

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 05.07.2022. godine, broj 11/VII-3/2-SM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Efekti vitamina B6 i folne kiseline na kardiovaskularni sistem pacova sa dijabetes melitusom indukovanim streptozotocinom“

kandidata dr Slavice Mutavdžin Krneta, zaposlene na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu. Mentor je Prof. dr Dragan Đurić, a komentor Prof. dr Milica Labudović Borović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Branislav Milovanović, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Kristina Gopčević, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Slavice Mutavdžin Krneta napisana je na ukupno 197 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 12 tabela, 60 grafikona i 38 slika, pri čemu su prve 4 slike preuzete i prevedene iz naučne literature koja je regularno citirana u tekstu i u spisku referenci. Doktorska disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, spisak skraćenica korišćenih u tekstu, biografiju kandidata, izjavu o autorstvu, izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i izjavu o korišćenju.

U **uvodu** je definisano šta je dijabetes melitus tip 1, njegova epidemiologija, postavljanje dijagnoze, patogeneza, komplikacije, kao i lečenje dijabetes melitusa tipa 1. Opisan je pojam dijabetične kardiomiopatije, i njen razvoj od subkliničkih promena do klinički manifestne srčane insuficijencije, koja može biti praćena srčanim remodelovanjem i disfunkcijom, inflamacijom miokarda i srčanim oksidativnim stresom. Takođe, dati su podaci o prevenciji srčane kardiomiopatije. Nakon toga detaljno je opisan pojam oksidativnog stresa, uloga slobodnih radikala i antioksidativna zaštita, kao i povezanost oksidativnog stresa i dijabetes melitusa. Potom su opisani vitamin B6 i folna kiselina, njihova uloga, antioksidativna dejstva, i povezanost nedostatka ovih vitamina sa različitim oboljenjima. Na kraju uvoda, opisani su različiti animalni modeli dijabetes melitusa tipa 1, kao što su hemijski indukovani, spontani autoimuni, genetski, virusima i hirurški indukovani modeli. U uvodnom delu je postavljena dobra osnova zadatim ciljevima ove doktorske disertacije detaljnim prikazom relevantnih informacija i opisom poznatih činjenica o dijabetes melitusu i uticaju vitamina B6 i folne kiseline na dijabetes melitus, kardiovaskularni sistem i oksidativni stres.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od potvrde animalnog modela dijabetes melitusa ispitivanjem niva glukoze i insulina u serumu i računanjem homeostaznog modela za procenu insulinske rezistencije (HOMA-IR) i imunohistohemijskim bojenjem tkiva pankreasa na insulin. Cilj je bio i da se ispita uticaj dijabetes melitusa i primene piridoksina i folne kiseline, pojedinačno i udruženo, kod zdravih, i kod pacova sa dijabetes melitusom na parametre u serumu i plazmi, kao što su koncentracija glukoze, homocisteina (Hcy), uree, kreatinina, ukupnih proteina i albumina, parametri lipidnog profila [ukupni holesterol (TC), holesterol lipoproteina niske gustine (LDL-C), holesterol lipoproteina visoke gustine (HDL-C), trigliceridi (TG), aterosklerotski indeks (AI) i aterogenetski indeks seruma (AIS)], aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), α -amilaze (α -AMY), alkalne fosfataze (ALP) i laktat dehidrogenaze (LDH), koncentracija troponina T (hs cTnT), fibrinogena i aktivnost fon Vilebrandovog faktora (*von Willebrand factor* – vWF). Dalji ciljevi su bili da se u tkivu srca pacova odrede parametri oksidativnog stresa [enzimi: katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD), i indeks lipidne peroksidacije – koncentracija malondialdehida (MDA)], aktivnosti LDH i malat dehidrogenaze (MDH) i distribucija i relativne aktivnosti njihovih izoformi i da se proceni remodelovanje srčanog tkiva merenjem relativnih aktivnosti matriksnih metaloproteinaza (MMP) -2 i -9, kao i da se ispitaju strukturne karakteristike srca [određivanjem histomorfoloških promena u srcu – debljina zida leve komore (LK), zida desne komore (DK), interventrikularnog septuma (IVS) i transferzalni prečnik kardiomiocita (KM) na nivou jedra u zidu LK], aorte (debljina intime medije, broj elastičnih lamina i prosečno rastojanje između elastičnih lamina) i pankreasa (broj Langerhansovih ostrvaca po mm² površine tkiva pankreasa, dijametar i površina

Langerhansovih ostrvaca, broj ćelija u Langerhansovim ostrvcima i broj ćelija po mm² površine Langerhansovih ostrvaca) i imunohistohemijska ekspresija pokazatelja proliferativne aktivnosti [Ki67 i PCNA (nuklearni antigen za proliferaciju ćelija – eng. *proliferating cell nuclear antigen*)] i apoptoske aktivnosti (BCL2 i BCL6) u KM.

U poglavlju **materijal i metode** je jasno opisan eksperimentalni protokol u kom su korišćeni mužjaci pacova soja *Wistar* albino koji su na početku eksperimenta bili starosti 25-30 dana i telesne mase oko 160 g. Eksperimentalne životinje su nabavljane iz akreditovanog vivarijuma u Beogradu i čuvane su u parovima u pleksiglas-transparentnim kavezima pod konstantnim ambijentalnim uslovima. Navedeno je da je istraživanje odobrila Etička komisija za dobrobit eksperimentalnih životinja, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za veterinu, Republika Srbija (rešenje broj: 323-07-01339/2017-05/04), kao i da su svi eksperimentalni postupci izvedeni u skladu sa propisanim zakonom (EU direktiva za zaštitu kičmenjaka koji se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe 86/609/EES) i etičkim principima. Jasno su definisane testirane grupe kojih je bilo 9. Dijabetes melitus je kod eksperimentalnih životinja indukovao i.p. injekcijom sveže pripremljenog STZ (100 mg/kg telesne mase), rastvorenog u fiziološkom rastvoru (0,9% NaCl, 1 ml/kg telesne mase). Pre početka studije i tokom istraživačkog perioda koji je trajao četiri nedelje životinje su bile pod stalnim praćenjem, pri čemu je nedeljno merena telesna masa i koncentracija glukoze u krvi svih životinja. Dat je detaljan opis određivanja biohemijskih parametara u serumu i plazmi. Opisano je određivanje kardiosomatskog indeksa i priprema uzoraka tkiva srca. Jasno su opisana merenja vršena metodom spektrofotometrije, kao što su aktivnosti antioksidativnih enzima (CAT i SOD), koncentracija MDA, aktivnosti LDH i MDH. Nakon toga je opisano određivanje parametara u tkivu srca pacova metodom elektroforeze. Ovom metodom su određene distribucija i relativne aktivnosti izoformi LDH i MDH i MMP-2 i MMP-9. Potom je precizno opisan proces pripreme tkiva za analizu svetlosnim mikroskopom, histološka i morfometrijska analiza, kao i imunohistohemijska analiza uzoraka tkiva srca i pankreasa. Na kraju ovog poglavlja opisane su metode statističke analize.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 612 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate, kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „ **Efekti vitamina B6 i folne kiseline na kardiovaskularni sistem pacova sa dijabetes melitusom indukovanim streptozotocinom** “, autora dr Slavice Mutavdžin Krneta, konstatujemo da utvrđeno podudaranje teksta iznosi 13%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je navođenja citata, ličnih imena, mernih jedinica, rečenica koje se uobičajeno koriste u opisivanju rezultata, u opisu metodologije, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njene disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18). Pojedinačno podudaranje sa upoređivanim tekstovima ne prelazi 2 %.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Dobijeni rezultati ovog istraživanja pokazuju da je nakon primene streptozotocina (STZ) i indukcije dijabetes melitusa (grupa DM) u odnosu na kontrolnu grupu (C1) došlo do značajnog porasta koncentracije glukoze i smanjenja nivoa insulina u serumu, kao i povećanja HOMA-IR. Pokazano je smanjenje telesne mase i povećanje kardiosomatskog indeksa. Primena STZ nije uticala na koncentraciju Hcy i aktivnost LDH, smanjila je koncentraciju hs cTnT i fibrinogena, a povećala aktivnost vWF. STZ je povećao nivoe svih parametara lipidnog profila, TC, HDL-C, LDL-C i TG u serumu, kao i pokazatelja aterosklerotskog rizika, AIS i AI. Pokazano je povećanje aktivnosti hepatičnih enzima (AST, ALT i ALP), kao i α -AMY, i smanjenje koncentracije ukupnih proteina i albumina u serumu, koncentracija uree je bila povišena, kreatinina snižena, a urinske kiseline nepromenjena nakon primene STZ. U homogenatu srčanog tkiva pokazano je povećanje oba merena antioksidativna enzima (SOD i CAT), dok se koncentracija MDA nije razlikovala pri poređenju vrednosti u DM i C1 grupi, nije bilo razlika ni u aktivnosti LDH, a aktivnost MDH je bila povećana. U tkivu srca svih eksperimentalnih životinja detektovane su četiri LDH izoforme (LDH-1, LDH-2, LDH-3 i LDH-4) i tri MDH izoforme [mitohondrijalna (mMDH), citosolna (cMDH), peroksizomalna (pMDH)]. Primena STZ je bila praćena smanjenjem aktivnosti LDH-1 i povećanjem aktivnosti LDH-3 i LDH-4, kao i smanjenjem aktivnosti cMDH i povećanjem aktivnosti pMDH. U homogenatu srčanog tkiva proMMP-2 bila je uočena i u C1 i DM grupi, dok je aMMP-2 bila uočena samo u DM grupi, aMMP-9 je postojala i u C1 i DM grupi. Primena STZ je bila praćena povećanjem relativne aktivnosti proMMP-2 i smanjenjem aktivnosti aMMP-9. Nakon primene STZ uočeno je smanjenje debljine IVS, dok uticaja na ostale

histomorfometrijske parametre srca nije bilo. Primena STZ i dijabetes melitus nisu uticali na histomorfometrijske parametre aorte, smanjili su broj Langerhansovih ostrvaca po mm² površine tkiva pankreasa, i nisu uticali na ostale histomorfometrijske parametre pankreasa. Nakon imunohistohemijskog bojenja na insulin u grupi DM uočen je značajno manji broj insulin pozitivnih Langerhansovih ostrvaca. Nakon primene STZ pozitivnost BCL2 i BCL6 nije uočena ni u jednoj ćeliji, pozitivnost Ki67 je uočena u pojedinim ćelijama srčanog tkiva bez postojanja statistički značajne razlike između grupa DM i C1, dok je pozitivnost PCNA je bila statistički značajno manja u zidu LK, DK i IVS u grupi pacova sa DM u poređenju sa C1 grupom. Kod pacova sa indukovanim dijabetes melitusom, primena piridoksina nije uticala na koncentraciju glukoze u serumu, telesnu masu, kardiosomatski indeks, koncentraciju Hcy, aktivnost LDH, koncentraciju hs cTnT i fibrinogena, kao ni na aktivnost vWF. Uočeno je smanjenje koncentracije HDL-C i povećanje AI, a na ostale parametre lipidnog profila TC, LDL-C, TG, kao i na AIS primena piridoksina nije uticala. Pokazano je smanjenje aktivnosti enzima jetre (AST, ALT i ALP), kao i α -AMY, međutim nije bilo uticaja na koncentraciju ukupnih proteina i albumina, uree i urinske kiseline, a koncentracija kreatinina u serumu je bila povišena. U homogenatu srčanog tkiva pokazano je da je primena piridoksina kod pacova sa dijabetes melitusom dovela do smanjenja aktivnosti CAT i nije uticala na aktivnost SOD, kao ni na koncentraciju MDA. Takođe, nije bilo razlika u aktivnosti LDH, a došlo je do smanjenja aktivnosti MDH. Primena piridoksina je bila praćena povećanjem aktivnosti LDH-1 i smanjenjem aktivnosti LDH-3 i LDH-4, kao i smanjenjem pMDH i povećanjem mMDH aktivnosti. U homogenatu srčanog tkiva u kod pacova sa dijabetes melitusom tretiranih piridoksinom je pored aMMP9 postojao aMMP-2 oblik, dok proMMP-2 oblik nije bio uočen. Primena piridoksina je povećala aktivnost aMMP-2 i aMMP-9. Nije bilo uticaja primene piridoksina na histomorfometrijske parametre srca, pozitivnost BCL2, BCL6 i Ki-67 nije uočena ni u jednoj ćeliji, a primena piridoksina nije uticala na pozitivnost PCNA u LK, DK i IVS. Kod pacova sa indukovanim dijabetes melitusom primena folne kiseline je značajno smanjila koncentraciju glukoze u serumu, nije uticala na telesnu masu, kardiosomatski indeks, Hcy, LDH, hs cTnT i vWF, a povećala je koncentraciju fibrinogena. Primena folne kiseline je smanjila koncentraciju TC, HDL-C i TG, i povećala koncentraciju LDL-C i AI, a nije uticala na AIS. Pokazano je smanjenje aktivnosti ALP, međutim nije bilo uticaja na aktivnosti AST, ALT i α -AMY, kao i na koncentraciju ukupnih proteina i albumina u serumu. Uočeno je povećanje koncentracije uree i kreatinina u serumu, ali nije bilo uticaja na koncentraciju urinske kiseline. U homogenatu srčanog tkiva pokazano je da je primena folne kiseline kod pacova sa dijabetes melitusom dovela do smanjenja aktivnosti oba antioksidativna enzima (CAT i SOD), a nije bilo uticaja na koncentraciju MDA, i aktivnost LDH, takođe, došlo je do smanjenja aktivnosti MDH. Primena folne kiseline je bila praćena povećanjem aktivnosti

LDH-1 i LDH-2 i smanjenjem aktivnosti LDH-3 i LDH-4, kao i smanjenjem aktivnosti pMDH. U homogenatu srčanog tkiva pacova sa dijabetes melitusom tretiranih folnom kiselinom uočene su proMMP-2 i aMMP-9. Primena folne kiseline kod pacova sa DM je smanjila aktivnost proMMP-2 i povećala aktivnost aMMP-9. Nije bilo uticaja primene folne kiseline na histomorfometrijske parametre srca. Nakon primene folne kiseline pozitivnost BCL2, BCL6 i Ki-67 nije uočena ni u jednoj ćeliji. Primena folne kiseline nije uticala na pozitivnost PCNA u LK, DK i IVS. Kod pacova sa dijabetes melitusom udružena primena piridoksina i folne kiseline nije uticala na koncentraciju glukoze u serumu, telesnu masu i kardiosomatski indeks. Uočeno je povećanje hs cTnT, dok uticaja na Hcy, LDH, fibrinogen i vWF nije bilo. Udruženi tretman piridoksinom i folnom kiselinom je smanjio TC, HDL-C i TG, povećao AI, a na HDL-C i AIS nije uticao. Pokazano je smanjenje aktivnosti enzima jetre (AST, ALT i ALP), α -AMY, i povećanje koncentracije albumina, nije bilo uticaja na koncentraciju ukupnih proteina, uree i urinske kiseline, ali je postojalo povećanje koncentracije kreatinina u serumu. U homogenatu srčanog tkiva pokazano je da je udružena primena piridoksina i folne kiseline kod pacova sa dijabetes melitusom dovela do smanjenja aktivnosti oba antioksidativna enzima (CAT i SOD), a nije uticala na koncentraciju MDA, i na ukupne aktivnosti LDH i MDH. Primena piridoksina i folne kiseline je bila praćena povećanjem aktivnosti LDH-1 i smanjenjem aktivnosti LDH-3 i LDH-4, kao i smanjenjem pMDH. U homogenatu srčanog tkiva u DM+FA grupi uočene su proMMP-2 i aMMP-9. Primena piridoksina i folne kiseline kod pacova sa DM je smanjila aktivnost proMMP-2 i povećala aktivnost aMMP-9. Kod pacova sa DM primena piridoksina i folne kiseline je dovela do smanjenja IVS, dok na ostale histomorfometrijske parametre srca nije bilo uticaja. Nakon udružene primene piridoksina i folne kiseline pozitivnost BCL2, BCL6 i Ki-67 nije uočena ni u jednoj ćeliji. Primena piridoksina i folne kiseline je značajno povećala pozitivnost PCNA u LK, a u DK i IVS nije uticala na pozitivnost PCNA.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Na kraju eksperimentalnog perioda u grupama tretiranim STZ postojao je povišen nivo glukoze u serumu. Primena piridoksina, kao i udružena primena piridoksina i folne kiseline nisu uticale na nivo glukoze ni kod zdravih, ni kod pacova sa DM. Primena folne kiseline kod zdravih pacova nije uticala na vrednosti glukoze, dok je kod pacova sa DM značajno smanjila hiperglikemiju (međutim, vrednosti nivoa glukoze su i dalje bile veće od 12,2 mmol/l).

Pokazano je da DM u jednomesečnom periodu dovodi do različitih oštećenja organa i povećava oksidativni stres (Strother et al, 2001). U ovoj studiji pacovi sa indukovanim dijabetes melitusom pracenjeni su četiri nedelje. Deo rezultata ovog istraživanja opisan je u

prethodno publikovanim radovima, međutim zbog poređenja različitog broja grupa, pet (Mutavdzin et al, 2019a), odnosno četiri (Mutavdzin et al, 2019b), postoje male razlike u vrednostima statističke značajnosti. Oksidativni stres i promene u antioksidativnoj odbrani smatraju se važnim mehanizmom u patogenezi DM i njegovih komplikacija (Samarghandian et al, 2017; Daniel et al, 2018). Oksidativni stres modifikuje metabolizam proteina, lipida i ugljenih hidrata (Shanmugam et al, 2009) i može da izazove disfunkciju endotelnih ćelija i razvoj ateroskleroze. Smatra se da je oksidativno oštećenje glavni mehanizam endotelne disfunkcije kod T1DM (Arden and Sivaprasad, 2011; Folli et al, 2011), kao i uzrok ostalih dijabetičkih komplikacija (Daniel et al, 2018), pa se preporučuje primena supstanci koje će smanjiti oksidativni stres. Da bi se sprečilo oštećenje pojačanim oksidativnim stresom, neophodna je ravnoteža reaktivnih kiseoničnih vrsta i antioksidanata; stoga se različiti suplementi antioksidanata mogu koristiti za sprečavanje posledica oksidativnog stresa (Peluso, 2006). U ovom istraživanju, aktivnosti antioksidativnih enzima, CAT i SOD, su bile povećane u srčanom tkivu pacova sa DM. Slične rezultate dobili su i drugi autori (Strother et al, 2001; Rosa et al, 2016). Međutim, neki istraživači su pokazali smanjene aktivnosti CAT i SOD (Al-Rasheed et al, 2017; Gimenes et al, 2018; Wang et al, 2018). Aktivnosti enzima su u ovoj studiji praćene nakon četiri nedelje, dok je u većini studija koje su pokazale smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima period praćenja bio duži. Strother i sar. (2001) pratili promene nakon 30 dana i dobili su povećane aktivnosti CAT i SOD. Ovi enzimi imaju zaštitnu ulogu protiv oštećenja izazvanih kiseoničnim slobodnim radikalima, pa se povećanje njihove aktivnosti može shvatiti kao adaptivni odgovor na povećani oksidativni stres (Patlolla et al, 2009). Piridoksin je smanjio aktivnost CAT i kod zdravih i kod pacova sa dijabetes melitusom. Međutim, nije imao uticaj na aktivnost SOD. Primena folne kiseline je blagotvorno delovala na pacove sa dijabetes melitusom jer je smanjila vrednosti aktivnosti oba antioksidativna enzima, CAT i SOD. Udružena primena piridoksina i folne kiseline je značajno smanjila aktivnost CAT kod zdravih pacova, i aktivnost oba enzima, CAT i SOD kod pacova sa dijabetes melitusom. Iako ne pripada grupi antioksidanasa pokazano je da vitamin B6 direktno reaguje sa peroksi radikalima, uklanja radikale i inhibira peroksidaciju lipida (Ehrenshaft et al, 1999; Bilski et al, 2000; Ohta and Foote 2002; Kannan and Jain 2004; Keles et al, 2010), ali hemijski mehanizam nije u potpunosti poznat (Kannan and Jain 2004). Uopšteno, ROS se mogu ukloniti funkcionalnim grupama kao što su hidroksilna i aminska grupa (Noguchi et al, 1998). Vitamin B6 se sastoji od piridinskog prstena sa hidroksilnom i aminskom grupom. Stoga je moguće da antioksidativni potencijal vitamina B6 proizilazi iz prisustva ove dve grupe u njegovoj strukturi (Kannan and Jain, 2004). Folna kiselina ima važnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa, poboljšanju funkcije endotela i sprečavanju apoptoze smanjenjem nivoa Hcy u plazmi (Wald et al, 2006; Hou et al, 2018). Postoje i efekti

folne kiseline koji su nezavisni od Hcy, kao što su sprečavanje razdvajanja dimera endotelne azot oksid sintaze, očuvanje tetra-hidrobiopterina i inhibicija formiranja superoksida (Antoniades et al, 2006; Clarke et al, 2006; Moat et al, 2006).

Promene metabolizma se mogu ispitati detekcijom izoformi LDH i procenom njihovih aktivnosti. LDH katalizuje oksidaciju laktata u piruvat kada postoje visoke koncentracije laktata i reverznu reakciju redukcije piruvata u laktat koja se javlja u slučaju nedostatka kiseonika u ćeliji (Kopperschläger and Kirchberger, 1996). Aktivnosti LDH izoformi ukazuju na prevagu aerobnog ili anaerobnog metabolizma u određenom tkivu, jer je pokazano da izoforme LDH1 i LDH2 imaju povećanu aktivnost i sintezu u aerobnim uslovima, dok se izoforme LDH4 i LDH5 pojačano sintetišu i aktivnije su u anaerobnim uslovima (Bittar et al, 1996; Granchi et al, 2010). Rezultati ove studije ukazuju da u srčanom tkivu pacova sa dijabetes melitusom nije bilo dovoljno snabdevanja kiseonikom i da je došlo do pojačanja anaerobnog metabolizma, kao i da je primena piridoksina i folne kiseline, pojedinačno i udruženo, imala pozitivan efekat na ove promene. Pored LDH, MDH je enzim sa važnim metaboličkim funkcijama (Rony et al, 2017). Katalizuje pretvaranje malata u oksaloacetat, i obrnuto. Direktno je uključena u metabolizam glukoze (Seema et al, 1996; Xavier et al, 2012). Ovaj enzim ima dve glavne izoforme, mMDH i cMDH, ali se može detektovati i treća, pMDH, izoforma (Popov et al, 2001). Ukupna aktivnost MDH bila je povećana u grupi DM. Povećanje aktivnosti MDH se očekuje tokom glukoneogeneze (Tejpal et al, 2017) koja se javlja u dijabetičkom stanju (Hatting et al, 2018). U grupi DM dobijena je povećana aktivnost pMDH, dok je cMDH imala nižu aktivnost. Drugi autori su pokazali promene u različitim aktivnostima peroksizomalnih enzima usled dijabetes melitusa, ali nisu testirali aktivnost MDH (Turecký et al, 2014). Rezultati ove studije pokazuju da je pored povećane aktivnosti pMDH povećana i aktivnost CAT koja je jedan od peroksizomalnih enzima. U uslovima dijabetes melitusa peroksizomalna aktivacija može biti posledica povećanog snabdevanja masnim kiselinama i povećanog oksidativnog stresa (Turecký et al, 2014). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je primena piridoksina i folne kiseline, pojedinačno i udruženo, imala pozitivan efekat na promene ukupne aktivnosti MDH i njenih izoformi.

Dijabetes melitus prate kardiovaskularne komplikacije i remodelovanje srca koje može dovesti do srčane insuficijencije i dijabetičke kardiomiopatije čije su glavne morfološke karakteristike srčana hipertrofija i remodelovanje koje su povezane sa fibrozom miokarda (Min et al, 2018). Smatra se da MMP imaju važnu ulogu u degradaciji ekstracelularnih proteina i remodelovanju miokarda (Ichihara et al, 2006). Relativna aktivnost proMMP-2 bila je veća u DM nego u C1 grupi. Pojedinačni i udruženi tretman piridoksinom i folnom

kiselinom je doveo do povećanja aktivnosti proMMP-2 kod zdravih pacova, dok je kod pacova sa DM primena folne kiseline i udružena primena piridoksina i folne kiseline dovela do značajnog smanjenja aktivnosti proMMP-2. Primena piridoksina kod pacova sa DM je dovela do značajnog povećanja aktivnosti aMMP-2 u poređenju sa DM grupom. U DM grupi, aktivnost aMMP-9 bila je niža nego u kontrolnoj grupi. Primena vitamina, pojedinačno i udruženo, je značajno povećala aktivnost aMMP-9 kako kod zdravih, tako i kod pacova sa DM. Promene aktivnosti i ekspresije MMP mogu biti povezane sa povećanim oksidativnim stresom kod dijabetesa (Akat et al, 2018). Kayama i sar. (2015) su pokazali da oksidativni stres pogoršava angiogenezu i povećava razvoj fibroze, najviše zbog modifikacija aktivnosti i/ili ekspresije MMP.

Iako se kod DM očekuje vaskularno remodelovanje, poređenjem morfologije najvećeg krvnog suda, aorte, nisu dobijene statistički značajne razlike između grupa. Salum i sar. (2012) dobili su slične rezultate, oni su pokazali da i 10 nedelja nakon indukcije DM ne dolazi do promena u debljini tunike medije aorte pacova. Nasuprot tome u drugoj studiji došlo je do povećanja debljine tunike medije pacova 12 nedelja nakon indukcije DM (Tang et al, 2016).

U ovoj studiji dobijen je značajno manji broj Langerhansovih ostrvaca po jedinici površine kod pacova tretiranih STZ u poređenju sa kontrolnom grupom, što ukazuje da je primena STZ dovela do značajnog oštećenja Langerhansovih ostrvaca. Međutim, nisu dobijene razlike između ostalih praćenih histomorfometrijskih parametara. Slično ovim rezultatima, Seiron i sar. (2019) su pokazali da kod osoba sa DM dolazi do smanjenja broja Langerhansovih ostrvaca, kao i da se srednja veličina Langerhansovih ostrvaca nije razlikovala kod osoba sa DM i zdravih ispitanika. Takođe, pokazali su i da se ukupan broj ćelija u Langerhansovim ostrvcima nije razlikovao. U njihovom istraživanju je pokazano da kod osoba sa dijabetes melitusom postoji povećan broj α ćelija, dok je broj β ćelija bio smanjen. Njihovim rezultatima odgovaraju i rezultati ovog istraživanja, pošto je nakon imunohistohemijskog bojenja na insulin u grupi DM uočen značajno manji broj insulin pozitivnih Langerhansovih ostrvaca.

Na histološkim merenjima nije bilo razlika u debljini zida LK i DK, a debljina IVS je bila manja kod pacova sa DM u poređenju sa C1 grupom. Transverzalni prečnik kardiomiocita se nije razlikovao između DM i C1 grupe. U jednoj studiji 30 dana nakon indukcije dijabetesa, mereno ehokardiografski, dobijena je smanjena debljina IVS i LV (Wichi et al, 2007).

Najčešći metod za određivanje proliferativne aktivnosti ćelija je primena imunohistohemijskih tehnika (Bologna-Molina et al, 2013). U ovoj studiji da bi se utvrdilo da li je došlo do promena u apoptotskoj ili proliferativnoj aktivnosti kardiomiocita urađena su imunohistohemijska bojenja preparata na BCL2, BCL6, Ki-67 i PCNA. Pozitivnost BCL2 i

BCL6 nije uočena ni u jednoj ćeliji uzoraka srčanog tkiva, a pozitivnost Ki-67 je uočena samo u pojedinim ćelijama srčanog tkiva. Izazivanje dijabetes melitusa, kao ni primena vitamina kod zdravih i pacova sa dijabetes melitusom nisu uticali na aktivnost Ki-67. Smanjena pozitivnost PCNA uočena je kod pacova sa dijabetes melitusom u zidu LK, DK i IVS. Pojedinačna i udružena primena piridoksina i folne kiseline nisu uticale na pozitivnost PCNA u LK, DK i IVS ni kod zdravih, ni kod pacova sa dijabetes melitusom. Jedino je kod pacova sa dijabetes melitusom udružena primena piridoksina i folne kiseline dovela do povećanja pozitivnosti PCNA u LK. PCNA je nuklearni nehistski protein koji je neophodan za sintezu DNK i pomoćni je protein za DNK polimerazu alfa. Povišen je tokom G1/S faze ćelijskog ciklusa. Ćelije u fazi mirovanja, kao i stare ćelije imaju veoma nizak nivo PCNA i RNK (Kelman, 1997).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Mutavdzin S, Gopcevic K, Stankovic S, Jakovljevic Uzelac J, Labudovic Borovic M, Djuric D. The effects of folic acid administration on cardiac oxidative stress and cardiovascular biomarkers in diabetic rats. Oxid Med Cell Longev 2019 Jun 11;2019:1342549. doi: 10.1155/2019/1342549. PMID: 31308875. M21, IF:5,076.

Mutavdzin S, Gopcevic K, Stankovic S, Jakovljevic Uzelac J, Labudovic Borovic M, Djuric D. The effect of folic acid administration on cardiac tissue matrix metalloproteinase activity and hepatorenal biomarkers in diabetic rats. Can J Physiol Pharmacol 2019 Sep;97(9):893-901. doi: 10.1139/cjpp-2019-0027. PMID: 31295411. M23, IF:1,946.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Efekti vitamina B6 i folne kiseline na kardiovaskularni sistem pacova sa dijabetes melitusom indukovanim streptozotocinom“ dr Slavice Mutavdžin Krneta, predstavlja na našim prostorima prvu studiju u kojoj se kod pacova sa dijabetes melitusom indukovanim STZ prate efekti primene vitamina B6 i folne kiseline na metaboličke i kardiovaskularne biomarkere, kao i biohemijske, strukturne i imunohistohemijske promene kardiovaskularnog sistema. Ova disertacija pruža doprinos u razumevanju promena u kardiometaboličkim biomarkerima, parametrima oksidativnog stresa, parametrima remodelovanja srčanog tkiva, u histomorfometrijskim i imunohistohemijskim parametrima srčanog i pankreasnog tkiva nastalih usled dijabetes melitusa, kao i mogućih mehanizama

kojima vitamin B6 i folna kiselina ublažavaju te promene. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na značaj upotrebe suplemenata, kako bi se sprečile ili smanjile komplikacije DM.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Slavice Mutavdžin Krneta i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 12.07.2022.

Članovi Komisije:

Prof. dr Branislav Milovanović

Prof. dr Kristina Gopčević

Prof. dr Vladimir Jakovljević

Mentor:

Prof. dr Dragan Đurić

Komentor

Prof. dr Milica Labudović Borović
