



## ИЗВЈЕШТАЈ

*о оцјени подобности теме, кандидата и ментора за израду докторске дисертације*

### I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

Орган који је именовано комисију: Naučno-nastavno vijeće Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci na I redovnoj elektronskoj sjednici

Датум именовања комисије: 14.10.2021.godine. Naučno.nastavno vijeće Medicinskog fakulteta

Број одлуке: 18/3.606/2021. Naučno nastavno vijeće Medicinskog fakulteta

Састав комисије:

- |    |   |                                  |   |
|----|---|----------------------------------|---|
| 1. | <u>Dr Momir Mikov</u><br>Презиме и име  | <u>redovni profesor</u><br>Звање | <u>Farmakologija i toksikologija</u><br>Научно поље и ужа научна област |
|    | <u>Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci</u><br>Установа у којој је запослен-а |                                  | <u>predsjednik</u><br>Функција у комисији                               |
| 2. | <u>Dr Dragan Đurić</u><br>Презиме и име   | <u>redovni profesor</u><br>Звање | <u>Fiziologija</u><br>Научно поље и ужа научна област                   |
|    | <u>Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu</u><br>Установа у којој је запослен-а    |                                  | <u>član</u><br>Функција у комисији                                      |
| 3. | <u>Dr Miloš Stojiljković</u><br>Презиме и име   | <u>redovni profesor</u><br>Звање | <u>Farmakologija i toksikologija</u><br>Научно поље и ужа научна област |
|    | <u>Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci</u><br>Установа у којој је запослен-а |                                  | <u>član</u><br>Функција у комисији                                      |

## II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Име, име једног родитеља, презиме: Dalibor (Milorad) Mihajlović
2. Датум рођења: 16.09.1973.god. Мјесто и држава рођења: Banja Luka, Republika Srpska, BiH

### II.1 Основне студије

Година уписа:  Година завршетка:  Просјечна оцјена током студија:

Универзитет: Univerzitet u Banjoj Luci

Факултет/и: Medicinski fakultet

Студијски програм: opšti

Звање: doktor medicine

### II.2 Мастер или магистарске студије

Година уписа:  Година завршетка:  Просјечна оцјена током студија:

Универзитет: Univerzitet u Banjoj Luci

Факултет/и: Medicinski fakultet

Студијски програм: Opšti

Звање: Magistar medicinskih nauka

Научна област: Kardiologija

Наслов завршног рада: "Učestalost i značaj ranog otkrivanja infarkta miokarda bez ST elevacije na prehospitalnom nivou"

### II.3 Докторске студије

Година уписа:

Факултет/и: Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Студијски програм: Biomedicinske nauke

Број ЕЦТС до сада остварених:  Просјечна оцјена током студија:

#### II.4 Приказ научних и стручних radova kandidata

P. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница	Категорија 1
1.	<b>Mihajlović D</b> , Maksimović MŽ, Dojčinović B, Banjac N. Acute coronary syndrome (STEMI, NSTEMI and unstable angina pectoris) and risk factors, similarities and differences. Scr Med. 2020;51(4):252-60.	Prva kategorija

*Кратак опис садржине:*

Akutni koronarni sindrom (ACS) je jedna od najčešćih i najdramatičnijih manifestacija, a razlikovanje ACS od nesrčanog bola u grudima predstavlja dijagnostički izazov.

Cilj rada je odrediti učestalost tipova ACS: NSTEMI, STEMI i nestabilne angine pektoris (UAP). Ispitati učestalost i značaj riziko-faktora i kardiospecifičnih enzima kod bolesnika sa ACS. Analizirani su pacijenti koji su sa prehospitalnog nivoa Doma zdravlja Banjaluka (Službe hitne medicinske pomoći i porodičnih ambulanti Doma zdravlja Banja Luka) upućeni i liječeni u koronarnoj jedinici Klinike za KVB UKC Banjaluka u prvih 6 mjeseci 2011-te godine pod dijagnozom ACS. Studija obuhvata pacijente starije od 18 godina, kojima je evidentiran pol, starost, pušački status, postojanje hipertenzije, dijabetesa, gojaznosti, porodičnog opterećenja. Mjerene su vrijednosti holesterola, triglicerida, kalijuma u serumu, CK, CK-MB, cTnT.

Pod uputnom dijagnozom ACS upućeno je i na odjeljenju koronarne jedinice Klinike za KVB UKS RS Banja Luka, je liječeno ukupno 192 pacijenta, a. Pri tome, a ACS je potvrđen kod 178 slučajeva. STEMI je potvrđen kod 86 pacijenata (48.31%), NSTEMI kod 55 (30.90%), a UAP kod 37 (20.79%). ACS se statistički značajno češće javljao kod muškaraca (112:66) i muškarci su bili mlađi (62.72:69.29 godine) ( $U=2.472 \cdot 10^3$ ,  $p < 0.001$ ). Od rizikofaktora utvrđeno je da je pušenje češće povezano sa STEMI ( $p = 0.014$ ), a hipertenzija sa UAP ( $p = 0.041$ ). Sva tri ispitivana srčana biomarkera su pokazala statističku značajnost ( $p < 0.001$ ), između svih parametara i to: vrijednosti kod STEMI > NSTEMI > UAP.

Pravovremeno prepoznavanje IM bez ST elevacije je od ključnog značaja za preživljavanje pacijenta. Adekvatna anamneza uz procjenu rizikofaktora, analiza ECG, cTnT i praćenje pacijenta bi propuste u prepoznavanju trebali ako ne eliminisati, onda bar svesti na minimum.

Rad pripada problematiku докторске дисертације:      ДА      НЕ      ДЈЕЛИМИЧНО

P. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница	Категорија
2.	Гацећа М, Гацећа М, Хаџић Р, Банјак Н, <b>Михајловић Д</b> . Hypoglycemia treatment in Emergency department of Banjaluka. ABC-časopis urgentne medicine. 2016;16(3):15-21.	M53

*Кратак опис садржине:*

Akutna hipoglikemija je urgentno stanje koje predstavlja najčešću akutnu komplikaciju kod pacijenata oboljelih od dijabetes mellitusa. Istraživanje je imalo za cilj dokazati da se

1 Kategorija se odnosi na one часописе и научне скупове који су категорисани у складу са Правилником о публикавању научних публикација („Службени гласник РС“, бр. 77/10) и Правилником о мјерилима за остваривање и финансирање Програма одржавања научних скупова („Службени гласник РС“, бр. 102/14).

hipoglikemija može uspješno tretirati primenom manjih količina koncentrovane glukoze odnosno do 30 ml 50 % glukoze intravenskom aplikacijom uz obavezan savjet da se oralnom upotrebom namirnica nadoknadi glukoza kada se postignu uslovi za to u odnosu na stanje svijesti. U periodu od 1.1.2013. do 30.6.2014 godine, retrospektivnom analizom su zabilježena 162 slučaja koji su kasnije identifikovani i registrovani kao hipoglikemije. Podaci koji su korišteni uzeti su retrogradno iz protokola mobilnih timova i ambulante Službe hitne medicinske pomoći Banjaluka. Od ukupnog broja pacijenata odnosno 162 pacijenta, 134 (82,7%) pacijenta su adekvatno reagovali na primenjenu terapiju dok je 28 (17,3%) pacijenata tretirano bez uspjeha i isti su zahtjevali bolnički tretman. Utvrđeno je da su pacijenti podjednako dobro reagovali kada je primenjen manji broj ampula 50% glukoze u odnosu na one pacijente koji su primili veće količine glukoze (veći broj ampula 50% glukoze odnosno kombinaciju infuzione otopine 5% glukoze i ampule koncentrovane 50% glukoze). Nema povezanosti primenjenog broja ampula sa ishodom lečenja ( $p=0,32$ ). Praćenjem rezultata tretmana hipoglikemije od strane lekara Službe hitne medicinske pomoći Banjaluka, došlo se do zaključka da se i sa manjim količinama glukoze mogu postići zadovoljavajući rezultati u pogledu korekcije nivoa glukoze u krvi kod osoba sa dijagnostikovanom hipoglikemijom.

Рад припада проблематици докторске дисертације:      ДА      НЕ      ДЈЕЛИМИЧНО

Р. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница	Категорија
3.	Đukić B, Hotić-Lazarević S, Tadić D, <b>Mihajlović D.</b> Sideropenijska anemija u generativnom periodu žena: rezultati istraživanja u Domu zdravlja Banja Luka. Biomedicinska istraživanja. 2014;5(2):25-29.	Prva kategorija

*Кратак опис садржине:*

Anemija usljed deficita željeza je veoma važan javno-zdravstveni problem i ima veliki uticaj na zdravlje stanovništva. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) procjenjuje da je više od 30% stanovništva anemično, od kojih se 50% može pripisati anemiji usljed nedostatka željeza. Smatra se da su ovi podaci SZO najprecizniji i da su odraz globalne anemije. Zemlje bez obavljenih istraživanja treba ohrabriti da prikupljaju podatke. Baze podataka pružaju pouzdan metod za praćenje napretka ka eliminaciji anemije i efikasnost trenutne strategije za kontrolu anemije. Cilj rada je bio da se utvrdi uticaj generativnog perioda kod žena na pojavu sideropenijske anemije. Istraživanje je proteklo kao prospektivna, opservaciona, kohortna studija u JZU Doma zdravlja u Banjoj Luci. Istraživanje je obuhvatilo 236 ženau generativnom periodu i u postmenopauzi. Podaci su prikupljeni na osnovu kliničkog pregleda i laboratorijskih nalaza koji su popunjeni u upitnik dizajniran za potrebe istraživanja. Anketni upitnik je baziran na Kliničkom vodiču za anemiju koji je izdalo Ministarstvo zdravlja i socijalne zaštite Republike Srpske 2009. godine. Žene u generativnom periodu su oboljele od anemije u 79,2% slučajeva, a žene u postmenopauzi u 20,8%. Značajno veći procenat žena generativnog perioda, koje navode da su prihodi njihovog domaćinstva dovoljni za troškove ishrane, se nalazi u kategoriji umjerenog rizika (2-3 faktora rizika za nastanak sideropenijske anemije u generativnom periodu), za razliku od žena čiji prihodi nisu dovoljni za toškove ishrane, a koje se u većem procentu nalaze u kategoriji sa najvećim stepenom rizika. Žene u generativnom periodu u većem procentu oboljevaju od sideropenijske anemije u odnosu na žene u postmenopauzi. Karakteristike generativnog perioda su bile uzrok pojave sideropenijske anemije, jer nije bilo razlike u korištenju namirnica bogatih željezom i socioekonomskom status kod žena u generativnom periodu u odnosu na žene u postmenopauzi.

Рад припада проблематици докторске дисертације:      ДА      НЕ      ДЈЕЛИМИЧНО

--

P. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница	Категорија
4.	Banjac N, Maravic-Oplakan G, Kovacevic B, Jelovac L, <b>Mihajlovic D</b> , Burgic-Radmanovic M, Kovacevic D. Incidence and Pre-Hospital Care of Acute Coronary Syndrome in Emergency Department Banja Luka. Prehospital and Disaster Medicine. 2011;30(1):107.	

*Кратак опис садржине:*

Akutni koronarni sindrom vodeći je uzrok srčane smrti kod odraslih. Liječenje takvih pacijenata počinje prilikom prvog kontakta sa ljekarom koji u većini slučajeva nije niti internist niti kardiolog, već specijalista urgentne medicine ili ljekar opšte prakse koji radi u odjeljenjima hitnih službi. Iz tog razloga je od velike važnosti edukacija ljekara koji će moći da postave brzu i preciznu dijagnozu, započeti terapiju i organizovati brzi transport do najbliže sale za kateterizaciju ili koronarne jedinice. Primarni cilj je bio izmjeriti učestalost pacijentovih posjeta Hitnoj pomoći zbog akutnog koronarnog sindroma. Sekundarni cilj je bio ispitati izbor tretmana u predbolničkim uslovima. Kroz statističku retrospektivnu analizu prikupili smo podatke iz protokola Hitne pomoći Banja Luka za period od 1. juna 2008. do 31. decembra 2008. godine.

U 14.986 pacijenata tokom šestomjesečnog perioda, 343 od njih su imali akutni koronarni sindrom. Muškarci su bili više pogođeni (59,5%) od žena (40,5%). Većina slučajeva pripadala je dobnoj grupi od 65 do 80 godina (39,6%) i prevalencija nakon 50 godine pokazuje nagli rast. Prema dijagnozi, većina pacijenata su imali nestabilnu anginu (42%), a zatim su ih slijedili stenokardija (31%) i AIM (27%). Terapija uključuje NTG (22%), antihipertenzivi (21%), acetylsalicilna kiselina (20%), analgetici (13%), antiaritmici (4%). Pedeset sedam posto pacijenata imalo je komplikacije.

STEMI je dijagnostikovano u 69% pacijenata, a najčešće je to bio prednji zid (35%).

Dijagnoza akutnog koronarnog sindroma bila je ustanovljena kod 343 pacijenata na osnovu kliničke slike, elektrokardiografskih promjena i nivoa kardiospecifičnih enzima (troponin T).

*Рад припада проблематици докторске дисертације:*      ДА                      НЕ                      ДЕЛИМИЧНО

P. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница	Категорија
5.	Banjac N, Gaćeša M, <b>Mihajlović D</b> , Kozomara S, Maravić-Oplakan G, Galić B. Prevalence of allergic reactions at the Emergency Medical Department of the Healthcare Centre of Banja Luka. ABC-časopis urgentne medicine. 2011;11(2-3): 15-21.	M53

*Кратак опис садржине:*

Incidencija alergijskih bolesti u porastu je, posebno u industrijalizovanim zemljama i zemljama u razvoju. Od alergije obolijeva 30 % stanovništva. Na ovakvo stanje, pored genetskih, utiču različiti faktori savremenog života i rada. U svakodnevnom radu sa pacijentima pogođenim alergijom doktorima nedostaje vremena za objašnjenja vezana uz tu bolest i za praktične savjete o tome kako bi bolesnik trebalo živjeti i izbjegavati kontakt sa alergenima.

Istraživanje je otvorilo mala vrata relativno malo poznatom, o tome šta se dešava sa pacijentima koji posjete službu hitne medicinske pomoći zbog akutne alergijske bolesti. Istraživanje je obuhvatilo 495 odraslih pacijenata. Sprovedeno je u SHMP DZ Banja Luka i obuhvata period od

jedne godine. Rezultati pokazuju veću učestalost ženskog pola (51%), najučestaliju dobnu zastupljenost > 60 godina (42,8 %), najfrekventnije javljanje bolesti u proljeće i ljeto (51%), najzastupljeniji alergeni ose, insekti (45 %), najčešća MKB 10 dijagnoza X 23, W 57, najviše ordinirana terapija antihistaminici i kortikosteroidi, najčešća pridružena bolest arterijska hipertenzija, a 98,4 % pacijenata zbrinuto je u SHMP.		
Rad pripada problematiki doktorске дисертације:      ДА <u>НЕ</u> ДЈЕЛИМИЧНО		
Р. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница	Категорија
6.	Banjac N, Gaćeša M, <b>Mihajlović D</b> , Lazarević A, Grbić D, Grbić D. Analysis of cardiopulmonary resuscitation at the Emergency Medical Service Banjaluka performed according to the resuscitation protocol. Naučni časopis urgentne medicine-Halo 94. 2010;17(1):19-34.	M53
<p><i>Кратак опис садржине:</i></p> <p>Primjenom reanimacionih mjera (osnovnih i proširenih) i postupaka prema najnovijim smjernicama ERC-a, pokušavamo spasiti ljudski život. Uvođenje reanimacionog protokola pruža bolju mogućnost evidencije parametara i analizu učinjenog. Cilj rada je bio utvrditi broj uspješnih reanimacija sprovedenih prema reanimacionom protokolu u Službi hitne medicinske pomoći Banja Luka u 2009.godini. Studija je dizajnirana kao retrospektivno–prospektivno, jednogodišnje ispitivanje, sprovedenih vanhospitlnih KPR u Službi HMP Banja Luka. Kao instrument istraživanja primenjen je standardizovani obrazac reanimacionog protokola. U navedenom periodu vanhospitlna KPR je sprovedena kod 77 osoba i to kod 49 muškaraca i 28 žena. Dok je najveći broj reanimiranih žena (59%) bio starosti od 60 do 69 godina, najveći broj reanimiranih muškaraca je bio starosti oko 50 godina. Ukupan broj uspješnih reanimacija u SHMP Banja Luka u navedenom periodu iznosi 15(19,5% pacijenata). Broj uspješno reanimiranih muškaraca je 6 (7,8%), a žena 9 (11,7%). U 63% KPR je sprovedena po protokolu za nešokabilni ritam (bez potrebe za defibrilacijom) jer je prošlo više od 20 minuta od nastanka srčanog zastoja do dolaska ekipe SHMP ili su to bili terminalni stadiji nekih od neizlječivih oboljenja (karcinomi). Na primenjenu farmakološku terapiju tokom KPR žene su znatno bolje reagovalе od muškaraca. U slučaju kada je inicijalni ritam aresta bio asistolije uspješno je reanimirano 30% žena a 3% muškaraca. Preživljavanje žena je bilo značajno veće nezavisno od zatečenog ritma aresta. Najveći procenat uspješnih reanimacija je zabilježen kod pacijenata koji su inicijalno imali normalnu boju kože, dok su blijeda i cijanotična boja kože prediktor neuspješnih vanhospitlnih KPR oba pola. U sprovedenim KPR više je uspješno reanimiranih žena nego muškaraca, srednje starosne dobi. Preživljavanje vanhospitlnih aresta zavisno je od inicijalnog ritma aresta. Postojeći reanimacioni protokol olakšava rad lekara na prehospitlnom nivou.</p>		
Rad pripada problematiki doktorске дисертације:      ДА <u>НЕ</u> ДЈЕЛИМИЧНО		

Да ли кандидат испуњава услове?

ДА

НЕ

### III ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

Биографија ментора (до 1000 карактера):

**Prof. dr Velibor Vasović** je 1991. godine završio Medicinski fakultet u Novom Sadu za pet godina sa prosječnom ocjenom 9,47. Za uspjeh postignut tokom studija nagrađivan je od strane Univerziteta u Novom Sadu. Postdiplomske studije je upisao na Zavodu za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu 1992. godine, gde je i magistrirao 11.04.1996. godine, sa tezom: Uticaj metilksantina na prolazak lekova u centralni nervni sistem, pod mentorstvom profesora dr Branka Banića. 1998. godine je završio specijalizaciju iz urgentne medicine, i rukovodilac je rada Službe hitne medicinske pomoći u Kuli, koja je nastavna baza Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. 11.12.1998. godine je doktorirao na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu sa tezom: Uticaj derivata žučne kiseline na prolazak lekova u centralno nervni sistem, pod mentorstvom profesora dr Momira Mikova. Od 2000. godine u stalnom je radnom odnosu, najprije kao asistent, zatim docent, vanredni profesor, a od januara 2014. godine kao redovni profesor na Zavodu za farmakologiju sa toksikologijom Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. 2009. godine je završio subspecijalizaciju iz kliničke farmakologije. Izvodi teorijsku nastavu iz farmakologije sa toksikologijom na odsjeku opšte medicine, stomatologije, zdravstvene njege i farmacije Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. Izvodi postdiplomsku nastavu iz toksikološke hemije, kao i specijalističku i doktorsku nastavu iz urgentne medicine. Rukovodilac je predmeta Toksikološka hemija na farmaceutskom odsjeku Medicinskog fakulteta u Novom Sadu. Bio je mentor brojnih studentskih i diplomskih radova, dva odbranjena magistarska i četiri odbranjena doktorska rada. Objavio je pedeset radova u recenziranim međunarodnim i domaćim naučnim časopisima, od toga ima dvadeset radova sa SCI liste. Imao je radove na osamdeset međunarodnih i nacionalnih naučnostručnih kongresa. Napisao je udžbenik "Odabrana poglavlja iz toksikologije" za studente medicine i farmacije. Saradnik je u pisanju priručnika "Lekovi u prometu" unazad petnaest godina. Koautor je monografije Eksperimentalna farmakologija u naučno istraživačkom radu. Koautor je udžbenika Farmakologija sa toksikologijom za studente stomatologije i Farmakologija za studije zdravstvene nege. Bio je saradnik na tri republička i jednom pokrajinskom naučnom projektu. Jedan je od autora patenta: Mikov M., Kuhajda K., Kevrešan S., Jakovljević V., Vasović V. Bile acids and their derivatives as bloodbrain barrier permeability modifiers for drugs and poisons, Patent pending YU-P-213/04. Učestvovao je u prevodu udžbenika iz farmakologije za studentne medicine: Vasović V. Zavisnost prema lekovima i zloupotreba lekova, (Poglavlje 42) u Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmakologija Data Status 2005. Član je stručnih asocijacija iz farmakologije, urgentne medicine i sportske medicine. Njegova predavanja su aktuelna, zanimljiva i izuzetno dobro ocenjena od strane studenata. Korektan odnos prema studentima kao i prema saradnicima čini ga veoma dobrim i korektnim kako saradnikom tako i nastavnikom. Oženjen je i otac je dvoje dece.

Радови из области којој припада приједлог докторске дисертације:

Р. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница
1.	Trifunovic J, Borcic V, Vukmirovic S, <b>Vasovic V</b> , Mikov M. Bile acids and their oxo derivatives: environmentally safe materials for drug design and delivery. Drug Chem Toxicol. 2017;40(4):397-405.
2.	<b>Vasović V</b> , Vukmirović S, Mikov M, Mikov I, Budakov Z, Stilinović N, Milijašević B. Influence of bile acid derivates on morphine analgesic effect in mice. Vojnosanit Pregl. 2014;71(8):767-71.
3.	Lalić-Popović M, <b>Vasović V</b> , Milijašević B, Goločorbin-Kon S, Al-Salami H, Mikov M.

	Deoxycholic acid as a modifier of the permeation of gliclazide through the blood brain barrier of a rat. J Diabetes Res. 2013;2013:1-8.
4.	Rašković A, Stilinović N, Kolarović J, <b>Vasović V</b> , Vukmirović S, Mikov M. The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. Molecules 2011;16(10):8601-13.
5.	<b>Vasovic V</b> , Vukmirovic S, Pjevic M, Mikov I, Mikov M, Jakovljevic V. Influence of bile acid and derivates on tramadol analgesic effect in mice. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2010;35(1-2):75-8.
6.	<b>Vasović V</b> , Vukmirović S, Posa M, Mikov M, Rasković A, Jakovljević V. Effect of rat pretreatment with aqueous solutions of stevioside and bile acids on the action of certain cardioactive drugs. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2006 Oct-Dec;31(4):311-4.

Да ли ментор испуњава услове?

ДА

НЕ

### III ПОДАЦИ О КОМЕНТОРУ

Биографија коментора (до 1000 карактера):

**Ranko Škrbić** je rođen 10. aprila 1961. godine u Banjoj Luci. U Banjoj Luci je završio gimnaziju gdje je i 1986. godine diplomirao na Medicinskom fakultetu. Magistrirao je 1991. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, a doktorirao 1994. godine odbranivši doktorsku disertaciju na temu Prisustvo adrenergičkih serotoninergičkih, holinergičkih i VIP receptora u lingvalnim arterijama psa i majmuna na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Na Univerzitetu u Japanu je boravio godinu dana kao stipendista Vlade Japana na istraživačkom studiju, nakon čega završava i specijalizaciju iz Kliničke farmakologije na Univerzitetu u Novom Sadu. Usavršavao se u Londonu, Bristolu, Stokholmu i Barseloni.

1987. godine počinje akademsku karijeru na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci kao asistent, da bi 2002. godine postao vanredni profesor i šef Katedre za farmakologiju.

U zvanje redovnog profesora biran je 2009. godine. Postao je 2006. godine ministar zdravlja i socijalne zaštite u Vladi Republike Srpske. Tu dužnost je obavljao sve do 2013. godine. Bio je i ambasador Bosne i Hercegovine u Srbiji tokom 2014. i 2015. godine.

Nakon toga izabran je za dekana Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci. Autor i koautor je mnogih radova u svjetskim i domaćim časopisima, radova sa skupova, knjiga, priručnika, vodiča, projekata i drugih publikacija. Trenutno je šef i redovni predavač Katedre za farmakologiju, kliničku farmakologiju farmakokinetiku i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci.

Dužnost dekana Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci i danas obavlja.

Радови из области којој припада приједлог докторске дисертације:

Р. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница
1.	Кесман S, <b>Škrbić R</b> , Badnjevic Cengic A, Mooranian A, Al-Salami H, Mikov M, Golocorbin-Kon S. Potentials of human bile acids and their salts in pharmaceutical nano delivery and formulations adjuvants. Technol Health Care 2020;28(3):325-335.
2.	Vulic D, Loncar S, Krneta M, <b>Skrbic R</b> , Lazarevic A, Lee BT, Lopez VA, Wong ND. Risk factor control and adherence to treatment in patients with coronary heart disease in the Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina in 2005-2006. Arch Med Sci



	2010;6(2):183-7.
3.	Appiah I, Milovanovic S, Radojicic R, Nikolic-Kokic A, Orescanin-Dusic Z, Slavic M, Trbojevic S, <b>Skrbic R</b> , Spasic MB, Blagojevic D. Hydrogen peroxide affects contractile activity and anti-oxidant enzymes in rat uterus. Br J Pharmacol 2009;158(8):1932-41.
4.	Markovic-Pekovic V, Stoisavljevic-Satara S, <b>Skrbic R</b> . Utilisation of cardiovascular medicines in Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, 5 years study. Pharmacoepidemiol Drug Saf 2009;18(4):320-6.
5.	Mikov M, Al-Salami H, Golocorbin-Kon S, <b>Skrbic R</b> , Raskovic A, Fawcett JP. The influence of 3alpha,7alpha-dihydroxy-12-keto-5beta-cholanate on gliclazide pharmacokinetics and glucose levels in a rat model of diabetes. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2008 Jul-Sep;33(3):137-42.

#### IV ОЦЈЕНА ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ

##### IV.1 Формулација назива тезе (наслова)

**Uloga henodeoksiholne i ursodeoksiholne kiseline na funkcionalne i biohemijske promjene srca na modelu izoprenalinske kardiotoksičnosti kod pacova**

Наслов тезе је подобан?

ДА

НЕ

##### IV.2 Предмет истраживања

Velika učestalost kardiovaskularnih bolesti, posebno velika smrtnost i umanjenje radne sposobnosti od istih predstavljaju motiv za mnoga eksperimentalna istraživanja na polju kardiovaskularne fiziologije. Na polju kardioprotektivnosti, u centru ovog istraživanja je ispitivanje potencijalno zaštitnog dejstva žučnih kiselina, prevashodno henodeoksiholne ( hidrofobne žučne kiseline) i ursodeoksiholne kiseline ( hidrofilne žučne kiseline) na eksperimentalnom modelu izoprenalinske kardiotoksičnosti kod pacova. Efekti navedenih žučnih kiselina na biohemijske promjene će se pratiti određivanjem koncentracije velikog broja biohemijskih parametara (markera oštećenja srca, markera oksidativnog stresa i remodelovanja srca, markera inflamacije i hemostaze i dr.)

Предмет истраживања је подобан?

ДА

НЕ

##### IV.3 Најновија истраживања познавања предмета дисертације на основу изабране литературе са списком литературе

**Akutni koronarni sindrom/ Akutni infarkt srca**

Bolesti koronarnih arterija su najčešća manifestacija kardiovaskularnih bolesti (KVB) i povezane su sa visokom smrtnošću i obolijevanjem. Pacijenti sa bolom u grudima predstavljaju vrlo značajan dio svih akutnih medicinskih hospitalizacija u Evropi. Prepoznati akutni koronarni sindrom (AKS) kod pacijenata sa sumnjivim bolom u grudima je veliki dijagnostički izazov, posebno kod pacijenata bez jasnih simptoma i EKG promjena. Unatoč modernom liječenju,

stopa smrtnosti kod infarkta miokarda je i dalje visoka (1). Bolesti koronarnih krvnih sudova predstavljaju uzrok oko 35% ukupnih smrti, a 2016. godine bile su uzrok smrti 16 miliona ljudi (2). Akutni koronarni sindrom se definiše kao skup kliničkih sindroma nastalih poremećajem krvotoka u koronarnim arterijama sa posljedičnom ishemijom (3). Na osnovu EKG karakteristika (odsutnost ili prisutnost ST elevacije), razlikuju se STEMI i NSTEMI akutni koronarni sindromi. Zajednička patofiziologija akutnog koronarnog sindroma (AKS) je ruptura ili erozija ateromatoznog plaka sa posljedičnom trombozom, inflamacijom, vazokonstrikcijom i mikroembolizacijom (4,5,6). Istraživanja pokazuju povećanje biomarkera i prije pojave biomarkera nekroze (cTnI, cTnT), kao što su: upalni citokini, ćelijske adhezione molekule, matriks metaloproteinaze, visoko senzitivni C-reaktivni protein (hs-CRP), biomarkeri destabilizacije plaka, biomarkeri ishemije (npr. holin, ishemijom modifikovan albumin), biomarkeri srčane disfunkcije (B-tip natriuretskog peptida), itd. Oni mogu olakšati raniju procjenu ukupnog rizika i pomoći u identifikaciji i tretmanu pacijenata sa simptomima koji upućuju na AKS prije smrti ćelija (7). Akutni koronarni sindrom je povezan sa inflamatornim odgovorom, zbog oslobađanja slobodnih kiseoničnih radikala i proteolitičkih enzima (2). Nekrozom kardiomiocita oslobađaju se signalne molekule opasnosti (npr. HMBG1- nuklearni protein hromatina), koje se vežu za upalne receptore (RAGE, TLR receptore) koji potom aktiviraju komponente komplekta i djeluju na MAPK (mitogenima aktivirane protein kinaze) i NF kB ( nuklearni faktor kapa B). Aktivacijom MAPK i NF kB dolazi i do aktivacije proupalnih gena koji, dovode do stvaranja upalnih citokina (TNF, IL-6, IL-1, IL-18), hemokina i adhezivnih molekula. Stvorene molekule pojačavaju upalni odgovor (stimulišući MAPK, NF kB) i privlače upalne ćelije (Neutrofile, Monocyte, Limfocite, Mastocite) dovodeći do njihove ekstravazacije u oštećeno tkivo srca (8). Inflamatorni proces može da utiče na veličinu nekrotične lezije srca (9).

### **Oksidativni stres kod oštećenja srca**

Tokom posljednjih godina, istraživanja su pokazala da oksidativni stres treba smatrati primarnim ili sekundarnim uzrokom mnogih kardiovaskularnih bolesti (KVB) (10). I in vivo i ex vivo studije pružile su dokaze koji podupiru ulogu oksidativnog stresa u aterosklerozi, ishemiji, hipertenziji, kardiomiopatiji, srčanoj hipertrofiji i kongestivnom zatajenju srca (11,12). Oksidativni stres predstavlja metaboličko stanje organizma praćeno povećanjem količine reaktivnih kisikovih molekula (ROS). Primarno su u pitanju: superoksidni radikal ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidrosilni radikal ( $-OH$ ). Standardnim metaboličkim procesima aerobnih organizama kontinuirano se stvaraju radikali kisika i postoji čitav niz važnih staničnih procesa u kojima slobodni radikali imaju važnu fiziološku funkciju (13)

Zdrave stanice nastoje uspostaviti i kontinuirano održavati ravnotežu između stvaranja i eliminacije kisikovih radikala. Ovu homeostazu stanica postiže produkcijom takozvanih antioksidansa, koji djeluju kao sakupljači radikala i tako neutraliziraju nastale redukujuće i oksidirajuće molekule. Poremećaj ove homeostaze, odnosno promjena ravnoteže između oksidanata i antioksidanata u korist oksidanata naziva se "oksidativni stres"

Radikali (ROS) su visoko reaktivne molekule i u višku vrlo lako mogu oštetiti stanične strukture (staničnu membranu i organele), odnosno njihove komponente ugljikohidrate, lipide, proteine i DNA.

Ova oštećenja koja ako se ne repariraju mogu dovesti do smrti stanice. Ako i ne nastupi smrt stanice, oštećenja su često takva da olakšavaju nastanak brojnih bolesti, na primjer dijabetesa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti te različitih malignih oboljenja. Eukariotske stanice su razvile zaštitne sisteme kojim kontrolišu stvaranje slobodnih radikala i na taj način se

suprotstavljaju potencijalnoj opasnosti od oksidativnog stresa. Zaštitni sistemi svoj učinak baziraju na spojevima koji služe kao protivteža učinku oksidanata i nose zajednički naziv antioksidansi. Najznačajniji antioksidacijski enzimi su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation- GSH (tripeptid koji je supstrat za enzim glutation peroksidazu). Smanjena količina GSH je nađena u toku ishemije i reperfuzije ishemičnog miokarda (14).

Antioksidacijske molekule unosimo i hranom i među njima su najvažnije askorbinska kiselina (vitamin C), tokoferoli i tokotrienoli u koje ubrajamo  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), karotenoide i flavonoide (15, 16, 17).

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) u miokardiocitima uglavnom proizvode mitohondriji tokom fizioloških i patoloških stanja, odnosno kiseonični radikali mogu nastati staničnim disanjem, djelovanjem lipoksigenaza (LOX) i ciklooksigenaza (COX) tokom metabolizma arahidonske kiseline te u endotelnim i upalnim stanicama (18). Unatoč činjenici da ove organele imaju svojstveni kapacitet uklanjanja ROS-a, vrijedi napomenuti da to nijedovoljno za rješavanje stanične potrebe da se očisti količina ROS-a koju proizvode mitohondriji (19, 20).

Stanice postavljaju antioksidativni obrambeni sistem koji se temelji uglavnom na enzimskim komponentama, poput već navedenih superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx), kako bi se zaštitili od ROS-indukovanog staničnog oštećenja (21).

U ishemičnom miokardu izvori ROS-a su mitohondrijski lanac transportnih elektrona (disfunkcija rada mitohondrija), povećana aktivnost dušikove oksid sintetaze (NOS), ksantin oksidaze, autooksidacije kateholamina i drugi izvori (13).

Toksični efekti produkovanih ROS u suvišku u miokardiocitima dovodi do njihovog oštećenja ili smrti različitim mehanizmima najčešće alteracijom u homeostazi  $Ca^{2+}$  i Fe, poremećaja u funkciji mitohondrija i sarkoplazmatskog retikuluma, promjena u sintezi nukleinskih kiselina i proteina, degradacije miofilamenata i komponenti citoskeleta (22). Reaktivne kiseonične vrste imaju profibrotičku funkciju tj. idukuju proliferaciju fibroblasta i aktiviraju matriksne metaloproteinaze (13).

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) oštećuju kontraktilnu mašineriju kardiomiocita direktno i to modifikacijom proteinskog sistema koji učestvuje u kontrakciji srčane ćelije i preko kanalskih sistema ( $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  i  $Na-K^{+}$  kanala) (5). Oštećenjem ili smrću srčanih ćelija u krvi se mogu detektovati biomarkeri srčane nekroze a ponajprije danas najčešće korišten i u praksi karakterisani kao zlatni standard su srčani Troponini (7,13).

Žučne kiseline, koji se sintetišu iz holesterola u hepatocitima jetre, predmet su proučavanja, zahvaljujući njihovoj složenoj mreži signalnih puteva koju ispoljavaju na hepatocite, miokardiocite i druge ćelije. Jedna od svojstava žučnih kiselina je njihovo djelovanje na citotoksičnost odnosno citoptotekciju, a ta svojstva zavise od hidrofobnosti odnosno od hidrofilitnosti žučnih kiselina. Ursodeoksiholna kiselina (UDCA) kao hidrofila žučna kiselina, ihhibiše apoptozu i nekrozu ćelija preko više efekta među kojima je i sprečavanje stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) (24).

## Apoptoza

Apoptoza je tip programirane ćelijske smrti. Za razliku od nekroze, apoptoza je aktivan proces regulisan različitim signalnim putevima, aktivacijom kaskade proteina i modulacijom genske ekspresije (25). Proces apoptoze se odvija preko 3 najznačajnija puta i bez obzira o kojem putu se radi svi oni se završavaju aktivacijom kaspaza (familije cistein-zavisnih aspartatskih proteaza) koji su efektori apoptozne pojave, tj. obavljaju degradaciju ćelije (26, 27). Apoptozni

putevi su: unutrašnji put apoptoze koji dovode do poremećaja metabolizma na nivou mitohondrija, spoljašni put koji se pokreće aktivacijom receptora ćelijsku smrti koji se nalaze na membrani površine ćelije (ti receptori pripadaju tipu 1 transmembranskih proteina superfamilije faktora tumorske nekroze-TNF- *Tumor Necrosis Factor*) i alternativni mehanizam apoptoze koji se aktivira procesima stresa endoplazmatskog retikuluma koji se karakteriše poremećajem metabolizma proteina i homeostaze kalcijuma u lumenu glatkog ER (28, 29).

Hidrofilnost slobodnih i konjugovanih žučnih kiselina (žučnih soli) se smanjuje u sledećem redosledu: UDCA (ursodeoksiholna kiselina) > CA (holna kiselina) > CDCA (henodeoksiholna kiselina) > DCA (deoksiholna kiselina) > LCA (litoholna kiselina); taurinske soli žučnih kiselina > glicinske soli žučnih kiselina > slobodne žučne kiseline (30).

Zadržavanje i povećanje hidrofobnih žučnih kiselina u tokuolestaze dovodi do oštećenja ćelijske membrane i generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), sledstveno tome i do oštećenja funkcije hepatocita i smrti ćelije. Niže koncentracija hidrofobnih žučnih kiselina može da indukuje apoptozu, dok veća količina indukuje nekrozu ćelije. Takođe, istraživanja su pokazala da akumulacija hidrofobnih žučnih kiselina u sistemskoj cirkulaciji može da ispolji neželjene efekte na nivou drugih ekstrahepatičkih tkiva, uključujući kardiomiocite (31,32). Toksična dejstva žučnih kiselina su u korelaciji sa njihovom hidrofobnošću (npr. henodeoksiholna kiselina. CDCA), nasuprot tome hidrofilne žučne kiseline, npr. urodeoksiholna kiselina (UDCA) inhibicijom apoptoze pokazuje svoj protektivni mehanizam.(33). Svoj antiapoptotski mehanizam hidrofilna UDCA i njeni konjugati tj. soli, tauro i gliko- UDCA pokazuje višestruko, i to će biti predmet istraživanja ove studije. U literaturi, antiapoptozni mehanizmi su već navedena inhibicija stvaranja ROS potom modulacija mitohondrijalnog puta apoptoze u smislu morfološke i funkcionalne stabilizacije ove organele, prevencija apoptoze spoljašnim putem preko receptora ćelijske smrti i regulacija apoptoze indukovanu stresom endoplazmatskog retikuluma ( ER) (34, 35, 36).

### **Inflamacija kod oštećenja srca**

Upala ( inflamacija) je odgovor organizma na štetne podražaje, poput patogena, oštećenih stanica ili iritansa, i zaštitni je odgovor koji uključuje imune stanice, krvne žile i molekularne posrednike. Funkcija upale je ukloniti početni uzrok oštećenja stanica, ukloniti nekrotične stanice i tkiva oštećena od povrede i upalnog procesa i pokrenuti popravak tkiva (37). Infarkt miokarda(AIM) povezan je s intenzivnom upalnom reakcijom i infiltracijom infarkta s obilnim leukocitima (38).

Nakon AIM, pojava akutne ishemije miokarda uzrokuje staničnu ozljedu i smrt različitih sastojaka miokarda (kardiomiociti, endotelne stanice, fibroblasti i intersticij). To zauzvrat pokreće akutni proupalni odgovor zajedničkim djelovanjem nekoliko procesa, uključujući aktivaciju kaskade komplementa, proizvodnju reaktivnih vrsta kisika (ROS) i molekule povezane s oštećenjem (DAMP- *damage-associated molecular patterns*) koji služe kao ligandi za transmembranske receptore kao što su Toll-like receptori (TLR), RAGE receptor (*receptor for advanced glycation endproducts*) i drugi. Oni rezultiraju oslobađanjem različitih proupalnih medijatora (poput citokina i kemokina), koji indukuju regrutiranje upalnih stanica u IM zonu i pojačavaju proupalni odgovor nakon AIM (39).

TLR, koji se izražavaju u upalnim stanicama, a takođe i na endotelnim stanicama i kardiomiocitima, mogu prepoznati endogene signale opasnosti koji se oslobađaju tokom stanične smrti nakon ishemije i reperfuzije miokarda (jedan od tih signala je i *High mobility group box 1-GMGB1*- protein hromatina jezgra ćelije).

Hemokini stimuliraju hemotaktičku mobilizaciju upalnih stanica u infarkt. Razni citokini potiču adhezivne interakcije između leukocita i endotelnih stanica, što rezultira transmigracijom upalnih stanica na mjesto ozljede (40). Neutrofili migriraju u infarkt miokarda tokom prvih sati nakon početka ishemije i dosežu vrhunac nakon jednog dana. Nakon toga, monociti i makrofagi dominiraju staničnom infiltracijom i oslobađaju medijatore upale, reaktivne kisikove vrste i proteolitičke enzime, pridonoseći pokretanju i rješavanju upale, fagocitoze, proteolize, angiogeneze, zacjeljivanja infarkta i pregradnji ventrikula (41).

DAMP (*damage-associated molecular patterns- DAMP*) su supstance koje proizlaze iz stanica domaćina, uključujući mrtve ili umiruće stanice ili proizvode koji se oslobađaju iz stanica kao odgovor na signale poput hipoksije. Budući da su izvedeni iz materijala domaćina, DAMP induciraju ono što je poznato kao sterilni upalni odgovor (42, 43)

Aktivacija kaskade komplementa pridonosi akutnom proupalnom odgovoru nakon AIM. Sadrži 30 proteina i proteinskih fragmenata, od kojih mnogi cirkuliraju kao pro-enzimi i aktiviraju se proteazama, kao odgovor na DAMP i oslobađanje sadržaja kardiomiocita tokom AIM. Aktivacija komplementa rezultuje: opsonizacijom i fagocitozom, za privlačenje dodatnih fagocita, aktivacija citotoksičnih kompleksa.

Kao odgovor na DAMP, TLR, aktiviraju NF- $\kappa$ B nuklearni faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), koji potiču oslobađanje brojnih upalnih medijatora.

Nakon AIM, DAMP koji se oslobađaju umirućim kardiomiocitima induciraju aktivaciju endotelnih stanica u srcu - to karakteriše povećanu proizvodnju ROS-a i proupalnih citokina, te pojačana ekspresija adhezijskih molekula koje posreduju u vezivanju leukocita i trombocita. Neutrofili obično pružaju prvu liniju obrane od napada mikroorganizama i ozljeda tkiva. Nakon AIM, polimorfonuklearni leukociti u koštanoj srži mobiliziraju se u krv i prve su upalne stanice koje stižu do ozlijeđenog miokarda, a prisutne su u roku od nekoliko sati nakon AMI, dosežu vrhunac u danima 1–3 i počinju opadati danom (39).

Popravlak infarkta miokarda može se opisati u tri preklapajuće faze: upalna faza; proliferativna faza; i fazu sazrijevanja (44). Povećana regulacija proupalnih citokina (kao što je faktor nekroze tumora [TNF], IL-1 $\beta$  i članovi obitelji IL-6) potiču sintezu adhezijske molekule endotelnih stanica i aktiviraju integrirane leukocite, posredujući u jakim adhezivnim interakcijama koje u konačnici dovode do ekstravazacije upalnih stanica u infarkt te uzrokuju sintezu hemokina (45).

Nekrotični kardiomiociti koji oslobađaju unutarćelijske supstance tokom ishemije i nekroze, pored HMGB1 oslobađaju i druge molekule koji aktiviraju urođene imunološke signalne putove. Ekstracelularni fragmenti također pokreću upalnu signalizaciju. Čišćenje mrtvih stanica i ostataka matrice iz infarkta pokreće prelaz u sledeću fazu popravka miokarda (46).

### **Žučne kiseline, citotoksičnost i citoprotektivnost**

Žučne kiseline krajnji su proizvodi metabolizma kolesterola koje se sintetizuju u hepatocitima i oslobađaju u crijevima. žučne kiseline su amfipatičke molekule ( imaju i hidrofилна i lipofilna svojstva) esencijalne za solubilizaciju, apsorpciju i metabolizam vitamina topivih u lipidima i mastima. Glavne ljudske žučne kiseline su:

*primarne žučne kiseline*, holna kiselina (CA) i henodeksikolna kiselina (CDCA); njihovi

konjugati glicina (GCA i GCDCA) i taurina (TCA i TCDCA); i sekundarne žučne kiseline, deoksiholna kiselina (DCA) i litokolična kiselina (LCA), te njihovi konjugati glicina (GDCA i GLCA) i taurina (TDCA i TLCA).

Sojevi klostridija omogućavaju epimerizaciju 7 $\alpha$ -hidroksilne grupe CDCA u 7 $\beta$  epimer, ursodeoksiholnu kiselinu-UDCA (3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroksi-5 $\beta$ -holan-24-oičnu kiselinu) (47,48).

Zahvaljujući amfifilnoj strukturi žučne kiseline imaju tendenciju agregacije u micelle (49). Hepatociti sadrže cjelokupan set od 17 enzima neophodnih za modifikaciju holesterolskog steroidnog jezgra (50). Glavni biosintetski put žučne kiseline (poznat kao *neutralan ili klasičan*) inicira 7 $\alpha$ -hidroksilaza citokrom P-450 (CYP7A1)- ovim putem se proizvodi 90% ukupne količine žučnih kiselina (53). Alternativni (ili *kiseli*) put inicira sterol 27-hidroksilaza (CYP27A1)- sintetise se manje od 10% ukupne količine žučnih kiselina. U ljudi klasični put proizvodi CA i CDCA u približno jednakim količinama, dok kiseli put uglavnom proizvodi CDCA. (51, 52). Postoji još i Yamasaki i 25-hidroksilacioni put biosinteze žučnih kiselina, sa malim procentom sinteze žučnih kiselina u odnosu na ukupnu produkciju istih (51, 52).

U tankom crijevu žučne kiseline su podvrgnute deamidaciji i 7 $\alpha$ -dehidroksilaciji crijevnom mikrobiotom, dajući sekundarne žučne kiseline koji se zatim apsorbiraju u distalnom ileumu dovršavajući ciklus "enterohepatične cirkulacije". U svakom ciklusu dio žučnih kiselina doseže sistemsku cirkulaciju i djelomično se izlučuje putem bubrega (53). Hidrofilna / hidrofobna svojstva žučnih kiselina čine velik dio njihove uloge u apsorpciji hranjivih tvari. Indeks hidrofilnosti ovisi o broju i položaju OH skupina i o tome je li amidacija bočnog lanca glicinom ili taurinom. Žučne kiseline konjugirane s taurinom više su hidrofilne od onih konjugirane s glicinom, a trihidroksilirane žučne kiseline više su hidrofilne od dihidroksiliranih.

Žučne kiseline s visokim indeksom hidrofilnosti [ursodeoksiholna kiselina (UDCA) i CA] manje su toksične za stanice, dok su hidrofobne žučne kiseline (CDCA, DCA i LCA) obično citotoksične u koncentracijama > 200  $\mu$ M.

Koncentracije žučnih kiselina u plazmi obično su <10  $\mu$ mol / l (53). Žučne kiseline se sve više prepoznaju kao regulatorni signali tj. djeluju kao signalni molekuli koji svoju funkciju vrše i izvan enterohepatičnih tkiva aktivirajući mrežu membranskih i nuklearnih receptora (53, 54, 55).

Najbolje karakterizirani od ovih receptora su membranski receptori povezani sa G- proteinima i to receptori aktivirani žučnim kiselinama, GPBAR1 (poznat i kao TGR5 receptor- membranski G protein spregnuti receptor žučnih kiselina), muskarinski receptori te nuklearni receptori od kojih je najznačajniji receptor za farnesoid-X (FXR).

Ovi receptori pored hepatocita i enterocita također su otkriveni u srcu i vaskularnom sistemu i njihova aktivacija posreduje u vazodilatacijskim učincima žučnih kiselina u sistemskoj i splahhičnoj cirkulaciji (56).

FXR je detektovan 1995. godine kao protein aktiviran pomoću farnezola, ali važno otkriće je postignuto 1999. godine kada su žučne kiseline, označene kao najpotentniji endogeni ligandi ovog receptora u dijelu fizioloških koncentracija. CDCA je najpotentniji endogeni agonista dok su za hidrofilnu UDCA studije pokazale da ili ne ispoljava efekte prema FXR ili je slab modulator funkcije ovog nuklearnog receptora (57). Žučne soli (konjugati) čine 98% svih žučnih specija u bilijarnom sistemu, i one mogu aktivirati FXR u svim tipovima ćelija koje imaju transmembranske transportne proteine dok nekonjugovane žučne kiseline slobodno difunduju kroz ćelijsku membranu i mogu aktivirati receptor u svim tipovima ćelija (58).

Primarna hidrofobna žučna kiselina CDCA aktivira FXR. FXR može povećati proizvodnju NO (azotnog oksida) vršeći genomske i negenomske učinke na eNOS (endotelna azot oksidna

sintetaza). FXR je također u stanju inducirati transkripciju CSE (cystationin- $\gamma$ -lijaze)- enzima koji sudjeluje u stvaranju sumporovodika ( $H_2S$ ), aktivirajući određeni reaktivni element u promotoru CSE-a. CDCA također izravno aktivira  $Ca^{2+}$  aktiviranim K kanale-  $BK_{Ca}$  ( $Ca^{2+}$ -activated K channels  $BK_{Ca}$ ) na VSMC-ima tj. vaskularnim ćelijama glatkih mišića (vascular smooth muscle cells (VSMC)). Konačno, međudjelovanjem  $H_2S$  i NO nizvodno aktivacije receptora također bi moglo dovesti do recipročne regulacije proizvodnje dva plinovitih posrednika. GPBAR1 i njegova aktivacija uzrokuje eNOS i CSE aktiviranje što je rezultiralo generiranje NO i  $H_2S$  ( vazodilatatacijskih gasovitih molekula) (56). Dakle, regulatorna aktivnost koju žučne kiseline vrše na eNOS barem dijelom ovisi o FXR (59). Pored ovog genomskog učinka, postoje dokazi da aktivacija FXR-a može uzrokovati eNOS fosforilaciju. Doista, osim na transkripcijskoj razini, aktivnost eNOS-a može se regulirati i na posttranskripcijskoj razini putem fosforilacije, S- nitrozilacije i interakcije eNOS-a s drugim proteinima poput kaveolina (60).

Nuklearni FXR ima centralnu ulogu i u održavanju homeostaze žučnih kiselina regulacijom svakog aspekta njihovog metabolizma uključujući sintezu, transport, enterohepatičku recirkulaciju i detoksikaciju (61, 62).

Hidrofobnost žučnih kiselina determiniše citotoksična (npr. hidrofobna henodeoksiholna kiselina- CDCA) ali i citoprotektivna (npr. hidrofilna ursodeoksiholna kiselina- UDCA) svojstva žučnih kiselina. Prema stepenu hidrofobnosti žučne kiseline se mogu rangirati u sledećem rastućem nizu: UDCA < CA < CDCA < DCA < LCA.

Citotoksičnost hidrofobnih žučnih kiselina se ispoljava direktnim oštećenjem ćelijske membrane, interakcijom sa membranskim receptorima medijatorima ćelijske smrti (TNF receptori) te posljedičnom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i oštećenja ili smrti ćelije (31, 32, 33).

ROS uzrokuje oksidativnu oksidaciju membranskih fosfolipida mijenjajući permeabilnost iste te dovodi do alteracije aktivnosti G- protein spregnutih receptora (TGR5) i signalnih molekula vezanih ta membranu. Takođe ROS djeluje na mitohondrijalnu DNK ( $m$ DNK) koja je veoma vulnerabilna na dejstvo reaktivnih kiseoničnih radikala (ROS), tako da dolazi do smanjenja produkcije mitohondrijalnih proteina i komponenti elektron transportnog sistema (ETS) odnosno umanjuje se bioenergetski kapacitet organele (63).

Žučne kiseline imaju sposobnost aktivacije protektivnih signala za preživljavanje ćelije i inhibicije citotoksičnosti. Navedeni protektivni mehanizmi uključuju nuklearni faktor- $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ - dovodeći do njegove inhibicije), i dovodeći do stimulacije fosfatidilinozitol 3kinaze (PI3K) i mitogenima-aktivisanu protein kinazu (MAPK) (64). Stimulusi za preživljavanje pokreću intracelularne signale aktivacijom transmembranskih receptora. Žučne kiseline balansiraju između stimulacije receptora ćelijske smrti i citoprotektivnih staničnih puteva, pri čemu balans ili prevaga na jednu stranu zavisi od same vrste žučne kiseline.

Hidrofilna UDCA aktivacijom glukokortikoidnog receptora suprimira NF-  $\kappa B$  i naknadnu produkciju upalnih citokina čime ostvaruje svoju antiinflamatornu ulogu (65).

Niže koncentracija hidrofobnih žučnih kiselina može da indukuje apoptozu, dok veća količina indukuje nekrozu ćelije. (31,32).

Toksični efekti hidrofobne CDCA i protektivno dejstvo hidrofilne UDCA na biohemijske i funkcionalne promjene srca u modelu oštećenja miokarda će biti predmet istraživanja ove studije. Primarno će se posmatrati CDCA i UDCA i uloga navedenih kiselina u oksidativnom stresu, apoptozi i inflamaciji.

## LITERATURA

1. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patient presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2011; 32:2999-3054.
2. Boarescu PM, Chirilă I, Bulboacă AE, Bocșan IC, Pop RM, Gheban D, et al. Effects of curcumin nanoparticles in isoproterenol-induced myocardial infarction. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019(Mi).
3. Jokšić R, i sar. Bol u grudima-Važan vodič u dijagnozi akutnog koronarnog sindroma. *ABC-časopis urgentne medicine.* 2011; 11(1):12-17.
4. Nolan JP, Soar J, Zideman AD, Biarent D, Bossaert LL, Deakin C, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010. *Resuscitation.* 2010; 81:1219-76.
5. Pavlović P, Tavčioski D, Stamenković E. Agregacija trombocita, disfunkcija endotela i akutni infarkt miokarda. *Vojnosan Preg* 2009;66(4):323-27.
6. Libby P. Current Concepts of the Pathogenesis of the ACS. *Circulation* 2001;104:365-7.
7. Apfle FS, Smith SW, Pearce LA, Murakami MM. Assessment of the Multiple Biomarker Approach for diagnosis of Myocardial Infarction in Patient with Symptoms Suggestive of Acute Coronary Syndrome. *Clin Chem.* 2009; 55(1):93-100.
8. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res.* 2016;119(1):91-112.
9. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53(1):31-47.
10. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews.* 2007;87:315-424.
11. Chatterjee M., Saluja R., Kanneganti S., Chinta S., Dikshit M. Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cellular and Molecular Biology.* 2007;53:84-93.
12. Ceriello A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care.* 2008;31(2):181-184.
13. Van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress In heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(4):425-35.
14. Tanzilli G, Trusculli G, Arrivi A, Carnevale R, Placanica A, Viceconte N, et al. Glutathione infusion before primary percutaneous coronary intervention: A randomised controlled pilot study. *BMJ Open.* 2019;9(8).
15. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:13.
16. Matablak V, Theiss C, Matablak J. Oxidative stress: the lowest common denominator of



multiple diseases. *Neural Regen Res.* 2019 Feb;14(2):238-241

17. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan; 5(1): 9–19
18. Al-Gubory KH, Garrel C., Faure P., Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reproductive Biomedicine Online.* 2012;25:551-560.
19. Hansen JM, Go YM, Jones DP. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signalling, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2006;46:215-234.
20. Glasauer A., Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology.* 2014;92:90–101.
21. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanism of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013;1830:3217–3266.
22. Jain D, Russell RR, Schwartz RG, Panjra GS, Aronow W. Cardiac Complications of cancer therapy: pathophysiology, identification, prevention, treatment, and future directions. *Curr Cardiol Rep.* 2017;19(5):36.
23. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension.* 2007;49(2):241–8.
24. Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res.* 2009;50(9):1721-34.
25. Barrasa JI, Olmo N, Lizarbe MA, Turnay J. Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules. *Toxicol In Vitro.* 2013;27(2):964-77.
26. Cao L, Quan XB, Zeng WJ, Yang XO, Wang MJ. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *J Cell Death.* 2016;9:19-29.
27. Fesik S. W., Shi Y. Controlling the caspases. *Science.* 2001;294(5546):1477–1478.
28. Cao L, Quan XB, Zeng WJ, Yang XO, Wang MJ. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *J Cell Death.* 2016;9:19-29.
29. Stankov K, Bogdanovic G, Stankov S, Draskovic D, Grubor-Lajsic G, Spasic M, et al. Expression analysis of genes involved in apoptosis, proliferation and endoplasmic reticulum stress in ionomycin/PMA treated Jurkat cells. *J BUON.* 2012;17(2):369-76.
30. Stojančević M, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Front Life sci.* 2013;7(3-4):112-22.
31. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 2009;15(14):1677-89.
32. Masubuchi N, Sugihara M, Sugita T, Amano K, Nakano M, Matsuura T. Oxidative stress markers, secondary bile acids and sulfated bile acids classify the clinical liver injury type: Promising diagnostic biomarkers for cholestasis. *Chem Biol Interact.* 2016;255:8391.
33. Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EJ. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci.* 2011;121(12):523-44.
34. Rodrigues CM, Sola S, Sharpe JC, Moura JJ, Steer CJ. Tauroursodeoxycholic acid prevents

- Bax-induced membrane perturbation and cytochrome C release in isolated mitochondria. *Biochemistry*. 2003;42(10):3070-80.
35. Azzaroli F, Mehal W, Soroka CJ, Wang L, Lee J, Crispe IN, et al. Ursodeoxycholic acid diminishes Fas-ligand-induced apoptosis in mouse hepatocytes. *Hepatology*. 2002;36(1):49-54.
  36. Vang S, Longley K, Steer CJ, Low WC. The unexpected uses of urso- and tauroursodeoxycholic acid in the treatment of non-liver diseases. *Glob Adv HealthMed*. 2014;3(3):58-69.
  37. Ferrero ML, Nielsen OH, Andersen PS, Giarardin SE et al. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 beta generation. *Immunol*. 2007;147(2):227-35.
  38. Mallory GK, White PD, Salcedo-Salgar J. The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases. *Am Heart J*. 1939;18:647.
  39. Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, Mukhametshina RT, Kwek XY, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*. 2018;186:73-87.
  40. Liu J, Wang H, Li J. Inflammation and Inflammatory Cells in Myocardial Infarction and Reperfusion Injury: A Double-Edged Sword. *Clin Med Insights Cardiol*. 2016;10:79-84.
  41. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct Inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121(22):2437-45.
  42. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal Os that spur autophagy and immunity. *Immunol.Rev*.2012;249(1):158-175.
  43. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):1-5.
  44. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012;110:159-173.
  45. Maekawa N, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:1229-1235.
  46. Huang S, Frangogiannis NG. Anti inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges. *Br J Pharmacol*. 2018;175(9):1377-1400.
  47. Wahlstrom A, Sayin SI, Marschall HU, Backhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab*. 2016;24(1):41-50.
  48. Long SL, Gahan CGM, Joyce SA. Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2017;56:54-65.
  49. Natalini B, Sardella R, Gioiello A, Ianni F, Di Michele A, Marinozzi M. Determination of bile salt critical micellization concentration on the road to drug discovery. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;87:62-81.
  50. Vaz FM, Ferdinandusse S. Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2017;56:10-24.
  51. Nakagawa M, Setchell KD. Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res*. 1990;31(6):1089-98.
  52. Salen G, Shefer S, Cheng FW, Dayal B, Batta AK, Tint GS. Cholic acid biosynthesis: the

- enzymatic defect in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Clin Invest.* 1979;63(1):38-44.
53. Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 2009;50:1955-1966.
  54. Fiorucci S, Distrutti E. Bile acid-activated receptors, intestinal microbiota, and the treatment of metabolic disorders. *Trends Mol Med.* 2015;21:702-714.
  55. Fiorucci S, Mencarelli A, Palladino G, Cipriani S. Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30:570-580.
  56. Fiorucci S, Zampella A, Cirino G, Bucci M, Distrutti E. Decoding the vasoregulatory activities of bile acid-activated receptors in systemic and portal circulation: role of gaseous mediators. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;312(1):21-32.
  57. Sepe V, Distrutti E, Fiorucci S, Zampella A. Farnesoid X receptor modulators (2011 - 2014): a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2015;25(8):885-96.
  58. Vaquero J, Monte MJ, Dominguez M, Muntane J, Marin JJ. Differential activation of the human farnesoid X receptor depends on the pattern of expressed isoforms and the bile acid pool composition. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(7):926-39.
  59. Li J, Wilson A, Kuruba R, Zhang Q, Gao X, He F, Zhang LM, Pitt BR, Xie W, Li S. FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2008;77:169-177.
  60. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:821-861.
  61. Copple BL, Li T. Pharmacology of bile acid receptors: Evolution of bile acids from simple detergents to complex signaling molecules. *Pharmacol Res.* 2016;104:9-21.
  62. Li S, Ni A, Feng GS. Bridging cell surface receptor with nuclear receptors in control of bile acid homeostasis. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(1):113-8.
  63. Eschenhagen T, Force T, Ewer MS, de Keulenaer GW, Suter TM, Anker SD, et al. Cardiovascular side effects of cancer therapies: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail.* 2011;13(1):1-10.
  64. Qiao L, Yacoub A, Studer E, Gupta S, Pei XY, Grant S, et al. Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology.* 2002;35(4):779-89.
  65. Miura T, Ouchida R, Yoshikawa N, Okamoto K, Makino Y, Nakamura T, et al. Functional modulation of the glucocorticoid receptor and suppression of NF- $\kappa$ B- dependent transcription by ursodeoxycholic acid. *J Biol Chem.* 2001;276(50):47371-8

**Избор литературе је одговарајући?**

**ДА**

**НЕ**

#### **IV.4 Циљеви истраживања**

##### **Ciljevi istraživanja**

1. Ispitati efekte izoprenalinom (ISO) indukovanog oštećenja srca pacova na:

- koncentracije srčanih biomarkera u serumu pacova: visoko senzitivni Troponin T (hsTnT), laktatna dehidrogenaza (LDH), aspartat aminotransferaza (AST), kreatin kinaza (CK), kreatin kinaza MB (CK MB), N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida (NT-pro BNP)

- enzimske markere oksidativnog stresa (superoksid dismutazu, katalazu, glutation) i markere remodelovanja u homogenatu srca pacova: aktivnost enzima matriksnih metaloproteinaza 2 (MMP 2) i matriksnih metaloproteinaza 9 (MMP-9)

- markere inflamacije u serumu pacova: C reaktivni protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), faktor nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ )

- biohemijske markere u serumu pacova: glukoze, uree, kreatinina, mokraćne kiseline, albumina, ukupnih proteina, hepatogram (alanin aminotransferaza-ALT, alkalna fosfataza- AP, gama glutamil transferaza- $\mu$ GT), lipidni status (HDL-holesterol, LDL holesterol, ukupni holesterol, trigliceridi), homocistein

- markere hemostaze u plazmi pacova: fibrinogen, D-dimer, von Willebrand-ov faktor

- patohistološke promjene u srcu pacova (prisustvo neutrofila u polju oštećenja, površina polja oštećenja)

2. Ispitati efekte ursodeoksiholne (UDCA) kiseline na navedene parametre na modelu oštećenja srca izazvanog ISO

3. Ispitati efekte henodeoksiholne (CDCA) na navedene parametre na modelu oštećenja srca pacova izazvanog ISO

4. Ispitati efekte karboksimetilceluloze - CMC (vehikuluma) na navedene parametre na modelu oštećenja srca pacova izazvanog ISO

5. Ispitati efekte UDCA, CDCA i CMC na navedene parametre na modelu pacova davanjem fiziološkog rastvora umjesto ISO.

Циљеви истраживања су одговарајући?

ДА

НЕ

#### IV.5 Хипотезе истраживања: главна и помоћне хипотезе

Davanjem henodeoksiholne kiseline (CDCA) djeluje se nepovoljno a davanjem ursodeoksiholne kiseline (UDCA) djeluje se povoljno na vrijednosti funkcionalnih i biohemijskih pokazatelja srčane aktivnosti kao i na stepen oštećenja tkiva srca izazvanog izoprenalinom (ISO)

Хипотезе истраживања су јасно дефинисане?

ДА

НЕ

#### IV.6 Очекивани резултати хипотезе

##### Очекивани резултати

Резултати ове студије би помогли у бољем разумијевању изопреналином индукваног оштећења срца, као и у разумијевању повољних или неповољних ефеката које се могу постићи примјеном

žučnih kiselina (UDCA, CDCA) u ovom modelu kardiotsičnosti.

Praćenjem dinamike biohemijskih parametara krvi, markera oksidacionog stresa i inflamacije, ishemijske i remodelovanja u tkivu srca pacova omogućilo bi se razjašnjenje dobijenih promjena u uslovima izoprenalinom indukovane oštećenja srca.

U istraživanju bi se obuhvatile i patohistomorfološke promjene na srcu.

Saznanja koja proisteknu iz ove studije mogu da budu od kliničkog značaja za osmišljavanje eventualno novih terapijskih smjernica u slučajevima hemijski indukovane kardiotsičnosti, odnosno u kardioprotekciji.

**Очекивани резултати представљају значајан научни допринос?** ДА НЕ

#### IV.7 План рада и временска динамика

**Faza I** – ispitivat će se efekti pojedinačne aplikacije:

- 0,9% NaCl-a 0.2 ml s.c
- ISO u dozi od 85 mg/kg TM s.c.

**Faza II** – ispitivat će se efekti pojedinačne aplikacije:

- ursodeoksiholne kiseline (UDCA) uz izoprenalin.
- henodeoksiholne kiseline (CDCA) uz izoprenalin.
- karboksi metil celuloze (CMC) 0,5% uz izoprenalin ; trajanje 15 dana.

**Faza III** – ispitivat će se efekti pojedinačne aplikacije:

- ursodeoksiholne kiseline (UDCA) uz 0.9% NaCl
- henodeoksiholne kiseline (CDCA) uz 0.9% NaCl
- karboksi metil celuloze (CMC) 0,5% uz 0.9% NaCl; trajanje 15 dana.

**Faza IV**

- Cervikalna dislokacija i uzimanje uzorka krvi pri žrtvovanju
- Hirurško izolovanje srca za biohemijsku analizu homogenata srca, kao i za patohistološku analizu; trajanje 3 dana.

**Faza V**

- Priprema uzoraka tkiva srca za određivanje koncentracije proteina, katalaze, SOD, MMP-2 i MMP-9, te patohistološku i morfometrijsku analizu; trajanje 30 dana.

**Faza VI**

- Statistička obrada podataka; trajanje 30 dana.

Zbog većeg eksperimentalnih životinja, neće biti moguće uraditi sve grupe u isto vrijeme.

**План рада и временска динамика су одговарајући?** ДА НЕ

#### IV.8 Метод и узорак истраживања

##### **Експерименталне животиње**

Istraživanje je osmišljeno kao eksperimentalna studija na pacovima soja *Wistar albino*, starosti 3-4 sedmice i početne tjelesne mase oko 200-250 g na početku eksperimenta. Životinje će biti aklimatizovane najmanje 7 dana prije intervencije i biće čuvane u pleksiglasnim

providnim kavezima sa žičanim poklopcem (dvije životinje po kavezu) sa dnom obloženim suškom, sa hranom i vodom dostupnom *ad libitum* i konstantnim ambijentalnim uslovima (temperatura  $21 \pm 2$  °C; vlažnost vazduha  $55 \pm 5$  %; ciklusom svjetlo-tama na 12 sati sa početkom svijetlog perioda u 08 00 h i tamnog perioda u 20 00 h). Istraživanje će se sprovoditi u skladu sa dozvolom Etičkog odbora za zaštitu dobrobiti eksperimentalnih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, uz poštovanje Pravilnika o čuvanju, načinu njege postupanju i lišavanju života eksperimentalnih životinja.

### **Eksperimentalni protokol**

Model oštećenja miokarda pacova je zasnovan na aplikaciji izoprenalina (ISO) u predjelu leđa subkutano u dozi od 85 mg/kg TM, dva puta u intervalu od 24 sata (68). Eksperimentalni model oštećenja miokarda kod pacova biće dokazan analizom dinamike produkcije biomarkera oštećenja srca u serumu (serum je dobijen uzorkovanjem krvi nakon žrtvovanja životinje) kao i potvrđivanjem odgovarajućim patohistološkim nalazom na srcu (takođe nakon žrtvovanja životinje).

In vivo ogled podrazumijeva formiranje dva različita eksperimentalna modela: kontrolnu grupu i eksperimentalnu grupu.

Kontrolna grupa će imati 1 grupu (podgrupu).

Eksperimentalna grupa će imati ukupno 7 grupa (podgrupa).

U **fazi I** će se ispitivati efekti pojedinačne aplikacije:

- 0,9% NaCl-a 0.2 ml s.c. u predjelu leđa, dva puta u razmaku od 24 h (kontrolna grupa, broj životinja je 8, n=8 )

- ISO u dozi od 85 mg/kg TM s.c. u predjelu leđa u razmaku od 24 h, broj životinja je 8, n=8  
24 h nakon druge injekcije 0,9% NaCl-a i ISO planirano je žrtvovanje životinja cervikalnom dislokacijom ili giljotinom za male eksperimentalne životinje - a životinje se prije eutanazije (žrtvovanja) uvode u anesteziju pomoću uretana 1,25 gr/kg TM (5 ml/kg TM 25%-tnog vodenog rastvora) intraperitonealno (i.p.).

	Dan 1		Dan 2		Dan 3
	NaCl		NaCl		Eutanazija
0 n=8	1		2		3
	Dan 1		Dan 2		Dan 3
	ISO		ISO		Eutanazija
0 n=8	1		2		3

U **fazi II** će se ispitivati efekti pojedinačne aplikacije:

- ursodeoksiholne kiseline (UDCA) u dozi od 25 mg/kg TM 10 dana per os gastričnom sondom, broj životinja je 8, n=8

- henodeoksiholne kiseline (CDCA) u dozi od 25 mg/kg TM 10 dana per os gastričnom sondom, broj životinja je 8, n=8

- karboksi metil celuloze (CMC) 0,5% koja je vehikulum za žučne kiseline a aplikovaće se se takođe 10 dana per os gastričnom sondom, broj životinja je 8, n=8.

U fazi II će se dva dana pred žrtvovanje aplikovati ISO u razmaku od 24 h u dozi od 85 mg/kg TM u predjelu leđa s.c. a 24 h nakon druge injekcije ISO planirano je žrtvovanje životinja cervikalnom dislokacijom ili giljotinom za male eksperimentalne životinje. Životinje će se prije

eutanazije (žrtvovanja) uvoditi u anesteziju pomoću uretana 1,25 gr/kg TM (5 ml/kg TM 25%-tnog vodenog rastvora) intra petitonealno (i.p.).

Dan 1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>Eutanazija</b>	
								<b>+ ISO</b>	<b>+ ISO</b>		
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
n=8											

Dan 1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>Eutanazija</b>	
								<b>+ ISO</b>	<b>+ ISO</b>		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
n=8											

Dan 1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
<b>CMC</b>	<b>CMC</b>	<b>CMC</b>	<b>CMC</b>	<b>CMC</b>	<b>CMC</b>	<b>CMC</b>	<b>CMC</b>	<b>CMC</b>	<b>CMC</b>	<b>Eutanazija</b>	
								<b>+ ISO</b>	<b>+ ISO</b>		
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
n=8											

U **fazi III** će se ispitivati efekti pojedinačne aplikacije:

- ursodeoksiholne kiseline (UDCA) u dozi od 25 mg/kg TM 10 dana per os gastričnom sondom, broj životinja je 8, n=8

- henodeoksiholne kiseline (CDCA) u dozi od 25 mg/kg TM 10 dana per os gastričnom sondom, broj životinja je 8, n=8

- karboksi metil celuloze (CMC) 0,5% koja je vehikulum za žučne kiseline a aplikovaće se se takođe 10 dana per os gastričnom sondom, broj životinja je 8, n=8.

U fazi III će se umjesto izoprenalina subkutano (s.c.) u predjelu leđa aplikuje 0.9% NaCl 0.5 ml s.c. u istom periodu (dva dana pred žrtvovanje u razmaku od 24 h).

Na završetku faze III eksperimenta (24 h nakon druge injekcije 0.9 % NaCl-a) planirano je žrtvovanje cervikalnom dislokacijom ili giljotinom za male eksperimentalne životinje.

Životinje će se prije eutanazije (žrtvovanja) uvoditi u anesteziju pomoću uretana 1,25 gr/kg TM (5 ml/kg TM 25%-tnog vodenog rastvora) intra petitonealno (i.p.).

Dan 1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>UDCA</b>	<b>Eutanazija</b>	
								<b>+ NaCl</b>	<b>+ NaCl</b>		
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
n=8											

Dan 1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.	
<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>CDCA</b>	<b>Eutanazija</b>	
								<b>+ NaCl</b>	<b>+ NaCl</b>		
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

n=8	Dan 1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.	Dan 5.	Dan 6.	Dan 7.	Dan 8.	Dan 9.	Dan 10.	Dan 11.
	CMC	CMC	CMC	CMC	CMC	CMC	CMC	CMC	CMC + NaCl	CMC + NaCl	Eutanazija
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
n=8											

**U fazi IV** će se žrtvovati životinje, te će se nakon žrtvovanja životinja uzimati se krv za biohemijsku analizu, vršiće se hirurško izolovanje srca za biohemijsku analizu homogenata srca, kao i za patohistološku analizu.

Nakon izolovanja, srce će se isprati fiziološkim rastvorom (0.9 % NaCl) i osušiti filter papirom. Potom će se tkivo srca za patohistološku analizu odlagati u pripremljene posude sa formalinom čuvane na sobnoj temperaturi, dok će se za potrebe biohemijskih ispitivanja tkivo homogenizovati i centrifugirati 10 minuta na 10000 obrtaja. Nadtalog će se zamrznuti na -20° C dok ne bude vršena analiza. Krv za određivanje biohemijskih parametara dobijaće se prikupljanjem krvi u specijalne epruvete postupkom iskrvarenja životinje. Nakon prikupljanja, uzorci krvi će odstajati 15 min na sobnoj temperaturi, a zatim će biti centrifugirani (15 min. na 3000 obrtaja), i potom analizirani (plazma ili serum). Pri eksperimentima će biti poštovane odredbe propisanih akata (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC) i principa etičnosti.

Istraživanje će se sprovoditi ukupno sa 64 životinje ( 16 u fazi I, 24 u fazi II i 24 u fazi III). Biće oformljeno 8 grupa, a u svakoj grupi ( podgrupi) biće po životinja (n=8).

**U fazi V** će se vršiti priprema uzoraka tkiva srca za određivanje koncentracije proteina, katalaze, SOD, MMP-2 i MMP-9, te patohistološku i morfometrijsku analizu.

**U fazi VI** će se vršiti statistička obrada podataka.

Метод и узорак су одговарајући? ДА НЕ

#### IV.9 Мјесто, лабораторија и опрема за експериментални рад

Centar za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjaluci i Katedra za Fiziologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjaluci.

Услови за експериментални рад су одговарајући? ДА НЕ

#### IV.10 Методе обраде података

Za statističku obradu rezultata upotrebiće se metode deskriptivne statistike (srednja vrijednost, standardna greška, standardna devijacija i varijansa). Za testiranje razlika između grupa upotrebiće se parametrijska ili neparametrijska analiza varijanse sa odgovarajućim posthoc testom (Bonferonni/Kruskall-Wallis/Tukey), a za testiranje razlika između grupa Wilcoxon-ov test za vezane uzorke. Za analizu podataka koristiće se statistički program SPSS 20.0 for



Windows i MedCalc.

Предложене методе су одговарајући?

ДА

НЕ

## V ЗАКЉУЧАК

Кандидат је подобан	<u>ДА</u>	НЕ
Тема је подобна	<u>ДА</u>	НЕ

Образложење (до 500 карактера):

Predložena tema „Uloga henodeoksiholne i ursodeoksiholne kiseline na funkcionalne i biohemijske promjene srca na modelu izoprenalinske kardiotoksičnosti kod pacova“ je aktuelna i zanimljiva, kako sa načnog tako i sa stručnog aspekta. Hipoteza je zasnovana na naučnim dokazima, jasno definisana. Predmet i ciljevi istraživanja su dobro strukturisani i usaglašeni sa predloženim naslovom. Izbor naučnih metoda i literature je dobar. Rezultati istraživanja daće konkretan naučni i praktični doprinos.

Na osnovu analize prijave teme doktorske disertacije, biografije kandidata Dalibora Mihajlović, magistra medicinskih nauka, mišljenja smo da kandidat ispunjava sve propisane uslove koji su neophodni za odobrenje i izradu teme doktorske disertacije u skladu sa važećim propisima Zakona o visokom obrazovanju i Statuta Univerziteta u Banjoj Luci.

Mentor, prof. dr Velibor Vasović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, ispunjava sve neophodne uslove za mentorstvo.

Komentor, prof. dr Ranko Škrbić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci ispunjava sve neohodne uslove za komentorstvo.

Датум:



Председник комисије



Члан 1



Члан 2