

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 20.05.2021. godine, broj 9700/14-JJ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uticaj vitamina B6 i folne kiseline na funkcionalne, biohemijske i imunohistohemijske karakteristike kardiovaskularnog sistema pacova sa srčanom insuficijencijom izazvanom monokrotalinom“

kandidata dr Jovane Jakovljević Uzelac, zaposlenoj na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Mentor je Prof. dr Dragan Đurić, Institut za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr TATJANA SIMIĆ, predsednik, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu, dopisni član SANU
2. Prof. dr BRANISLAV MILOVANOVIĆ, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr VLADIMIR JAKOVLJEVIĆ, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Jovane Jakovljević Uzelac napisana je na srpskom jeziku, u skladu sa Satutom Univerziteta u Beogradu i Pravilnikom o doktorskim studijama na Univerzitetu u Beogradu. Sadrži ukupno 117 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 11 tabela i 57 slika; prve 4 slike (ilustracije) su preuzete i prevedene iz naučne literature koja je regularno citirana u tekstu i u spisku referenci. Doktorska disertacija sadrži još: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, biografiju doktoranda, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **Uvodu** su opisani definicija i značaj srčane insuficijencije sa osvrtom na socioepidemiološke podatke. Navedeni su najčešći epidemiološki podaci za nastanak srčane insuficijencije. Na detaljan način opisani su patofiziološki mehanizmi srčane insuficijencije, sa prikazom mogućih novih mehanizama. Opisane su do sada poznate činjenice o neurohumoralnim mehanizmima prisutnim u sindromu srčane insuficijencije. Dat je detaljan

opis uticaja oksidativnog stresa kao posledice povećanih nivoa neurohormona u cirkulaciji i hemodinamskog poremećaja, zatim inflamacije i smanjene isporuke kiseonika. Opisan je proces remodelovanja kao posledica složenog niza neurohumoralnih i inflamatornih odgovora na oštećenje srca. Kroz uvodna razmatranja dat je opis kliničkih i terapijskih aspekata, kao i prikaz različitih klasifikacija srčane insuficijencije. Značaj vitamina B grupe kao i efekti deficita, kako kod ljudi tako i kod eksperimentalnih životinja, detaljno su navedeni u uvodnom razmatranju. Detaljno su opisane karakteristike vitamina B6 i folne kiseline. Dat je prikaz i opis različitih eksperimentalnih modela srčane insuficijencije sa posebnim akcentom i detaljnim opisom monokrotalinskog modela indukovanja srčane insuficijencije. Detaljnim prikazom relevantnih informacija i konciznim opisom poznatih činjenica o srčanoj insuficijenciji i uticaju vitamina B6 i folne kiseline na kardiovaskularni sistem, uvodnim izlaganjem je postavljena dobra osnova zadatim ciljevima ove doktorske disertacije.

Ciljevi rada su precizno definisani, a sastoje se od ispitivanja funkcionalnih karakteristika srca (ehokardiografskih) i koncentracije pokazatelja oštećenja srca u serumu (koncentracija troponina T (hs cTnT)) radi potvrde animalnog modela srčane insuficijencije; koncentracije homocisteina, glukoze, ukupnog holesterola (CHL), holesterola velike gustine (HDL), triglicerida (TGL), aktivnosti enzima transaminaza (aspartat-aminotransferaza-AST, alanin-aminotransferaza-ALT), alkalne fosfataze (ALP) i α -amilaze, pokazatelja funkcije bubrega (urea, kreatinin), ukupnih proteina (TP), albumina (ALB), mokraćne kiseline (UA) i IL-6, CRP, fibrinogena, D-dimera i *von Willebrand*-ovog faktora u krvi pacova. Dalji ciljevi su bili i da se odrede parametri oksidativnog stresa u tkivu srca pacova (aktivnost enzima: superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx), status tiola, sadržaj nitrotirozina, sadržaj karbonilnih grupa), koncentracija oksidovanog (GSSG) i ukupnog glutationa (GSH) i ukupna S-glutationilacija proteina u tkivu srca pacova, kao i da se ispituju strukturne karakteristike srca određivanjem histomorfoloških promena u srcu (debljina zida leve i desne komore, i međukomorskog zida, kao i dimenzija kardiomiocita u zidu leve komore), i imunohistohemijski odredi ekspresija pokazatelja proliferativnog kapaciteta (Ki67, PCNA) u kardiomiocitima i fibroblastima intersticijuma.

U poglavlju **Materijal i metode** je jasno opisan eksperimentalni protokol u kom su korišćeni mužjaci pacova soja *Wistar* albino. Navedeno je da su životinje nabavljene iz akreditovanog vivarijuma u Beogradu, i čuvane u pleksiglas-transparentnim kavezima, pod standardnim ambijentalnim uslovima za životinje. Sve vreme trajanja eksperimenta voda i hrana su bili dostupni *ad libitum*. Naznačeno je da su svi eksperimentalni postupci bili u skladu sa Evropskom direktivom o dobrobiti laboratorijskih životinja (br. 2010/63/EU) i odobreni od strane Etičkog komiteta za brigu o životinjama Univerziteta u Beogradu (licenca broj 323-07-01339/2017-05/2). Indukcija srčane insuficijencije je izvršena jednokratnom intraperitonealnom primenom monokrotalina (C₁₆H₂₃NO₆, molekulske mase 325.361 g/mol) u dozi od 50 mg/kg telesne mase. Navedeno je da su pre početka, ali i tokom istraživačkog perioda, sve životinje bile pod stalnim praćenjem, pri čemu je nedeljno registrovana telesna masa svake životinje. Opisan je metod ehokardiografskih merenja u cilju verifikovanja modela srčane insuficijencije. Opisan je detaljan metod određivanja biohemijskih parametara u serumu i plazmi, kao i parametara oksidativnog stresa u tkivu srca pacova. Precizno je opisana i *Western blot* tehnika određivanja ukupne S-glutationilacije proteina u tkivu srca pacova. Opisan je metod histomorfometrijske analize. Imunohistohemijskim bojenjem učinjena je kvantifikacija ćelija u proliferaciji (Ki67 i PCNA) u tkivu srca pacova.

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

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

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

Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 301 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je nakon aplikacije monokrotalina u odnosu na kontrolnu grupu došlo do porasta troponina T, glukoze, faktora *von Willebrand*, zatim značajnog smanjenja HDL, ukupnih proteina i albumina, kao i značajnim smanjenjem aktivnosti α -amilaze, ali i očuvanom funkcijom bubrega i jetre. Došlo je do hipertrofije zida desne komore i značajnog povećanja Ki67 i PCNA pozitivnosti u zidu desne komore. Povećala se aktivnost oba antioksidantna enzima, superoksid dizmutaze i glutacion peroksidaze. Ukupni sadržaj glutaciona, nivo tiolnog statusa i karbonilnih grupa, kao i sadržaj nitrotirozina bili su smanjeni u grupi tretiranoj monokrotalinom u odnosu na kontrolnu grupu. Densitometrijska analiza je pokazala smanjen nivo glutacionilacije proteina u monokrotalinskoj grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Nakon dve nedelje od tretmana unutrašnji prečnik desne komore (RVID) statistički značajno se povećao u poređenju sa početnim vrednostima kod pacova tretiranih monokrotalinom i u poređenju sa kontrolnom grupom. Nije bilo promena u ejectionnoj frakciji leve komore (LVEF) u poređenju sa početnim vrednostima kod pacova tretiranih monokrotalinom i u poređenju sa kontrolnom grupom. Nakon aplikacije vitamina B6 kod monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije uočen je trend smanjenja troponina T, značajno smanjenje AST, albumina i *von Willebrand*-ovog faktora, porast aktivnosti α -amilaze, kao i povećanje CHL i HDL. Zatim, prisutno je značajno zadebljanje zida leve komore i interventrikularnog septuma, i trend smanjenja debljine zida desne komore. Smanjena je Ki67 i PCNA pozitivnost u zidu desne komore. Aktivnost SOD-a je blago smanjena nakon aplikacije vitamina B6 kod monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije, dok je aktivnost GPx-a visoko statistički značajno smanjena nakon aplikacije vitamina B6 kod monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije u poređenju sa monokrotalinskom grupom. Došlo je do porasta ukupnog glutaciona, sadržaja tiolnih grupa, karbonilnih grupa kao i nitrotirozina. Ukupni nivo glutacionilacije blago se smanjio nakon aplikacije vitamina B6. Nakon aplikacije folne kiseline kod monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije prisutan je trend smanjenja troponina T, značajno smanjenje albumina i *von Willebrand*-ovog faktora, kao i povećanje CHL, ali i značajno smanjenje aktivnosti enzima alkalne fosfataze. Uočeno je značajno zadebljanje interventrikularnog septuma, i trend smanjenja debljine zida desne komore. Smanjena je Ki67 i PCNA pozitivnost u zidu desne komore. Aktivnost SOD-a značajno je smanjena, dok je GPx aktivnost pokazala trend porasta u poređenju sa monokrotalinskom grupom. Došlo je do smanjenja vrednosti ukupnog glutaciona, sadržaja tiolnih i karbonilnih grupa, kao i sadržaja nitrotirozina u poređenju sa monokrotalinskom grupom. Ukupni nivo glutacionilacije je porastao nakon aplikacije folne kiseline. Nakon udružene aplikacije vitamina B6 i folne kiseline kod monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije prisutan je trend smanjenja troponina T i *von Willebrand*-ovog faktora, kao i značajno povećanje CHL i TGL, dok je aktivnost enzima ALP značajno smanjena, a aktivnost α -amilaze je značajno povećana. Prisutno je značajno zadebljanje zida leve komore i interventrikularnog septuma, i trend zadebljanja zida desne komore. Povećana je Ki67 i PCNA pozitivnost u zidu desne komore. Posle primene vitamina B6 i folne kiseline, aktivnosti SOD i GPx su se smanjile u poređenju sa monokrotalinskom grupom. Vrednosti ukupnog glutaciona su se značajno smanjile, kao i sadržaj tiolnih grupa, karbonilnih grupa i nitrotirozina, u poređenju sa

monokrotalinskom grupom. Ukupan nivo glutacionilacije se povećao nakon udružene aplikacije vitamina B6 i folne kiseline u poređenju sa monokrotalinskom grupom.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Brojni podaci iz literature ukazuju na to da eksperimentalno indukovana srčana insuficijencija, izazivanjem plućne arterijske hipertenzije, što se postiže primenom makrocikličnog pirolizidin alkaloida-monokrotalina, dovodi do promena vaskularnog zida, povećanja plućnog vaskularnog otpora, hipertrofije desnog srca i oksidativnog stresa (Gomez-Arroyo et al.). Primena mikronutrijenata mogla bi da optimizuje ukupni metabolizam insuficijentnog srca i modulira molekularne mehanizme odgovorne za progresiju srčane slabosti, uključujući hipertrofiju, oksidativni stress, inflamaciju, disfunkciju endotela, fibrozu, angiogenezu i apoptozu. Neke studije su pokazale da vitamin B6 ima antioksidativni efekat inhibirajući stvaranje superoksidnog radikala, smanjujući peroksidaciju lipida (Cabrini et al., 1998; Maranesi et al., 2004; Selvam i Ravichandran, 1991). Mnoga zapažanja ističu važnost vitamina B6 kao značajnog, nezavisnog faktora rizika za kardiovaskularne bolesti, a u nekim (Robinson et al., 1998), ali ne u svim studijama kontrole slučaja, nedostatak vitamina B6 je očigledno povezan sa većim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Friso et al., 2004; Robinson et al., 1998), iako su klinička ispitivanja svedočila da suplementacija vitaminom B6 nije efikasna u slučaju ponavljanja kardiovaskularnih događaja (Wilmink et al., 2004; Albert et al., 2008; Toole et al., 2004). Takođe je predloženo da dodatak vitamina B6 može imati zaštitne efekte u primarnoj prevenciji, ali ne i u sekundarnoj (Jayedi i Zargar, 2018). Primena folne kiseline u zdravoj populaciji pokazala je da je veći unos folata koristan za smanjenje rizika od koronarne bolesti (Alfthan et al., 2003; Tucker et al., 1996; Medrano et al., 2000). Folna kiselina (vitamin B9) je neophodna za pravilno funkcionisanje endotela (Chambers, 2000). Takođe, primećeno je da dvomesečna suplementacija folata kod zdravih ispitanika nije smanjila nivo NT-pro BNP-a (Herrmann et al., 2007). Smatra se da suplementi vitamina B6 i folne kiseline imaju „dva lica“, gde se benefiti mogu uočiti u fazi prevencije, a kada već dođe do pojave bolesti, efekat je oslabljen. Pretpostavlja se da je suplementacija vitaminima B grupe efikasna kod pacijenata bez kardiovaskularnih događaja, dok nije efiksna kod pacijenata koji su ih već imali (Lotto et al., 2011). S-glutacionilacija proteina se odigrava reverzibilnom interakcijom tripeptida glutaciona sa proteinskim tiolom stvaranjem disulfidne veze. Usled oksidativnog stresa, veliki broj mehanizama odgovoran je za pojavu S-glutacionilacije (Zweier et al., 2011). S-glutacionilacija utiče ili na fosfataze i/ili kinaze i taj odnos između glutacionilacije i fosforilacije može biti presudan za pravilno funkcionisanje srčanih proteina. Poremećaji u statusu glutacionilacionih proteina mogu doprineti etiologiji mnogih kardiovaskularnih bolesti, poput infarkta miokarda, srčane hipertrofije i ateroskleroze (Pastore i Piemonte, 2013). Protein Ki67 prisutan je tokom svih aktivnih faza ćelijskog ciklusa (G1, S, G2 i mitoze), ali odsustvuje u G0 fazi (Scholzen et al., 2000), što dovodi do činjenice da Ki67 može biti marker proliferacije, ali ne mora nužno rezultirati dupliranjem ćelija (Novoyatleva et al., 2010; Tamamori-Adachi et al., 2008). Kajstura et al. (1998) pokazali su proliferaciju miocita kod srčane insuficijencije. Neke studije su pokazale da kod srčane insuficijencije može započeti ćelijski ciklus (povećana ekspresija Ki-67 antigena), ali ne i nužno dovršiti, i još uvek nije poznato da li ove promene imaju bilo kakvu prognostičku ulogu. Mohammadi et al. (2012), otkrili su da su vanćelijski nivoi superoksid dismutaze i glutation peroksidaze, kod pacova tretiranih monokrotalinom, značajno smanjeni četiri nedelje nakon tretmana. S druge strane, istraživanje Picharda et al. (1999), koji su merili aktivnosti antioksidativnih enzima 3 nedelje nakon primene monokrotalina, nisu pokazali razliku između kontrolne grupe i grupe tretirane monokrotalinom. Farahmand et al. (2004) su pokazali značajan porast aktivnosti antioksidativnih enzima u srčanom tkivu, praćen

povećanjem debljine zida septuma 2 nedelje nakon primene monokrotalina. U pomenutoj studiji početna regulacija aktivnosti antioksidativnih enzima nakon primene monokrotalina praćena je njihovim smanjenjem i pojačanom peroksidacijom lipida 6 nedelja nakon tretmana, sugerišući da sličan dvofazni obrazac promena može takođe postojati u razvoju insuficijencije desne komore, barem u monokrotalinskom modelu.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Jakovljević Uzelac J, Djukic T, Mutavdzin S, Stankovic S, Labudovic Borovic M, Rakocevic J, Natasa Milic N, Savic-Radojevic A, Vasic M, Japundzic Zigon N, Simic T, and Djuric D. The influence of subchronic co-application of vitamins B6 and folic acid on cardiac oxidative stress and biochemical markers in monocrotaline-induced heart failure in male Wistar albino rats. Can J Physiol Pharmacol. 2020 Feb;98(2):93-102. doi: 10.1139/cjpp-2019-0305. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31505124.

Jakovljević Uzelac J, Djukic T, Radic T, Mutavdzin S, Stankovic S, Kostic Rakocevic J, Labudovic Borovic M, Milic N, Simic T, Savic-Radojevic A, and Djuric D. Folic acid affects cardiometabolic, oxidative stress, and immunohistochemical parameters in monocrotaline-induced rat heart failure. Can J Physiol Pharmacol. 2020 Oct;98(10):708-716. doi: 10.1139/cjpp-2020-0030. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32353247.

E) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „UTICAJ VITAMINA B6 I FOLNE KISELINE NA FUNKCIONALNE, BIOHEMIJSKE I IMUNOHISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE KARDIOVASKULARNOG SISTEMA PACOVA SA SRČANOM INSUFICIJENCIJOM IZAZVANOM MONOKROTALINOM”, autora Jovane Jakovljević Uzelac, konstatovano je da podudaranje teksta iznosi broj 8%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njegove disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uticaj vitamina B6 i folne kiseline na funkcionalne, biohemijske i imunohistohemijske karakteristike kardiovaskularnog sistema pacova sa srčanom insuficijencijom izazvanom monokrotalinom“ dr Jovane Jakovljević Uzelac, predstavlja prvu, na našim prostorima, studiju monokrotalinom indukovane srčane insuficijencije u razmevanju uticaja subhronične primene vitamina B6 i folne kiseline na funkcionalne, biohemijske i imunohistohemijske promene u kardiovaskularnom sistemu pacova.

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

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dobijene rezultate eksperimentalnog istraživanja kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Jovane Jakovljević Uzelac i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd, 09.06.2021. godine

Članovi komisije:

Prof. dr Tatjana Simić

Mentor:

Prof. dr Dragan Đurić

Prof. dr Branislav Milovanović

Prof. dr Vladimir Jakovljević
