

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

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 12.07.2024. godine, broj 19/XXVIII-3/3-AI, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Efekti modulacije translokatornog proteina i NO sintaze na funkcionalne i biohemijske promene srca u eksperimentalnom modelu infarkta miokarda izazvanog izoprenalinom“

kandidata dr Ana Ilić, zaposlene na Klinici za internu medicine KBC “Dr Dragiša Mišović-Dedinje” u Beogradu. Mentor je prof. dr Dragan Đurić, a komentor je prof. dr Vera Čelić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr dr Branislav Milovanović, predsednik komisije, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Marija Matić, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta 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 Ane Ilić napisana je u skladu sa Statutom Univerziteta u Beogradu i Pravilnikom o doktorskim studijama na Univerzitetu u Beogradu, na srpskom

jeziku, ukupno 132 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 12 tabela, 40 grafikona i 16 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, zahvalnicu, sadržaj, spisak skraćenica korišćenih u tekstu, spisak publikovanih radova koji su proizašli iz teze, biografiju kandidata, kao i prateće izjave: Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **uvodu** je jasno definisano šta je to infarkt miokarda, klinički i terapijski aspekti infarkta miokarda. Definisana je i detaljno je objašnjena etiologija infarkta miokarda, faktori rizika kao i patofiziološki mehanizmi ateroskleroze. Prikazana je klasifikacija infarkta miokarda, kao i komplikacije infarkta miokarda. Detaljno je razmatrana uloga markera miokardne nekroze, kardiovaskularnih markera, oksidativnog stresa i markera inflamacije u infarktu miokarda. Prikazani su animalni modeli infarkta miokarda. Na adekvatan način je opisana uloga i građa translokatornog proteina i mitohondrija, kao i mitohondrijalne permeabilizacijske pore. Precizno je objašnjen uticaj translokatornog proteina u oskidativnom stresu kao i značaj liganada translokatornog proteina.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja efekta induktora infarkta miokarda izoprenalina, ispitivanja efekta modulacije translokatornog proteina i efekata inhibicije NO sintaze na kardiovaskularni sistem, kao i ispitivanje efekata koaplikacije modulacije translokatornog proteina i inhibicije NO sintaze na kardiovaskularni sistem.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o eksperimentalnoj studiji sprovedenoj na mužjacima Wistar Albino pacovima. Detaljno je opisan eksperimentalni protokol: doziranje supstanci. Objasnjena je procedura uzorkovanja krvi i organa i priprema uzoraka za biohemijsku i patohistološku analizu. Detaljno su objašnjene biohemijske metode koje su korišćene u studiji: određivanje markera miokardne nekroze kao i kardiovaskularnih biomarkera u serumu, hemostatskih biomarkera u plazmi, hepato-renalno pankreatičnih biomarkera u serumu, određivanje markera inflamacije u serumu: interleukina 1, interleukina 6, interleukina 10 i faktora nekroze tumora α , određivanje parametara oksidativnog stresa: aktivnost glutacion peroksidaze i superoksid dizmutaze, koncentracija glutationa i ukupna S-glutacionilacija proteina. Precizno je navedeno koje su patohistološke promene merene u tkivu srca. Jasno je navedena statistička obrada podataka.

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 502 reference.

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 modulacije translokatornog proteina i NO sintaze na funkcionalne i biohemijske promene srca u eksperimentalnom modelu infarkta miokarda izazvanog izoprenalinom**”, autora Ane Ilić, konstatovano je da podudaranje teksta iznosi 19%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je pretežno, istih naziva korišćenih biohemijskih parametara, upotrebljenih supstanci, navedenih citata, ličnih imena, navođenja korišćene opreme, opšte-prihvaćenih fraza, definicija i poznate patofiziologije, kao i navođenja prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njene disertacije što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Aplikacija izoprenalina dovela je do pojave difuznog transmuralnog infarkta sa povećanim koncentracijama hsTnT i Hcy, značajnim smanjenjem telesne mase i povećanjem kardiosomatskog indeksa, smanjila je koncentraciju laktat dehidrogenaze i aspartat aminotransferaze. Primena izoprenalina je dovela do povećanja koncentracije fibrinogena i smanjenja koncentracije ukupnog holesterola, triglicerida i lipoproteina velike gustine, a nije uticala na koncentraciju kreatin kinase i von Willebrandovog faktora, kao i ni na parametre bubrežne funkcije - mokraćnu kiselinu, ureu i kreatinin. Koncentracija albumina u serumu je bila povećana, dok je koncentracija ukupnih proteina je bila smanjena nakon aplikacije izoprenalina. Primena izoprenalina je bila praćena promenama u markerima inflamacije, povećanjem koncentracije faktora nekroze tumora α i smanjenjem koncentracije interleukina 10, dok su koncentracije interleukina 1 β i interleukina 6 ostale nepromenjene. Aktivnost glutacion peroksidaze i superoksid dismutaze kao i koncentracija glutaciona nije imala značajne promene nakon aplikacije izoprenalina, a ukupna S-glutacionilacija je bila povećana.

Zajednička primena modulatora translokatornog proteina PK-11195 i inhibitora NO sintaze, L-NAME povećala je koncentraciju visoko senzitivnog troponina T, aspartat aminotransferaze, homocisteina, ukupnog holesterola, fibrinogena, kreatinina, mokraćne kiseline, ukupnih proteina, interleukina 10 i aktivnost superoksid dismutaze, a smanjila je koncentraciju laktat dehidrogenaze, lipoproteina velike gustine, uree, albumina, faktora nekroze tumora α , interleukina 6 i aktivnost glutaciona peroksidaze.

Efekti PK-11195 su se odrazili na smanjenje koncentracije visoko senzitivnog troponina T i povećanje koncentracije homocisteina, promene u lipidnom statusu i na parametre hepato-renalno-pankreatične funkcije kao i na markere inflamacije, određene parametre oksidativnog stresa i hemostatske parametre. Takođe, primena PK-11195 nije pokazala značajnu patohistološku promenu u tkivu srca.

Primena 4'-CIDzp se ogleda u značajnoj redukciji infarktne polja, kao i smanjenju određenih markera ishemije miokarda, parametara oksidativnog stresa i inflamacije. Takođe, nakon primene 4'-CIDzp se beleži značajno smanjenje homocisteina. Pored toga, 4'-CIDzp utiče na određene parametre hepato-renalno-pankreatične funkcije, dok na hemostatske parametre nije pokazao uticaj. Ovaj efekat je delimično poništen zajedničkom primenom L-NAME. Efekat aplikacije L-NAME nije pokazao značajne protektivne efekte, što se ogleda u brojnim ispitanim parametrima tokom ovog istraživanja.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Ova studija je ispitivala potencijalno korisne efekte subkutano aplikacije modulatora translokatornog proteina PK-11195 i 4'-CIDzp kao i intraperitonealne aplikacije inhibitora NO sintaze, L-NAME u uslovima infarkta miokarda izazvanog izoprenalinom. Ispitivane su promene markera miokardne nekroze, ostalih kardiovaskularnih biomarkera u serumu, markera inflamacije u serumu, hemostatskih biomarkera u plazmi i hepato-reno-pankreatičnih parametara u serumu, kao i biohemijske promene u homogenatu tkiva srca (parametri oksidativnog stresa) i patohistološke promene u tkivu srca.

Postoje brojni animalni modeli infarkta miokarda, koji raznim patohistološkim mehanizmima dovode do pojave infarkta miokarda. Animalni model infarkta miokarda izazvanog izoprenalinom je izveden po uzoru na studiju Lobo Filho i saradnika (Lobo Filho et al., 2011), gde je izoprenalin aplikovan subkutano kao pojedinačna doza 85 mg/kg telesne mase

dva puta u intervalu od 24h i ispoljava slične morfološke, biohemijske i metaboličke efekte, koji se dešavaju i u infarktu miokarda kod čoveka.

Aplikacija PK-11195 je statistički značano smanjila koncentraciju visoko senzitivnog troponina T, dok nije uticala na ostale markere miokardne nekroze. Visoko senzitivni troponin T je visoko specifičan i senzitivni marker ishemijske miokardne nekroze i od velike je važnosti pri postavljanju dijagnoze i proceni rizika (Lippi et al., 2009). Primena PK-11195 i L-NAME kod infarkta miokarda indukovanih izoprenalinom dovela je do povećanja koncentracije hsTnT u odnosu na samostalnu primenu PK-11195 i izoprenalina kao i u odnosu na koaplikaciju izoprenalina i fiziološkog rastvora. Primećene su statistički značajno više vrednosti AST usled primene PK-11195 i L-NAME u odnosu na IP grupu. Hiperhomocisteinemija dovodi do pojačanog inflamatornog odgovora i oksidativnog stresa i samim tim do različitih oštećenja tkiva (Matté et al., 2009; Li et al., 2015). Primena PK-11195 u infarktu miokarda indukovanih izoprenalinom dovela je do statistički značajnog povećanja homocisteina, kao i povećanja koncentracije ukupnog holesterola i smanjenja koncentracije HDL-a. Pokazano je da hiperhomocisteinemija indukovana dijetom bogatom metioninom vodi ka ispadima u miokardnoj kontraktilnosti, povećanom kardijalnom remodelovanju kao i ka povećanim prokoagulantnim svojstvima endotela (Todorovic et al., 2021; Kostic et al., 2019). Koaplikacija PK-11195 i L-NAME u modelu infarkta miokarda izazvanog izoprenalinom dovodi do statistički visoko značajnog povećanja koncentracije Hcy u odnosu na IFR grupu. Usled povećanog nakupljanja reaktivnih kiseoničnih vrsta i povećane akumulacije kalcijuma, dolazi do pojačane propustljivosti mPTP, i to je glavni događaj pri ćelijskoj povredi (Javadov et al., 2009). Koaplikacija PK-11195 i L-NAME je dovela do smanjenja aktivnosti glutacione peroksidaze, ali do povećanja aktivnosti superoksid dismutaze. Tokom infarkta miokarda, važnu ulogu imaju proinflamatorni citokini poput interleukina 1 β , faktora nekroze tumora α i interleukina 6, tako što utiču na kontraktilnost kardiomiocita, inflamaciju, smrt kardiomiocita i endotelnu funkciju (Nian et al., 2004). Smanjene vrednosti interleukina 1 β primećene su u grupi IP, a ostale su nepromenjene u grupi IPLN, u odnosu na grupu IFR. Vrednosti faktora nekroze tumora α i interleukina 6 su smanjene u grupama IP i IPLN, dok su vrednosti interleukina 10 značajno povećane, u odnosu na grupu IFR. Aplikacija PK-11195 je u modelu infarkta miokarda u 50% slučajeva imala gradus 1, u 25% slučajeva gradus 2 i 25% slučajeva gradus 3, no bez statistički značajne razlike u odnosu na grupu tretiranu sa fiziološkim rastvorom i izoprenalinom.

Pokazano je da aplikacija 4'-CIDzp u modelu infarkta miokarda izazvanog izoprenalinom dovodi do visoko statistički značajno niže koncentracije hsTnT u poređenju sa grupom I. Brown i saradnici (Brown et al., 2008) su pokazali da 4'-CIDzp deluje protektivno na mitohondrijalnu membranu, omogućavajući održavanje homeostaze Ca^{2+} tokom i nakon ishemije. Samostalna aplikacija 4'-CIDzp kod infarkta miokarda izazvanog izoprenalinom, dovodi do smanjenja Hcy. Koaplikacija 4'-CIDzp i L-NAME je statistički značajno povećala koncentracije visoko senzitivnog troponina T, AST i homocistaina u odnosu na IC grupu. Aplikacija 4'-CIDzp ili L-NAME u modelu infarkta miokarda indukovnog izoprenalinom dovela je do smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i GPx, dok je koaplikacija 4'-CIDzp i L-NAME dovela samo do smanjenja aktivnosti GPx. Primena 4'-CIDzp ili L-NAME nije uticala na vrednosti interleukina 1 β , interleukina 6 i interleukina 10, dok je u grupi ICLN smanjena vrednost interleukina 1 β i faktora nekroze tumora α i povećala vrednosti interleukina 10, u odnosu na sve grupe, a vrednost IL-6 je ostala nepromenjena. Primena 4'-CIDzp je ispoljila značajno kardioprotektivno dejstvo, u 80% slučajeva nije utvrđeno prisustvo infarkta miokarda a samo u 20% slučajeva je utvrđen gradus 1 infarkta miokarda. Nakon koaplikacije 4'-CIDzp i L-NAME, zabeleženo je u 50% slučajeva gradus 2 i u 50% slučajeva gradus 3 infarkta miokarda u odnosu na grupu IC.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Originalni radovi in extenso u časopisima sa JCR (Journal Citation Reports) liste:

Ilic A, Todorovic D, Mutavdzin S, Boricic N, Bozic Nedeljkovic B, Stankovic S, Simic T, Stevanovic P, Celic V, Djuric D. Translocator Protein Modulation by 4'-Chlorodiazepam and NO Synthase Inhibition Affect Cardiac Oxidative Stress, Cardiometabolic and Inflammatory Markers in Isoprenaline-Induced Rat Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):2867. doi:10.3390/ijms22062867. (M21; IF=6.208).

Pregledni rad u časopisu Medicinski podmladak:

Ilic A, Celic V, Djuric D. Translokatorni protein i infarkt miokarda – koja je uloga?. *Medicinski podmladak* (in press). 2026;77(3). doi:10.5937/mp77-49538.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Efekti modulacije translokatornog proteina i NO sintaze na funkcionalne i biohemijske promene srca u eksperimentalnom modelu infarkta miokarda

izazvanog izoprenalinom“ dr Ane Ilić, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja izoprenalina i efekata modulacije translokatornog proteina i inhibitora NO sinteze, kao i kombinovane aplikacije modulatora translokatornog proteina i inhibitora NO sinteze u kardiovaskularnom sistemu u uslovima indukovano infarkta miokarda izoprenalinom. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da su efekti modulatora translokatornog proteina, PK-11195 kao i koaplikacije PK-11195 i inhibitora NO sintaze, L-NAME u kardiovaskularnom sistemu mnogobrojni, što pokazuje svojim uticajem na koncentracije određenih parametara miokardne ishemije, kardiovaskularnih markera, markera inflamacije i oksidativnog stresa, no nije pokazala značajnu patohistološku promenu u tkivu srca. Efekti modulatora translokatornog proteina, 4'-CIDzp se ogleda brojim kardioprotektivnim efektima, i protektivnim efektima na parametre oksidativnog stresa kao i na markere inflamacije, ostvaruje uticaj na remodelovanje tkiva i dovodi do značajne redukcije infarktne polja, što je od posebnog značaja uzimajući u obzir da infarkt miokarda je jedan od vodećih uzroka smrti. Ovaj efekat je delimično poništen zajedničkom primenom sa inhibitorom NO sintaze, L-NAME. Efekat aplikacije L-NAME nije pokazao značajne protektivne efekte.

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 Ane Ilić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 18.07.2024.

Članovi Komisije:

Prof. dr Branislav Milovanović

Prof. dr Marija Matić

Prof. dr Vladimir Jakovljević

Mentor:

Prof. dr Dragan Đurić

Komentor:

Prof. dr Vera Čelić
