vivo*.

2.7.2. Популација која се истражује

Експерименти ће се спровести у складу са одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за употребу лабораторијских животиња у експериментима као и 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.

Истраживање ће се спровести на 50 пацова, *Wistar albino* соја, мушког пола, старости 4 недеља (просечне телесне масе око 150 g) којима ће бити индукован метаболички синдром.

Пацове бисмо разврстали у 5 група, у зависности од примењеног лека.

Индукција метаболичког синдрома

Метаболички синдром се индукује код свих пацова, тако што ће животиње бити подвргнуте дијети са високим садржајем масти током 4 недеље, након чега ће се интраперитонеално апликовати стрептозотоцин у дози од 25 mg/kgТТ, који ће бити растворен у 1 ml 0,05 М цитратног пуфера (pH=4,5). Пацови који након 48 до 72 часова од инјекције стрептозотоцина имају хипертензију (преко 140/85 mmHg), хиперинсулинемију наше (преко 150 μ LU/ml), хипергликемију наше (преко 7 mM) ће бити укључени у студију као пацови са метаболичким синдромом.

Хронична примена агониста рецептора за GLP-1

Током 6 недеља пацовима ће се једном дневно субкутано апликовати лираглутид 0.3 mg/kg, ексенатид 5 μ g/kg, семаглутид 0,3 mg/kg, дулаглутид 1,5 mg/kg (2 пута недељно).

Акутни протокол на Langendorff-овом апарату

Након окончања планираних експерименталних процедура животиње ће се жртвовати, а изолована срца пацова ће бити перфундована методом ретроградне перфузије по Langendorff-у (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*) при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH₂O. Протокол подразумева да се срца пацова одмах након стабилизације подвргну глобалној исхемији у трајању од 30 минута, а потом реперфузији у трајању од 60 минута.

2.7.3. Узорковање

Свим животињама ће се према претходно наведеном протоколу индуковати метаболички синдром, након потврде метаболичког синдрома биће апликован одговарајући лек током 6 недеља:

1. Физиолошки раствор-контролна група (КМ)
2. Лираглутид 0,2 mg/kg – (ЛМ)
3. Ексенатид 5 μ g/kg – (ЕМ)
4. Семаглутид 0,3 mg/kg – (СМ)
5. Дулаглутид 1,5 mg/kg (2 пута недељно) – (ДМ)

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Током експерименталног периода на недељном нивоу биће праћена телесна тежина, гликемија и израчунаван индекс телесне тежине.

Један дан пре жртвовања, животињама ће се урадити ултразвук срца да би се испитали кардиодинамски параметри срчаног мишића, а непосредно пре жртвовања животињама ће се узимати крв и одређивати вредности триглицерида, холестерола, гликемије, инсулина и параметри оксидационог стреса (индекс липидне пероксидације - TBARS, нитрити - NO_2^- , супер оксид анион радикал - O_2^- , водоник пероксид - H_2O_2 , каталаза - CAT, супер оксид дизмутаза - SOD, глутатион - GSH). *Tail-cuff* методом ће се мерити крвни притисак

Након интраперитонеално примењеног анестетика (кетамин-ксилазин у дози од 100mg/kg-10mg/kg) пацови ће се жртвовати, након чега ће се изоловано срце поставити на *Langendorff*-ов апарат. Уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле ће се омогућити убацивање сензора (*transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary*) у леву комору ради директног и континуираног праћења функције леве коморе: dp/dt max - максимална стопа промене притиска у левој комори, dp/dt min - минимална стопа промене притиска у левој комори, SLVP - систолни притисак леве коморе, DLVP - дијастолни притисак леве коморе и HR - срчана фреквенца. Вредности коронарног протока ће се одређивати флоуметријски.

Током трајања протокола на *Langendorff*-у, прикупљаће се коронарни венски ефлуент, при чему ће тачке од интереса бити: стабилизација, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45 и 60. минут реперфузије. Из прикупљеног коронарног венског ефлента биохемијским методама ће се одређивати параметри оксидационог стреса TBARS, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2 .

Након завршетка протокола на *Langendorff*-овом апарату, исечци ткива срца ће се користити за патохистолошку анализу. У тренутку жртвовања исечци ткива јетре, панкреаса и аорте ће се узимати за патохистолошку хематоксилин/еозин анализу.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Укупни узорак је прорачунат на основу резултата претходно објављене студије. 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 *G-power*. На основу резултата наведене студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 50 (5 група по 10 животиња у свакој групи).

2.7.6. Статистичка обрада података

Статистичка обрада резултата подразумева употребу програма *SPSS 21.0 for Windows*:

1. 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.
2. За испитивање нормалности расподеле користиће се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapir Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
3. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће 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

На основу досадашњих литературних података, очекује се да хронична примена агониста рецептора за GLP-1 оствари антиоксидационе и кардиопротективне ефекте, односно омогући бољи одговор срца на исхемијско-реперфузиону повреду, као и да допринесе бољој контроли метаболичког синдрома.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

С обзиром да су ефекти агониста рецептора за GLP-1 на метаболички синдром још увек у потпуности неистражени, резултати ове студије могли би да пруже детаљније информације о потенцијалним механизмима којима агонисти рецептора за GLP-1 остварују своје кардиопротективне и антиоксидационе ефекте. Увођење агониста рецептора за GLP-1 у терапију пацијената са ризиком од исхемијске болести срца може

потенцијално да побољша исход код оваквих пацијената, чиме би се побољшало лечење знатне популације болесника, уз евентуално смањење трошкова.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже доц. др Иван Срејовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.

Доц. др Иван Срејовић 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 Ивана Срејовића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Nikolic TR, Zivkovic VI, **Srejovic IM**, Radovanovic DS, Jeremic NS, Jevdjevic MD, Djuric DM, Jakovljevic VL. Acute effects of nandrolone decanoate on cardiodynamic parameters in isolated rat heart. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94(10):1048-1057.
2. Stojanovic M, Zivkovic V, **Srejovic I**, Jakovljevic V, Jeremic N, Djuric D. The role of hydrogen sulfide in homocysteine-induced cardiodynamic effects and oxidative stress markers in the isolated rat heart. *Physiol Int*. 2016;103(4):428-438.
3. Stojic I, **Srejovic I**, Zivkovic V, Jeremic N, Djuric M, Stevanovic A, Milanovic T, Djuric D, Jakovljevic V. The effects of verapamil and its combinations with glutamate and glycine on cardiodynamics, coronary flow and oxidative stress in isolated rat heart. *J Physiol Biochem*. 2017; 73:141–153.
4. Ristic P, **Srejovic I**, Nikolic T, Stojic I, Ristic D, Zivkovic V, Jakovljevic VL. The effects of zofenopril on cardiac function and pro-oxidative parameters in the streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem*. 2017;426(1-2):183-193.
5. Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, **Srejovic I**, Zivkovic V, Tatalović N, Orescanin-Dusic Z, Mitrovic S, Ilic M, Jakovljevic V. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced

changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. Toxicol Lett. 2016;242:34-46.

6. Bradic J, Petkovic A, Simonovic N, Radovanovic M, Jeremic J, Zivkovic V, Mitrovic S, Bolevich S, Jakovljevic V, Sretenovic J, **Srejovic I**. Preconditioning with hyperbaric oxygen and calcium and potassium channel modulators in the rat heart. Undersea Hyperb Med. 2019;46(4):483-494.

4. Научна област дисертације

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

5. Научна област чланова комисије

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

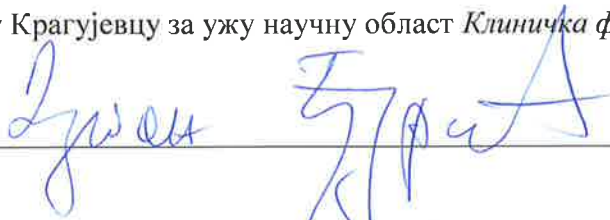
ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Марко Равић, 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.

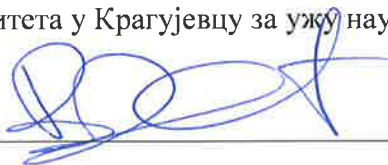
Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Марка Равића, под називом „Ефекти агониста рецептора за пептид сличан глукAGONУ-1 на исхемијско/реперфузиону повреду изолованог срца пацова са метаболичким синдромом“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Душан Ђурић, редовни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник



Проф. др Владимир Живковић, ванредни професор Факултета медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан



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



У Крагујевцу, 24.11.2019. године