

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.03.2022. godine, broj 11/IV-3/3-MB, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom: „**Mehanizmi kardiodinamskih i vazoaktivnih efekata propofola kod pacova: značaj oksidativnog stresa, gasotransmitera i kardiovaskularnih biomarkera**“, kandidata dr Marka Đurića, zaposlenog u Klinici za anesteziologiju sa reanimatologijom Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivan Palibrk, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Sonja Vučković, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Vladimir Živković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka 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 Marka Đurića napisana je na ukupno 167 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 126 slika (stubičastih dijagrama), 63 tabele i 4 sheme. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, spisak skraćenica korišćenih u tekstu i biografiju kandidata,.

U **uvodu** je prikazan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za kliničke i farmakološke karakteristike ispitivanog anestetika propofola. Navedeni su do sada utvrđeni anestetski i ne-anestetski (pleiotropni) efekti propofola, a posebno su naglašeni anti-oksidativni efekti, objašnjeni su procesi oksidativnog stresa uz klasični prikaz formiranja i detoksifikacije reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i uloge gasotransmitera (NO, H₂S, CO), posebno u kardiovaskularnim bolestima. Navedeni su efekti propofola na reaktivne kiseonične i azotne vrste, kao i na odgovarajuće enzime, na parametre redoks ravnoteže (redukcija ili inflamacija) i inflamacijski status (anti-inflamatorno ili pro-inflamatorno dejstvo). Opisani su mogući efekti propofola na sintezu gasnih transmitera sa prikazom ključnih enzima koji učestvuju u sintezi NO (endotelna azot-monoksid sintaza-eNOS), H₂S (cistationin gama liaza-CSE, cistationin beta sintaza-CBS, 3-merkaptopiruvat sulfurtransferaza-3-MST), CO (hem-

oksidogenaza subtip 1-HO-1). Opisani su kardioprotektivni efekti propofola, efekti na produkciju NO i reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i upoređivanje ovih efekata sa često upotrebljavanim kardiovaskularnim lekovima i suplementima

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od: a) ispitivanja efekata inhibicije gasnih transmitera (NO, H₂S i CO), upotrebom specifičnih inhibitora sinteze i produkcije NO (L-NAME), H₂S (DL-PAG) i CO (ZnPPiX), na hematološke, standardne biohemijske i kardiovaskularne biomarkere, kao i na parametre oksidativnog stresa u hemolizatu, kod pacova Wistar soja, muškog pola, anesteziranih propofolom; b) ispitivanja efekata inhibicije gasnih transmitera (NO, H₂S i CO), upotrebom specifičnih inhibitora sinteze i produkcije NO (L-NAME), H₂S (DL-PAG) i CO (ZnPPiX), i influksa jona kalcijuma, upotrebom nespecifičnog inhibitora kalcijumskih kanala verapamilom, na kardiodinamske varijable, parametre oksidativnog stresa u koronarnom efluentu i homogenatu tkiva srca, kod pacova Wistar soja, muškog pola, anesteziranih propofolom; c) ispitivanja efekata ketamina i etomidata, na hematološke, standardne biohemijske i kardiovaskularne biomarkere, na parametre oksidativnog stresa u hemolizatu, na kardiodinamske varijable, parametre oksidativnog stresa u koronarnom efluentu i homogenatu tkiva srca, kod pacova Wistar soja, muškog pola, i upoređivanje sa efektima propofola.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o istraživačkoj studiji na odraslim pacovima soja Vistar, muškog pola, kao korišćenim eksperimentalnim životinjama. Navedeno je da su životinje nabavljene iz akreditovanog vivarijuma u Beogradu, i čuvane u odgovarajućim ambijentalnim uslovima. 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 (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) i principa etičnosti. Eksperimentalni protokol je odobren od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu br. 4196/2 od 10.08.2017.g. i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije - Uprave za veterinu, rešenje o sprovođenju ogleđna na životinjama br. 323-07-01339/2017-05 od 28.08.2017.g. Opisane su ispitivane grupe; eksperimentalne životinje (ukupno 84) podeljene su u 6 ispitivanih grupa (svaka grupa je sastavljena od dve podgrupe, sa 7 životinja u svakoj podgrupi). Jasno je opisan istraživački protokol i varijable merene u studiji. U pojedinim segmentima istraživanja (kod određivanja hematoloških i biohemijskih parametara) uvedena je kontrolna grupa (u skladu sa etičkim principima) u kojoj je umesto propofola aplikovan fiziološki rastvor u istom volumenu kao i propofol. Podgrupe su koncipirane tako,

da su se u jednoj podgrupi procenjivali kardiodinamski parametri, koronarni protok, oksidativni stres u koronarnom efluentu i odgovor na verapamil u izolovanom srcu, a u drugoj podgrupi uzorkovala krv i tkivo srca pacova u ispitivanim grupama, za procenu hematoloških, biohemijskih i hemostatskih parametara, kao i oksidativnog stresa u hemolizatu i tkivu srca. U skladu sa dizajnom istraživanja rezultati su upoređivani sa kontrolnom grupom, u kojoj je umesto propofola aplikovan fiziološki rastvor ili sa drugim anestetima koji su primenjivani (tzv. „kontrolni anestetici“), ketaminom ili etomidatom. Procenjivano je učešće gasotransmitera (NO, H₂S, CO) u efektima propofola, upotrebom specifičnih inhibitora sinteze i produkcije NO, H₂S i CO, i to L-NAME, DL-PAG i ZnPPiX, koji su administrirani intraperitonealno 5-15 minuta pre primene propofola. Opisana je metodologija za određivanje hematoloških parametara, standardnih biohemijskih parametara i kardiovaskularnih biomarkera, za određivanje parametara oksidativnog stresa u hemolizatu, koronarnom efluentu i homogenatu tkiva srca. Opisane su metode statističke analize.

U poglavlju **rezultati** veoma jasno i pregledno su predstavljani svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana po celinama koje su definisane u ciljevima, veoma pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci detaljno prikazuju specifične i opšte nalaze koji su proistekli iz rezultata istraživanja. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 210 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa *iThenticate* kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Mehanizmi kardiodinamskih i vazoaaktivnih efekata propofola kod pacova: značaj oksidativnog stresa, gasotransmitera i kardiovaskularnih biomarkera“ autora dr Marka Đurića, konstatujemo da utvrđeno podudaranje teksta iznosi 16%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je određenih uobičajenih rečenica u objašnjenju slika i tabela u rezultatima, u oznakama eksperimentalnih grupa u već publikovanim radovima kandidata, kao i u opisu standardno korišćene metodologije za određivanje markera oksidativnog stresa i laboratorijskih parametara, i što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Pojedinačno podudaranje sa upoređivanim tekstovima ne prelazi 4%.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati ovog istraživanja u ispitivanim grupama prikazani su kroz sledeće celine: morfometrijske karakteristike eksperimentalnih životinja, vrednosti hematoloških parametara, vrednosti biohemijskih parametara, vrednosti kardiodinamskih parametara na izolovanom srcu, vrednosti parametara oksidativnog stresa u hemolizatu, vrednosti parametara oksidativnog stresa u koronarnom efluentu, i vrednosti parametara oksidativnog stresa u homogenatu tkiva.

Morfometrijske karakteristike eksperimentalnih životinja u ispitivanim grupama prikazane su na slikama 1-8 kroz vrednosti ukupne telesne mase i mase pojedinih organa (srca, jetre i mozga). Prikazane vrednosti dobijene su merenjem tokom segmenta istraživanja u vezi sa ispitivanjem kardiodinamskih varijabli. Uočava se da ne postoje statistički značajne razlike između ispitivanih grupa, odnosno da su grupe homogene prema ukupnoj telesnoj masi i masi srca, jetre i mozga.

Rezultati hematoloških parametara u ispitivanim grupama prikazani su na slikama 9-50 i tabelama 1-21 kroz sledeće izmerene vrednosti: ukupan broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit, srednji volumen eritrocita, srednja količina hemoglobina u eritrocitu, srednja koncentracija hemoglobina na litar eritrocita, koeficijent standardne devijacije distribucije volumena eritrocita, koeficijent varijacije distribucije volumena eritrocita, ukupan broj eritroblasta, ukupan broj leukocita, ukupan broj neutrofila, ukupan broj eozinofila, ukupan broj bazofila, ukupan broj limfocita, ukupan broj monocita, ukupan broj nezrelih granulocita, ukupan broj trombocita, zapreminski udeo trombocita u jedinici pune krvi, srednji volumen trombocita, procenat trombocita većeg prečnika od normalnih i širina distribucije volumena trombocita. U odnosu na testirane hematološke parametre rezultati ovog istraživanja nisu pokazali signifikantne promene u vrednostima ukupnog broja eritrocita, ukupne koncentracije hemoglobina, hematokrita, srednjeg volumena eritrocita, srednje količine hemoglobina u eritrocitu, srednje koncentracije hemoglobina na litar eritrocita, koeficijenta standardne devijacije distribucije volumena eritrocita, koeficijenta varijacije distribucije volumena eritrocita, ukupnog broja eritroblasta, ukupnog broja neutrofila, ukupnog broja eozinofila, ukupnog broja bazofila, ukupnog broja nezrelih granulocita, ukupnog broja monocita, srednjeg volumena trombocita, procenta trombocita većeg prečnika od normalnih i širine distribucije volumena trombocita. Statistički značajne razlike su registrovane u ukupnom broju leukocita i limfocita, ukupnom broju trombocita i u vrednostima zapreminskog udela trombocita u jedinici pune krvi.

Rezultati biohemijskih parametara u ispitivanim grupama prikazani su na slikama 51-94 i tabelama 22-43 kroz sledeće izmerene vrednosti: glukoza, urea, kreatinin, mokraćna kiselina, ukupni proteini, albumini, ukupni holesterol, HDL, LDL, trigliceridi, troponin T visoke senzitivnosti, homocistein, folati, vitamin B₁₂, fibrinogen, von Vilebrand faktor, D-dimer, i aktivnosti enzima: aspartat aminotransferaza, alanin aminotransferaza, laktat dehidrogenaza, alkalna fosfataza i alfa amilaze. U odnosu na testirane biohemijske parametre rezultati ovog istraživanja nisu pokazali signifikantne promene u vrednostima glikemije, uree, mokraćne kiseline, ukupnih proteina, triglicerida, homocisteina, vitamina B₁₂, vWF i aktivnosti enzima AST. Statistički značajne razlike su registrovane u vrednostima kreatinina, albumina, ukupnog holesterola, HDL-holesterola, LDL-holesterola, hsTnT, folata, fibrinogena, D-dimera, i aktivnosti enzima: ALT, LDH, ALP i alfa amilaze.

Rezultati kardiodinamskih parametara na izolovanom srcu u ispitivanim grupama prikazani su na slikama 95-106 i tabelama 44-51 kroz sledeće izmerene vrednosti: maksimalna stopa promene pritiska u levoj komori, minimalna stopa promene pritiska u levoj komori, sistolni pritisak u levoj komori, dijastolni pritisak u levoj komori, frekvencija srca i koronarni protok. Statistički značajne razlike su registrovane u odnosu na sve kardiodinamske parametre, u zavisnosti od ispitivanih grupa.

Rezultati parametara oksidativnog stresa u hemolizatu u ispitivanim grupama prikazani su na slikama 107-112 i tabelama 52-54 kroz izmerene aktivnosti enzima SOD i katalaze, i vrednosti GSH. Statistički značajne razlike su registrovane u aktivnosti SOD i vrednosti GSH u zavisnosti od ispitivanih grupa, dok u aktivnosti katalaze nisu nađene razlike.

Rezultati parametara oksidativnog stresa u koronarnom efluentu u ispitivanim grupama prikazani su na slikama 113-120 i tabelama 55-60 kroz izmerene vrednosti nitrita, superoksid anjon radikala, vodonik peroksida i kroz indeks lipidne peroksidacije. Statistički značajne razlike su registrovane u vrednostima nitrita, vodonik peroksida i u indeksu lipidne peroksidacije, dok u vrednostima superoksid anjon radikala nisu nađene razlike.

Rezultati parametara oksidativnog stresa u hemolizatu u ispitivanim grupama prikazani su na slikama 121-126 i tabelama 61-63 kroz izmerene aktivnosti enzima SOD i katalaze, i vrednosti GSH. Statistički značajne razlike su registrovane u aktivnostima SOD i katalaze, kao i u vrednostima GSH u zavisnosti od ispitivanih grupa.

Ispitivanjem efekata inhibicije gasnih transmitera na hematološke i biohemijske parametre, kao i na parametre oksidativnog stresa u hemolizatu, kod pacova Wistar soja, muškog pola, anesteziranih propofolom, utvrđeno je da propofol poseduje široki spektar ne-anestetskih

efekata, koji su promenljivi u odnosu na uslove okoline (status produkcije gasnih transmitera NO, H₂S i CO).

Ispitivanjem efekata inhibicije gasnih transmitera i influksa jona kalcijuma na kardiodinamske varijable, parametre oksidativnog stresa u koronarnom efluentu i homogenatu tkiva srca, kod pacova Wistar soja, muškog pola, anesteziranih propofolom, utvrđeno je da su gasni transmitteri (NO, H₂S i CO) i influks jona kalcijuma uključeni na različite načine u efekte propofola.

Ispitivanjem efekata ketamina i etomidata, na hematološke i biohemijske parametre, na parametre oksidativnog stresa u hemolizatu, na kardiodinamske varijable, parametre oksidativnog stresa u koronarnom efluentu i homogenatu tkiva srca, kod pacova Wistar soja, muškog pola, utvrđeno je da ketamin pokazuje izraženiji anti-oksidativni potencijal u poređenju sa etomidatom, a da etomidat ima povoljnije efekte u pogledu srčanih performansi.

Urađeno eksperimentalno i translaciono istraživanje na pacovima Wistar soja, muškog pola, ukazuje na širi spektar pleiotropnih (ne-anestetskih) efekata propofola, koji bi mogli biti potencijalno kardioprotektivni i citoprotektivni. Efekti propofola su različiti u odnosu na efekte drugih anestetika, koji imaju različite mehanizme delovanja na kardiovaskularni sistem (ketamin i etomidat).

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Propofol je jedan od najčešće upotrebljivanih anestetika, u širokoj upotrebi usled brzog dejstva i malog broja izazvanih nuspojava. Mnogobrojni su radovi koji navode njegova anti-oksidativna i citoprotektivna svojstva. Zbog dokazanih efekata u eksperimentalnim modelima ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja, verovatno je da propofol može biti “intraoperativna strategija za indukovanje protektivnih efekata na različitim organima”, a posebno u srcu, mozgu i jetri. Pretpostavlja se da su kardioprotektivni efekti propofola posledica očuvanja od endotela zavisne vazodilatacije, koju inače može umanjiti oksidativni stres. Vazodilatatorni efekti propofola ne moraju nužno biti posredovani ili modulirani NO, odnosno mogu biti rezultat i brojnih drugih mehanizama. Mnogi povoljni efekti propofola su posredovani povećanjem nivoa gasnih transmitera, azot monoksida (NO) i ugljen monoksida (CO). Budući da treći gasni transmittir, vodonik sulfid (H₂S), poseduje slična svojstva i funkcije kao NO, moguće je da propofol interaguje i sa ovom supstancom. Međutim, brojni radovi opisuju i njegova neželjena dejstva u raznim tkivima, koja se manifestuju kao propofolom indukovani infuzioni sindrom sa udruženim otkazivanjem miokarda ili bubrega, lipemija u plazmi, hipertrigliceridemija, masna jetra, pankreatitis rabdmioliza i metabolička acidoza. Iako se

ove promene češće zapažaju kod dece i nakon dugotrajne infuzije visokih doza, istraživanja su pokazala ove efekte i kod odraslih, i nakon kratkotrajne infuzije propofola. Efekti na hematološke parametre su slabije istraženi, a od posebnog interesa je efekat propofola na hemostatske parametre, usled ranije opisanih anti-agregacionih i anti-fibrinolitičkih svojstava. Nedovoljan je broj podataka o dejstvu propofola na anti-oksidativni status i na određene biohemijske i hematološke parametre tokom inhibicije gasne transmisije, što može predstavljati analogiju određenog kliničkog stanja. U ovom istraživanju je utvrđeno je da propofol utiče na uloge gasnih transmitera i anti-oksidativnih enzima; neki od ovih efekata bi mogli biti posredovani lokalnim ili sistemskim oksidativnim stresom. Ovo istraživanje je dopunilo saznanja o mehanizmima efekata propofola na kardiovaskularnom sistemu, a pre svega sa aspekta učešća gasotransmitera, oksidativnog stresa i kardiovaskularnih biomarkera. Do sada nijedan publikovani rad nije na ovaj način obradio mehanizme kardiodinamskih i vazoaktivnih efekata propofola, niti je na ovakav integrativan način povezao značaj oksidativnog stresa, gasotransmitera i kardiovaskularnih biomarkera, kao što je to urađeno u ovom istraživanju.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Djuric M**, Nikolic T, Kostic S, Radonjic K, Stankovic S, Zivkovic VI, Djuric D, Jakovljevic V, Stevanovic P. The effects of gasotransmitters inhibition on biochemical and haematological parameters, and oxidative stress in propofol-anaesthetized Wistar male rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019; 97(11):1073-1079. doi: 10.1139/cjpp-2019-0029
2. **Djuric M**, Nikolic T, Kostic S, Radonjic K, Jeremic J, Petkovic A, Bradic J, Milosavljevic I, Srejovic IM, Zivkovic VI, Djuric D, Jakovljevic V, Stevanovic P. Inhibition of gasotransmitters production and calcium influx affect cardiodynamic variables and cardiac oxidative stress in propofol-anaesthetized Wistar male rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019; 97(9):850-856. doi: 10.1139/cjpp-2018-0719
3. **Djuric M**, Kostic S, Nikolic Turnic T, Stankovic S, Skrbic R, Djuric D, Zivkovic V, Jakovljevic V, Stevanovic P. The comparison of the effects of ketamine and etomidate on cardiodynamics, biochemical and oxidative stress parameters in Wistar male rats. *Mol Cell Biochem* 2020; 474(1-2):125-134. doi: 10.1007/s11010-020-03838-z

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Mehanizmi kardiodinamskih i vazoaktivnih efekata propofola kod pacova: značaj oksidativnog stresa, gasotransmitera i kardiovaskularnih biomarkera“,

kandidata dr Marka Đurića, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju ne-anestetskih (pleiotropnih) efekata propofola, a posebno u uslovima inhibicije produkcije gasotransmitera (NO, H₂S, CO), što je u translacionim uslovima „surogat“ za dugogodišnje efekte kardiovaskularnih faktora rizika kod pacijenata ili određenih kliničkih stanja u kojima se javlja endotelna disfunkcija. Dobijeni rezultati, kao i poređenje sa efektima drugih često upotrebljivanih anestetika koji izazivaju različite efekte na kardiovaskularnom sistemu (ketamin i etomidat) u odnosu na propofol, doprinose razumevanju novih mehanizama uključenih u kardiovaskularne efekte propofola, te osmišljavanju inoviranih terapijskih protokola, radi izbegavanja neželjenih efekata ove supstance, a pre svega negativnog inotropnog, proaritmijskog i hipotenzivnog efekata. Ovo je važno i zbog toga, što bi se potenciranjem korisnih efekata (pre svega anti-oksidativnih) mogla ostvariti krajnja korist kod pacijenata sa prisutnim kardiovaskularnim faktorima rizika. Ovo može biti važno za kliničku primenu i pravi izbor anestetika u konkretnom slučaju, s obzirom na njihovo dejstvo na različite organe. Kao što je pokazano, ova istraživačka studija može poslužiti za poboljšanje uspešnosti primene propofola u kliničkim uslovima, kao i za dublje sagledavanje mogućih neželjenih efekata kod određenih pacijenata, posebno u uslovima akutne primene.

Doktorska disertacija je urađena po tipu eksperimentalne i translacione studije, i 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. Iz ove istraživačke studije su proistekla tri publikovana rada u vodećim časopisima sa WoS/JCR liste, u kojima je kandidat prvi autor.

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

u Beogradu, 04.04.2022.

Članovi Komisije:

Prof. dr Ivan Palibrk

Prof. dr Sonja Vučković

Prof. dr Vladimir Živković

Mentor:

Prof. dr Predrag Stevanović

Ko-mentor:

Prof. dr Vladimir Jakovljević