

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ФАКУЛТЕТ:



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊА ЛУЦИ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ БАЊА ЛУЦА
Образац -3

Примљено:	1.3. 2023.	
Орг. јед.	Број	Прилог

jeidoj

ИЗВЈЕШТАЈ
о оцјени урађене докторске дисертације

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

На основу члана 149. Закона о високом образовању Републике Српске (Службени гласник Републике Српске бр. 67/20), члана 54. Статута Универзитета у Бањој Луци и члана 18. Статута Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, Научно-Наставно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци на редовној сједници одржаној 08.02.2023. године донијело је Одлуку бр. 18/3.129/2023 о именовању Комисије за оцјену урађене докторске дисертације мр сц. мед. Зориславе Бајић, под називом „Ефекти лираглутида на функционалне и биохемијске промјене срца у експерименталном моделу оштећења миокарда изазваног изопреналином“ у саставу:

1. Ранко Шкрбић, редовни професор, ужа научна област Фармакологија, токсикологија и клиничка фармакологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, предсједник
2. Ненад Понорац, редовни професор, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан
3. Владимира Јаковљевић, редовни професор, ужа научна област Физиологија, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, члан

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Зорислава Бајић, рођена је 02.10.1978. године у Бањој Луци, Република Српска, Босна и Херцеговина.

Након завршеног Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, уписала је

постдипломски студиј „Биомедицинска истраживања“, те 07.09.2011. године одбранила магистарски рад под називом „Утицај аеробне физичке активности на метаболизам кости и тјелесну композицију“, чиме је стекла звање магистар медицинских наука.

Студијски програм III циклуса Биомедицинских наука на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци уписала је школске 2019/2020. године.

III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације мр сц. мед. Зориславе Бајић је „Ефекти лираглутида на функционалне и биохемијске промјене срца у експерименталном моделу оштећења миокарда изазваног изопреналином“. Тема докторске дисертације је прихваћена од стране Научно-наставног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, Одлуком бр. 18/3.378/2021 донесеном 17.06.2021. године, а Сенат Универзитета у Бањој Луци је Одлуком бр. 02/04-3.1558-47/21 донесеном 01.07.2021. године дао сагласност на Извјештај Комисије за оцјену подобности теме, кандидата и ментора за израду докторске дисертације на Медицинском факултету, мр сц. мед. Зориславе Бајић под називом „Ефекти фолне киселина и витамин Б6 на функционалне и биохемијске промјене срца у експерименталном моделу оштећења миокарда изазваног изопреналином“. За ментора је именован проф. др Драган Ђурић, редовни професор, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет Универзитета у Београду, а за коментора проф. др Милош Стојиљковић, редовни професор, ужа научна област Фармакологија и токсикологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци.

На приједлог ментора и коментора за израду докторске дисертације, а због потешкоћа у реализацији пројекта, предложена је измјена наслова теме дисертације. Научно-наставно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, Одлуком 18/3.497/2022 донесеном 09.06.2022. године, а Сенат Универзитета у Бањој Луци Одлуком бр. 02/04-3.1395-67/22 донесеном 07.07.2022. године дао је сагласност за промјену наслова теме у „Ефекти лираглутида на функционалне и биохемијске промјене срца у експерименталном моделу оштећења миокарда изазваног изопреналином“.

Докторска дисертација кандидата мр сц. мед. Зориславе Бајић је написана ћириличним писмом, фонтом *Times New Roman* величине слова 12 pt, са проредом

1.5, на 125 стране, формат А4. На почетку дисертације налази се 9 страна које нису нумерисане, а то су насловна страна докторске дисертације на српском и енглеском језику, резиме на српском и енглеском језику, и садржај. На крају дисертације налази се 10 ненумерисаних страна које садрже:

- Листу скраћеница
- Биографију кандидата
- Потписану Изјаву о ауторству
- Потписану Изјаву којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да се докторска дисертација учини јавно доступном
- Потписану Изјаву о аутентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације.

Addendum који се налази на крају дисертације садржи научне радове из ове области у којима је кандидат аутор.

Дисертација садржи 48 слика и 11 табела. У дисертацији је цитирано 219 литерарних извора.

Урађена докторска дисертација је представљена у 8 следећих поглавља:

1. Увод, написан на 32 стране
2. Радне хипотезе, написане на 1 страни
3. Циљеви истраживања, написани на 1 страни
4. Материјал и методе, написани на 9 страна
5. Резултати, приказани на 39 страна
6. Дискусија, написана на 13 страна
7. Закључци, написани на 1 страни
8. Литература, наведена на 20 страна

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

У поглављу **Увод** наведен је значај проучавања кардиоваскуларних болести. Описани су различити облици оштећења миокарда, као што су акутни инфаркт миокарда, срчана инсуфицијенција и Такоцубо синдром, као и патофизиолошки механизми који доводе до појаве ових оболења.

Патофизиолошки механизми оштећења миокарда су веома комплексни и укључују оксидативни стрес, инфламацију и ремоделовање срца. Посебна пажња

посвећена је улози оксидативног стреса и антиоксидативној заштити, те локалном и системском инфламаторном одговору, који могу довести до промјене облика срца, односно ремоделовања срца, које за посљедицу има нарушену срчану функцију.

Описан је експериментални модел оштећења срца изазван изопреналином, у чијој патогенези учествују оксидативни стрес, инфламација и апоптоза, процеси који су карактеристични за акутни инфаркт миокарда и Такоцубо синдром. Овај експериментални модел је кориштен у докторској дисертацији.

Агонисти рецептора глукагону сличног пептида 1 (*glukagon-like peptide-1 receptor agonists; GLP-1RAs*) имају значајно место у лијечењу дијабетеса тип 2, али су показали и извјесна кардиопротективна дејства.

У поглављу **Радне хипотезе** представљене су радне хипотезе истраживања: Примјена лираглутида у превенцији акутног оштећења миокарда и превенцији попуштања срца:

1. снижава маркере оштећења миокарда изазваног изопреналином
2. поправља липидни профил код оштећења миокарда изазваног изопреналином
3. смањује концентрацију прооксиданаса и повећава ниво антиоксиданаса
4. спречава настанак апоптозе кардиомиоцита
5. повољно утиче на електрокардиографски (ЕКГ) регистроване функционалне карактеристике срца код пацова којима је оштећење миокарда индуковано изопреналином
6. повољно утиче на електрокардиографски и ехокардиографски (ЕХО) регистроване функционалне карактеристике срца код пацова којима је оштећење миокарда индуковано изопреналином
7. спречава настанак попуштања срца

У поглављу **Циљеви истраживања**, јасно су дефинисани циљеви:

1. Испитати ефекте индуктора оштећења срца изопреналина на:
 - 1) Промјене у електричном запису активности срца пацова
 - 2) Промјене у ехокардиографским параметрима срца пацова
 - 3) Индекс срчане масе (ИСМ), одређен помоћу формуле: ИСМ = [маса срца (g) / тјелесна маса пацова (g)] · 1000
 - 4) Концентрацију серумских маркера оштећења срчаног мишића пацова: високо сензитивни тропонин I (hsTnI), N- терминални прохормон можданог

- натриуретског пептида (NT-proBNP), аспартат аминострансферазу (AST), аланин аминострансферазу (ALT), лактат дехидрогеназу (LDH)
- 5) Маркере оксидативног стреса у лизату еритроцита: супероксид дисмутазу (SOD), каталазу (CAT), редуковани глутатион (GSH)
 - 6) Прооксидативне маркере у плазми: реактивне супстанце тиобарбитурне киселине (TBARS), азот моноксид мјерен у форми нитрита (NO_2^-), водоник пероксид (H_2O_2), супероксид анјон радикал (O_2^-)
 - 7) Биохемијске маркере у серуму пацова: хомоцистеин (Hcy), глукозу, укупни холестерол, LDL, HDL, триглицериде
 - 8) Патохистолошке промјене у срцу пацова (присуство инфламације у пољу оштећења, оштећење кардиомиоцита)
 - 9) Имунохистохемијску анализу апоптозе у миокарду
2. Испитати ефекте примјене лираглутида на наведене параметре у превенцији акутног оштећења миокарда изазваног изопреналином.
3. Испитати ефекте примјене лираглутида на наведене параметре у превенцији попуштања срца изазваног изопреналином.

Кратак преглед претходних истраживања и литературе

Резултати *Global Burden of Disease Study* показују да се у периоду од 1990. до 2019. године преваленција свих кардиоваскуларних болести (КВБ) у свијету скоро удвостручила (од 271 милиона до 523 милиона) и да се број смрти од ових болести значајно повећао у овом периоду (од 12.1 милиона на 18.6 милиона) (1). Процјењује се да ће до 2030. године КВБ бити узрок више од 23 милиона смрти (2). Напори да се побољша лијечење акутног инфаркта миокарда, који представља један од водећих узрока смрти, су резултирани усавршавањем медикаментозне терапије, примјеном перкутаних коронарних интервентних процедура и стратегија за примарну и секундарну превенцију које би довеле до смањења број умрлих од ових оболења. Акутни инфаркт миокарда представља некрозу кардиомиоцита која настаје као посљедица пролонгиране исхемије која доводи до неравнотеже између допремања крви коронарним крвним судовима и потреба миокарда. Акутни инфаркт миокарда је повезан са инфламаторним одговором и промјеном екстрацелуларног матрикса због ослобађања слободних радикала и протеолитичких ензима, који воде ка ремоделовању миокарда (3). Инфламаторни процес у оквиру

оштећења миокарда одређује величину лезије, снажнији одговор условљава већу лезију (4,5).

У базичним истраживањима постоје многобројни анимални модели оштећења срца (миокарда), а један од најчешћих је субкутана примјена изопреналина. Изопреналин 4-[1-хидрокси-2(изопропиламино)етил]бензен-1,2-диол хидрохлорид је синтетички катехоламин и β -адренергички агонист који узрокује тешки стрес у миокарду и доводи до оштећења миокарда уколико се примјени у субмаксималним дозама (6). Изопреналин својим агонистичким дејством стимулише β -адренергичке рецепторе и на тај начин остварује утицај на контрактилност кардиомиоцита, енергетски метаболизам и учествује у ремоделовању срца (7–9). На моделу пацова, изопреналин изазива миокардну некрозу која доводи до срчане дисфункције, повећане липидне пероксидације, повећане концентрације миокардних липида, измијењене ензимске и антиоксидативне активности (6). Механизам којим изопреналин изазива инфаркт миокарда обухвата производњу високо цитотоксичних слободних радикала путем аутооксидације катехоламина (6). Појава липидне пероксидације у изопреналинском моделу оштећења миокарда је документована повећаном концентрацијом реактивних супстанци тиобарбитурне киселине (TBARS) (10–18). Код експерименталних животиња којима је изазвано оштећење миокарда, повећано је стварање реактивних кисеоничних врста (ROS), а долази и до дилатације лијеве коморе, контрактилне дисфункције и ремоделовања лијеве коморе. Поред повећања оксидативног стреса, оштећење и инсуфицијенција срца се карактеришу исцрпљивањем урођеног антиоксидативног одбрамбеног механизма. У кардиомиоцитима, као и у већини ћелија, главне ендогене компоненте антиоксидативног одбрамбеног механизма су SOD, CAT, глутатион пероксидаза (GPx) и GSH. Неколико студија је забиљежило значајно смањење активности SOD, CAT и GPx у анималним моделима срчане инсуфицијенције (19–21). Изопреналин испољава ефекте и на хемодинамске параметре регистроване електрокардиографијом, а који зависе од дужине излагања изопреналину и начина апликације. Иако се сматра да изопреналин има позитивно инотропно дјеловање (22), резултати неких студија су показали да он може имати и негативне инотропне ефekte (23,24). Патофизиолошке и морфолошке промјене настале у срцу на моделу пацова са оштећењем миокарда изазваним изопреналином могу се упоредити са оним које се дешавају у инфартку миокарда код људи, а понајвише са Такуцубо синдромом, стресом индукованом кардиомиопатијом (6).

GLP-1RAs су синтетички агенси који се корсите у терапији дијабетеса тип 2.

Они подстичу лучење инзулина из бета ћелија а супримирају секрецију глукагона из алфа ћелија панкреаса. Поред тога, GLP-1RAs успоравају пражњење желуца и изазавају осјећај ситости на нивоу централног нервног система. Они опонашају инкретин хормоне нашег организма, GLP-1, везујући се за одговарајуће рецепторе (25). Експресија GLP-1 рецептора присутна је у бројним типовима кардиоваскуларних ћелија као што су моноцити/макрофаги, глатке мишићне ћелије, ендотелне ћелије и кардиомиоцити (26,27). Лираглутид је GLP-1RA који осим свог примарног ефекта снижавања глукозе у крви, дјелује кардиопротективно и неуропротективно. Третман лираглутидом побољшава ендотелну и срчану функцију кроз супресију оксидативног стреса и инфламације. Он блокира липидну пероксидацију, стимулише антиоксидансе, повећава биорасположивост NO, редукује проинфламаторне цитокине и профибротичке биомаркере (28–30).

Литература:

1. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76(25):2982–3021.
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380(9859):2095–128.
3. Boarescu PM, Chirilă I, Bulboacă AE, Bocşan IC, Pop RM, Gheban D, et al. Effects of curcumin nanoparticles in isoproterenol-induced myocardial infarction. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:7847142.
4. Axford-Gatley RA, Wilson GJ. Reduction of experimental myocardial infarct size by oral administration of α tocopherol. *Cardiovasc Res.* 1991;25(2):89–92.
5. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53(1):31–47.
6. Afroz R, Tanvir EM, Karim N, Hossain MS, Alam N, Gan SH, et al. Sundarban Honey Confers Protection against Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Wistar Rats. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6437641.
7. Nagoor Meeran MF, Jagadeesh GS, Selvaraj P. Catecholamine toxicity triggers

- myocardial membrane destabilization in rats: Thymol and its counter action. RSC Adv. 2015;5(54):43338–44.
8. Hemalatha KL, Mainzen Prince PS. Preventive effects of zingerone on cardiac mitochondrial oxidative stress, calcium ion overload and adenosine triphosphate depletion in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. RSC Adv. 2016;6(113):112332–9.
 9. Xiang Y. Compartmentalization of β -adrenergic signals in cardiomyocytes. Circ Res. 2011;109(2):231–244.
 10. Abdelzaher WY, Ahmed SM, Welson NN, Alsharif KF, Batiha GES, Labib DAA. Dapsone Ameliorates Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction via Nrf2/ HO-1; TLR4/ TNF- α Signaling Pathways and the Suppression of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rats. Front Pharmacol. 2021;12:669679.
 11. Abukhalil MH, Hussein OE, Aladaileh SH, Althunibat OY, Al-Amarat W, Saghir SA, et al. Visnagin prevents isoproterenol-induced myocardial injury by attenuating oxidative stress and inflammation and upregulating Nrf2 signaling in rats. J Biochem Mol Toxicol. 2021;35(11):e22906
 12. Zaafan MA, Abdelhamid AM. The cardioprotective effect of astaxanthin against isoprenaline-induced myocardial injury in rats: Involvement of TLR4/NF- κ B signaling pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2021;25(11):4099–105.
 13. Hasan R, Lasker S, Hasan A, Zerin F, Zamila M, Chowdhury FI, et al. Canagliflozin attenuates isoprenaline-induced cardiac oxidative stress by stimulating multiple antioxidant and anti-inflammatory signaling pathways. Sci Rep. 2020;10(1):14659.
 14. Hamed AB, Mantawy EM, El-Bakly WM, Abdel-Mottaleb Y, Azab SS. Putative anti-inflammatory, antioxidant, and anti-apoptotic roles of the natural tissue guardian methyl palmitate against isoproterenol-induced myocardial injury in rats. Futur J Pharm Sci. 2020;6(1):31.
 15. Ismail DI, ShamsEldeen AM, Rashed LA, Shama AAED, Ashour SS, Aboulkhair AG. Cardioprotective potential of zinc and vitamin E against isoprenaline-induced myocardial infarction in Albino rats by targeting autophagy: A histological and biochemical study. Egypt J Histol. 2021;44(2):450–64.
 16. Kabir F, Nahar K, Rahman MM, Al Mamun A, Faruk M, Hossain MH, et al. Beetroot powder supplementation prevents oxidative stress and inflammatory cells infiltration in isoprenaline-induced myocardial damage in rats. Med J Nutrition

- Metab. 2019;12(2):197–209.
17. Pullaiah CP, Nelson VK, Rayapu S, Narasimha Kumar G V., Kedam T. Exploring cardioprotective potential of esculetin against isoproterenol induced myocardial toxicity in rats: in vivo and in vitro evidence. BMC Pharmacol Toxicol. 2021;22(1):43.
 18. Wu J, Fu Y, Wu Y xing, Wu Z xiang, Wang Z hua, Li P. Lycorine ameliorates isoproterenol-induced cardiac dysfunction mainly via inhibiting inflammation, fibrosis, oxidative stress and apoptosis. Bioengineered. 2021;12(1):5583–94.
 19. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. Am J Pathol. 1996;148(1):291–300.
 20. Khaper N, Singal PK. Effects of afterload-reducing drugs on pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure in rats. J Am Coll Cardiol. 1997;29(4):856–61.
 21. Khaper N, Kaur K, Li T, Farahmand F, Singal PK. Antioxidant enzyme gene expression in congestive heart failure following myocardial infarction. Mol Cell Biochem. 2003;251(1–2):9–15.
 22. Sarantos-Laska C, McCulloch MW, Rand MJ, Laska FJ. The Positive Inotropic Action of Isoprenaline Is Associated With the Release of Noradrenaline From Rabbit, Guinea-Pig and Rat Atria. J Auton Pharmacol. 1984;4(3):175–83.
 23. Prendergast CE, Shankley NP, Black JW. Negative inotropic effects of isoprenaline on isolated left atrial assays from aged transgenic mice with cardiac over-expression of human β 2-adrenoceptors. Br J Pharmacol. 2000;129(7):1285–8.
 24. Collins HE, Rodrigo GC. Inotropic response of cardiac ventricular myocytes to β -adrenergic stimulation with isoproterenol exhibits diurnal variation: Involvement of nitric oxide. Circ Res. 2010;106(7):1244–52.
 25. Howell R, Wright A, Clements J. Clinical potential of liraglutide in cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes: evidence to date. Diabetes Metab Syndr Obes. 2019;12:505–12.
 26. Andrikou E, Tsiofis C, Andrikou I, Leontsinis I, Tousoulis D, Papanas N. GLP-1 receptor agonists and cardiovascular outcome trials: An update. Hell J Cardiol. 2019;60(6):347–51.
 27. Ma X, Liu Z, Ilyas I, Little PJ, Kamato D, Sahebka A, et al. Glp-1 receptor agonists (Glp-1ras): Cardiovascular actions and therapeutic potential. Int J Biol Sci. 2021;17(8):2050–68.

28. Taşkıran E, Erdoğan MA, Yiğitürk G, Erbaş O. Therapeutic Effects of Liraglutide, Oxytocin and Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Model: An Experimental Animal Study. *Cardiovasc Toxicol.* 2019;19(6):510–7.
29. AlAsmari AF, Ali N, AlAsmari F, AlAnazi WA, AlShammari MA, Al-Harbi NO, et al. Liraglutide attenuates gefitinib-induced cardiotoxicity and promotes cardioprotection through the regulation of MAPK/NF-κB signaling pathways. *Saudi Pharm J.* 2020;28(4):509–18.
30. Sukumaran V, Tsuchimochi H, Sonobe T, Waddingham MT, Shirai M, Pearson JT. Liraglutide treatment improves the coronary microcirculation in insulin resistant Zucker obese rats on a high salt diet. *Cardiovasc Diabetol.* 2020;19(1):24.

V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

У поглављу **Материјал и методе** приказани су материјал и методе које су кориштене у овој докторској дисертацији, а које су у складу са постављеним циљевима. У истраживању су кориштени мужјаци *Wistar albino* пацова који су држани у контролисаним лабораторијским условима. Огледне животиње, процедуре и протоколе одобрила је Етичка комисија за заштиту и добробит огледних животиња Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци (број 18/1.190-13/22, 01.06.2022. године). Кориштена су два експериментална модела оштећења миокарда изазваног изопреналином: модел акутног оштећења миокарда и модел попуштања срца.

Примјена лираглутида у превенцији акутног оштећења миокарда – групе животиња

Све животиње (n=29) претходно су третиране физиолошким раствором или лираглутидом током 10 дана, а 9. и 10. дана су примали физиолошки раствор или изопреналин. Оне су подијељене у 4 групе:

1. **К група:** 0.9% NaCl 1 ml/kg TM током 10 дана + 0.9% NaCl 1 ml/kg TM 9. и 10. дана
2. **И група:** 0.9% NaCl 1 ml/kg TM током 10 дана + изопреналин 85 mg/kg TM 9. и 10. дана
3. **Л група:** лираглутид у дози од 1.8 mg/kg TM током 10 дана + 0.9% NaCl 1

ml/kg ТМ 9. и 10. дана

4. **Л+И група:** лираглутид у дози од 1.8 mg/kg ТМ током 10 дана + изопреналин 85 mg/kg ТМ 9. и 10. дана

Примјена лираглуттида у превенцији попуштања срца – групе животиња

Све животиње (n=29) су третиране физиолошким раствором или изопреналином 1. и 2. дана, а наредних 7 дана су примали физиолошки раствор или лираглутид. Оне су подијељене у 4 групе:

1. **К група:** 0.9% NaCl 1 ml/kg ТМ 1. и 2. дана + 0.9% NaCl 1 ml/kg ТМ током наредних 7 дана
2. **И група:** изопреналин 85 mg/kg ТМ 1. и 2. дана + 0.9% NaCl 1 ml/kg ТМ наредних 7 дана
3. **Л група:** 0.9% NaCl 1 ml/kg ТМ 1. и 2. дана + лираглутид у дози од 1.8 mg/kg ТМ наредних 7 дана
4. **И+Л група:** изопреналин 85 mg/kg ТМ 1. и 2. дана + лираглутид у дози од 1.8 mg/kg ТМ наредних 7 дана

ЕКГ снимање у експерименталном протоколу испитивања ефеката лираглуттида у превенцији акутног оштећења срца изазваног изопреналином обављено је :

- 1) 9. дана експеримента, прије прве дозе изопреналина
- 2) 9. дана експеримента, 10 минута након прве дозе изопреналина
- 3) 11. дана експеримента, 24 часа након друге дозе изопреналина а непосредно прије жртвовања.

У експерименталном протоколу испитивања ефеката лираглуттида у превенцији попуштања срца изазваног изопреналином ЕКГ снимање обављено је :

- 1) 1. дана експеримента, прије прве дозе изопреналина
- 2) 1. дана експеримента, 10 минута након прве дозе изопреналина
- 3) 10. дана експеримента, прије жртвовања

На крају експеримента у којем се испитивала примјена лираглуттида у превенцији срчаног попуштања, 10. дана, свим пацовима је урађена ехокардиографија (EXO).

На крају оба експериментална птотокола узети су узорци серума и плазме, те су изолована срца.

Узорци серума су се користили за мјерење:

- маркера оштећења миокарда - hsTnI, NT-proBNP, AST, ALT, LDH
- других биохемијских параметара - глукоза, хомоцистеин, укупни холестерол,

HDL, LDL, триглицериди.

Узорци плазме су се користили за мјерење:

- маркера оксидативног стреса - TBARS, NO₂⁻, H₂O₂, O₂⁻.

Узорци лизата еритроцита су кориштени за мјерење:

- маркера антиоксидативне заштите – SOD, CAT, GSH.

Патохистолошка и имунохистохемијска анализа

Након жртвовања животиња из оба експериментална протокола, изолована срца су стављена у мале пластичне посуде са 10% формалином за хистолошку анализу. Ткиво је фиксирано имерзионим поступком у 4% неутрално пуферисаном формалдехиду у току најмање 24 h. Исјечци срца су обожени хематоксилин-еозин методом. За анализу се користио светлосни микроскоп са “wide zoom” камером.

Имунохистохемијска нализа је урађена за узорке ткива из експерименталног протокола у којем је испитивана примјена лираглутида у превенцији акутног оштећења миокарда. Испитивани су проапоптотски и антиапоптотски маркери. Кориштена су антитијела за Bcl-2, BAX, каспазу 3 и NF-κB, те је анализиран % позитивних ћелија.

Промјене у односу на биохемијске анализе које су предвиђене у пријави ове докторске дисертације су везане за анализе које нису могле бити урађене из техничких разлога (недовољна сензитивност комерцијаних китова за одређивање концентрације биомаркера): NT-proBNP није мјерен у експерименталном протоколу у којем су се испитивали ефекти лираглутида у превенцији акутног оштећења миокарда; интелеукин (IL)-6 и фактор некрозе тумора (TNF-α) - нису добијене мјерљиве вриједности. Пријавом докторске дисертације није планирана имунохистохемијска анализа миокарда, али је додатно урађена у експерименталном протоколу испитивања ефеката лираглутида у превенцији акутног оштећења миокарда како би се испитао утицај лираглутида на апоптозу код пацова третираних изопреналином.

За статистичку обраду резултата употребљене су методе дескриптивне статистике (средња вриједност, стандардна грешка, стандардна девијација и варијанса). За тестирање разлика између група користили су се параметријски (ANOVA) или непараметријски (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney U) и одговарајући posthoc тестови (Bonferroni/Tukey/LSD). За анализу података кориштен је статистички програми SPSS 20.0.

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

У поглављу **Резултати** јасно су приказани, те правилно и прецизно тумачени, резултати истраживања. У поглављу **Дискусија** резултати су анализирани у односу на резултате претходних истраживања из ове области.

Кратак преглед добијених резултата:

Резултати примјене лираглуттида у превенцији акутног оштећења миокарда

ЕКГ анализа је показала повећање срчане фреквенције и скраћење QT интервала, те повећање амплитуде QRS код акутног оштећења миокарда изазваног изопреналином са највећом стопом у изопреналинској групи након прве дозе изопреналина. Примјена лираглуттида је ублажила повећање срчане фреквенције, повећање амплитуде QRS и смањење QT интервала. Примјена лираглуттида је конвертовала негативне Т таласе у позитивне, показујући његов повољан ефекат у превенцији акутног оштећења миокарда. Примјена лираглуттида је превенирала и појаву аритмија изазваних изопреналином.

Резултати су показали да је ниво hsTnI значајно повећан у групи И у односу на К ($p<0.001$), што је доказ да је изопреналин изазвао акутно оштећење миокарда. Примјена лираглуттида је превентирала овај скок hsTnI. Регистрована је повећана активност AST и ALT у И групи ($p<0.05$ у поређењу са К), док је примјена лираглуттида ублажила ове ефекте изопреналина.

TBARS показао је значајно повећање у групи третираној изопреналином ($p<0.05$ у поређењу са контролом), што указује на учешће изопреналина у оксидативном стресу. Примјена лираглуттида је показала антиоксидативне ефекте код акутног оштећења миокарда изазваног изопреналином ($p<0.05$). Изопреналин је изазвао смањен ниво NO_2^- ($p<0.001$ у поређењу са контролом). Нивои H_2O_2 и O_2^- повећали су се у групи која је примала изопреналин, али је примјена лираглуттида смањила производњу ROS. SOD, CAT и GSH показали су значајно смањење у групи третираној изопреналином ($p>0.05$, $p<0.05$ и $p<0.001$, редом). Примјена лираглуттида је показала изузетно повољне ефекте на активност CAT ($p<0.05$) и ниво GSH ($p<0.05$).

Примјена лираглуттида у превенцији акутног оштећења миокарда је ублажила промјене изазване изопреналином видљиве на хистолошком препарату миокарда. Имунохистохемијска анализа је показала да је лираглуттиду значајно смањио

проценат позитивних ћелија на ВАХ, каспазу 3 и NF-кВ, а повећао проценат Bcl-2 позитивних ћелија, односно превенирао апоптозу узроковану изопреналином.

Резултати примјене лираглуттида у превенцији попуштања срца

Највећи пораст фреквенције срца и редукција QT интервала, те пораст амплитуде QRS забиљежени су након прве дозе изопреналина ($p<0.001$). Прије жртвовања уочен је највећи пад QRS амплитуде код пацова третираних изопреналином ($p<0.001$ у односу на контролу).

Од ултразвучних параметара, анализирани су дебљина септума у дијастоли и систоли (IVSd и IVSs), унутрашњи дијаметар лијеве коморе у дијастоли и систоли (LVIDd и LVIDs), дельина задњег зида у дијастоли и систоли (PWDd и PWDs), енд-дијастолни волумен (EDV), енд-систолни волумен (ESV), ударни волумен (SV), ејекциона фракција (EF) и фракционо скраћење (FS). Примјена лираглуттида у превенцији попуштања срца ублажила је промјене IVSd, IVSs, PWDs, PWDd, LVIDs, и превенирала промјене ESV и EF.

Код пацова третираних изопреналином забиљежен је изразити пораст концентрације hsTnI у плазми, а седмодневна примјена лираглуттида је ублажила ову промјену. NT-proBNP је највишу концентрацију достигао у групи пацова који су примали изопреналин ($p<0.05$ у односу на контролну групу). Лираглутид је ублажио ову промјену. Оштећење миокарда довело је и до пораста активности ALT ($p<0.05$ у односу на K). Третман лираглутидом је ублажио пораст активности овог ензима код попуштања срца.

Примјена лираглуттида је снизила концентрацију глукозе, али је хипогликемијски ефекат изопреналина био израженији ($p<0.05$ у односу на K).

Код попуштања срца изазваног изопреналином дошло је до значајног пораста TBARS, а третман лираглутидом је превенирао липидну пероксидацију ($p<0.05$ у односу на И).

Третман лираглутидом није значајно промијенио концентрацију NO_2^- . Концентрација H_2O_2 код попуштања срца изазваног изопреналином је значајно виша у односу на контролу ($p<0.05$). Антиоксидативни ефекат примјене лираглуттида је израженији код здравих пацова у односу на оне који су третирани изопреналином. Концентрација O_2^- је показала сличан тренд као код већ описаних радикала, пораст у И групи, и пад у Л групи. Активност SOD, CAT и ниво GSH су снижена код пацова код којих се развило срчано попуштање, а седмодневни третман лираглутидом је

показао изражен антиоксидативни потенцијал лираглуттида код здравих пацова. Лираглутид је дјелимично превенирао промјене које су се десила код попуштања срца.

Хистолошка анализа је показала да примјена лираглуттида ублажава оштећење миокарда код попуштања срца изазваног изопреналином.

Резултати докторске дисертације показују да лираглутид, GLP-1 RA, осим хипогликемијских, има и значајна кардиопротективна дејства, како у превенцији акутног оштећења миокарда, тако и у превенцији попуштања срца. Кардиопротективна дејства лираглуттида обухватају антиоксидативно, које се огледа кроз повећање активности антиоксидативних ензима, антинфламаторно, које се манифестије кроз хистолошке промјене ткива, као и антиапоптотско, потврђено кроз пораст антиапоптотских, а пад проапоптотских маркера.

VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

Докторска дисертација mr сц. мед. Зориславе Бајић, под насловом „Ефекти лираглуттида на функционалне и биохемијске промјене срца у експерименталном моделу оштећења миокарда изазваног изопреналином“ урађена је према одобреној пријави и принципима израде научно-истраживачког рада, те представља оригинално и самостално дјело кандидата. Докторска дисертација по својој свеобухватности, добијеним резултатима и изнијетим закључцима представља оригинални допринос медицинској научној мисли и сагледавању значаја примјене лираглуттида у кардиопротекцији. Резултати ове дисертације и описани ефекти лираглуттида на функционалне и биохемијске промјене у оштећеном миокарду отварају могућност клиничке примјене лираглуттида у кардиопротекцији, како у предтретману, тако и у третману. Резултати ове докторске дисертације имају велики научни допринос, јер нам базични експерименти на анималном моделу оштећења миокарда дају податке о значајним повољним ефектима лираглуттида, не само на метаболизам глукозе, него и на функцију и очување миокарда. Они указују на могућност примјене овог лијека у клиничкој пракси код пациентата који имају ризик од оштећења (као предтретман прије оперативних захвата на срцу) или већ евидентно оштећење срца (као третман кардиомиопатија, као што је Такоцубо синдром).

Имајући у виду остварене резултате, Комисија предлаже Научно-наставном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци да усвоји извјештај и позитивну оцјену докторске дисертације мр сц. мед. Зориславе Бајић под насловом „Ефекти лираглутида на функционалне и биохемијске промјене срца у експерименталном моделу оштећења миокарда изазваног изопреналином“ и омогући кандидату јавну одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Датум: 27.02.2023. год.

Бања Лука, Крагујевац

1. Проф. др Ранко Шкрбић, ужа научна област Фармакологија, токсикологија и клиничка фармакологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, предсједник

2. Проф. др Владимир Јаковљевић, ужа научна област Физиологија, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан

3. Проф. др Ненад Понорац, ужа научна област Физиологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан

ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извјештај образложење, односно разлог због којих не жели да потпише извјештај.