

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

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 30.06.2023. godine, broj 14/XV-3/3-MD, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Heteropolivolframati kao mogući antidiabetici: uticaj na hiperglikemiju i procena hepato- i nefrotoksičnosti u eksperimentalnom modelu dijabetesa izazvanim streptozotocinom kod pacova“

kandidata dr Marka Dinčića, zaposlenog na Institutu za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović”, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Mentori doktorske disertacije su Prof. dr Jasna Todorović i VNS dr Mirjana Čolović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Danijela Krstić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Mila Četković Milisavljević, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Branimir Radosavljević, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u penziji
4. Doc. dr Neda Milinković, docent Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Zorica Jovanović, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija kandidata dr Marka Dinčića pod naslovom **„Heteropolivolframati kao mogući antidiabetici: uticaj na hiperglikemiju i procena hepato- i nefrotoksičnosti u eksperimentalnom modelu dijabetesa izazvanim streptozotocinom kod pacova“** napisana je na ukupno 171 strani. Na početku disertacije priložen je sažetak na srpskom i engleskom jeziku. Disertacija obuhvata sledeća poglavlja: uvod (39 strana), ciljevi (1 strana), materijal i metode (27 strana), rezultati (47 strana),

diskusija (31 strana), zaključci (2 strane) i literatura (24 strane). U disertaciji se nalazi ukupno 20 grafikona (u poglavlju rezultati), 22 slike (11 slika u poglavlju uvod, 7 slika u poglavlju rezultati i 4 slike u poglavlju materijal i metode) i 9 tabela (8 tabela u poglavlju uvod i 1 tabela u poglavlju rezultati). Pored navedenih osnovnih poglavlja, doktorska disertacija sadrži podatke o mentorima i komisiji, izjave zahvalnosti, spisak skraćenica korišćenih u tekstu, biografiju kandidata i neophodne potpisane izjave.

Poglavlje **uvod** je podeljeno na 5 odeljaka. U prvom odeljku opisan je metabolizam glukoze u organizmu, sa posebnim osvrtom na mehanizme uključene u održavanje euglikemije, koja je od ključnog značaja za normalno funkcionisanje ćelija, tkiva i organa. Procesi postprandijalne apsorpcije glukoze u tankom crevu, metabolizma glukoze u jetri i iskorišćavanja glukoze u ekstrahepatičnim perifernim tkivima, kao i njihovi složeni mehanizmi regulacije, objašnjeni su na odgovarajući i detaljan način u ovom odeljku. Posebno je naglašena njihova značajna uloga u patogenezi hiperglikemije i drugih metaboličkih poremećaja dijabetesa. U drugom odeljku ovog poglavlja prvo je objašnjena sinteza insulina u β -ćelijama Langerhansovih ostrvaca pankreasa, a zatim i regulacija njegove sekrecije. Opisani su procesi distribucije i razgradnje insulina, dok se poslednja celina ovog odeljka odnosi na strukturu humanog insulinskog receptora i „rotacioni model“ njegove aktivacije nakon vezivanja liganda, kao i na signalne puteve odgovorne za metaboličko i plejotropno delovanje insulina. U trećem odeljku definisano je šta je dijabetes i navedena je njegova klasifikacija koja je zasnovana na etiopatogenezi. Nakon toga, u domenu savremenih znanja opisani su složeni etiopatogenetski mehanizmi uključeni u nastanak i razvoj dijabetesa tipa 1 i 2. U četvrtom odeljku, istaknute su prednosti i nedostaci primene oralnih i injektabilnih (ne-insulinskih) hipoglikemijskih lekova, koji se danas koriste radi ostvarivanja individualno određenih ciljnih vrednosti HbA_{1c} i sprečavanja hroničnih dijabetičkih komplikacija. U petom odeljku ovog poglavlja, opisana su biološka dejstva polioksometalata (POM), pri čemu je poseban akcenat stavljen na antivirusno, antibakterijsko, antitumorsko i antidijabetičko dejstvo, koja su pokazana u brojnim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima.

Ciljevi istraživanja su jasno i precizno definisani. (1) Ispitivanje uticaja heteropolivolframata $(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 31\text{H}_2\text{O}$, $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ i $\text{K}_{14}[\text{AgP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 22\text{H}_2\text{O} \cdot 6\text{KCl}$, $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ na snižavanje hiperglikemije kod pacova sa eksperimentalnim dijabetesom izazvanim jednokratnim ubrizgavanjem rastvora streptozotocina. (2) Ispitivanje hepato- i nefrotoksičnosti $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ i $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ kod

zdravih pacova praćenjem biohemijskih parametara funkcije jetre (koncentracije ukupnih proteina i albumina, kao i aktivnosti aspartat aminotransferaze /AST/, alanin aminotransferaze /ALT/ i alkalne fosfataze /ALP/), biohemijskih parametara funkcije bubrega (koncentracije uree, kreatinina i mokraćne kiseline) i patohistoloških promena na jetri i bubrezima korišćenjem konvencionalne svetlosne i transmisionne elektronske mikroskopije. (3) Rasvetljavanje mogućih mehanizama delovanja {NaP₅W₃₀} i {AgP₅W₃₀} koji učestvuju u snižavanju hiperglikemije i ublažavanju dijabetičkih komplikacija praćenjem: koncentracije glukoze, insulina, ukupnog hemoglobina i glikoziliranog hemoglobina A_{1c} /HbA_{1c}/ u krvi; insulinske rezistencije izračunavanjem HOMA-IR indeksa; koncentracije elektrolita u krvi (natrijuma, kalijuma, hlorida, neorganskih fosfata, kao ukupnog i jonizovanog kalcijuma i magnezijuma); parametara inflamacije (serumske koncentracije feritina i C-reaktivnog proteina /CRP/); parametara lipidnog statusa (serumske koncentracije ukupnog holesterola, holesterola u lipoproteinima male gustine /LDL-holesterola/, holesterola u lipoproteinima velike gustine /HDL-holesterola/, ukupnih triglicerida i apolipoproteina A1 /Apo-A1/ i B /Apo-B/); biohemijskih parametara funkcije jetre (serumske koncentracije ukupnih proteina i albumina, kao i serumske aktivnosti AST, ALT i ALP); biohemijskih parametara funkcije bubrega (serumske koncentracije uree, kreatinina, mokraćne kiseline, lipokalina povezanim sa neutrofilnom želatinazom /eng. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*; NGAL/ i molekula oštećenja bubrega-1 /eng. *Kidney Injury Molecule-1*; KIM-1/); parametara oksidativnog stresa (koncentracije superoksid dizmutaze /SOD/, glutation peroksidaze /GPx/ i malondialdehida /MDA/) u homogenatima jetre, srca i bubrega, kao i u sinaptozomima; aktivnosti enzima acetilholinesteraze (AChE), Na⁺/K⁺-ATPaze i ecto-ATPaza u sinaptozomima izolovanim iz celih mozgova pacova; patohistoloških promena na pankreasu, jetri i bubrezima korišćenjem konvencionalne svetlosne i transmisionne elektronske mikroskopije.

Poglavlje **materijal i metode** sadrži ukupno 18 odeljaka. U prvom odeljku ukratko su opisane laboratorijske procedure za sintezu ispitivanih heteropolivolfamata, {NaP₅W₃₀} i {AgP₅W₃₀}. Drugi odeljak se odnosi na eksperimentalne životinje koje su korišćene u istraživanju, dok je u trećem odeljku opisan model izazivanja dijabetesa jednokratnom intraperitonealnom dozom (50 mg/kg) streptozotocina. U cilju realizacije postavljenih ciljeva, korišćena su tri eksperimentalna modela (antihiperglikemijska *screening* studija, akutna peroralna toksikološka studija i studija posvećena rasvetljavanju mogućih mehanizama

antidiijabetičkog delovanja), koja su na detaljan način opisana u četvrtom odeljku ovog poglavlja. Način pripreme homogenata iz tkiva srca, jetre i bubrega objašnjen je u petom odeljku, dok je metoda izolovanja sinaptozoma iz celih mozгова pacova izložena u šestom odeljku. Spektrofotometrijski i ELISA „sendvič“ testovi koji su korišćeni radi određivanja biohemijjskih parametara funkcije jetre (serumske koncentracije ukupnih proteina i albumina, kao i serumske aktivnosti AST, ALT i ALP) i bubrega (serumske koncentracije uree, kreatinina, mokračne kiseline, NGAL i KIM-1) obrazloženi su sedmom i osmom odeljku. U devetom odeljku objašnjen je ELISA „sendvič“ test za određivanje koncentracija insulina u serumu, a lateks imunoturbidimetrijska metoda za određivanje koncentracija ukupnog hemoglobina i HbA_{1c} opisana je u desetom odeljku. Spektrofotometrijske metode i metoda indirektna potenciometrije koje su korišćene u cilju merenja koncentracija elektrolita (natrijuma, kalijuma, hlorida, neorganskih fosfata, kao ukupnog i jonizovanog kalcijuma i magnezijuma) na odgovarajući način su pojašnjene u jedanaestom odeljku. U dvanaestom i trinaestom odeljku opisane su spektrofotometrijske i imunoturbidimetrijske metode određivanja parametara lipidnog statusa (serumske koncentracije ukupnog holesterola, LDL-holesterola, HDL-holesterola, ukupnih triglicerida, Apo-A1 i Apo-B) i inflamacije (serumske koncentracije feritina i CRP). U četrnaestom odeljku prikazani su ELISA „sendvič“ testovi za određivanje parametara oksidativnog stresa (SOD, GPx i MDA), dok su u petnaestom i šesnaestom odeljku opisane spektrofotometrijske metode određivanja AChE, Na⁺/K⁺-ATPaze i ecto-ATPaze. Priprema tkiva pankreasa, jetre i bubrega, kao i obrada uzoraka za konvencionalnu svetlosnu i transmisionu elektronsku mikroskopiju objašnjeni su u sedamnaestom odeljku, a u osamnaestom poglavlju princip statističke analize rezultata.

U poglavlju **rezultati** tekstualno su detaljno opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati, uz odgovarajuće grafičke i tabelarne prikaze istih.

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

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada, a koji su u skladu sa navedenim ciljevima istraživanja.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 418 referenci, koje su u disertaciji citirane vankuverskim stilom.

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 dr Marka Dinčića, konstatovano je da podudaranje teksta iznosi 6%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je ličnih imena, bibliografskih podataka o korišćenju literaturi i 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.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati prvog eksperimentalnog protokola doktorske disertacije dr Marka Dinčića, odnosno *screening* studije koja je imala za cilj da potvrdi antihiperглиkemijsku aktivnost odabranih sintetisanih heteropolivolframata, pokazuju da intraperitonealna jednokratna primena $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ i $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ (5, 10 i 20 mg/kg) dozno i vremenski zavisno snižava vrednosti hiperглиkemije kod pacova sa eksperimentalnim dijabetesom izazvanim jednokratnim ubrizgavanjem rastvora streptozotocina. Oba ispitivana heteropolivolframata efikasna su za snižavanje povišenih vrednosti glukoze u krvi kod dijabetičkih životinja, s tim što se $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ pokazao kao moćniji antihiperглиkemijski agens u odnosu na $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$. Najviša primenjena doza ispitivanih heteropolivolframata od 20 mg/kg je i najefikasnija doza u snižavanju hiperглиkemije kod dijabetičkih pacova. Pored toga, antihiperглиkemijski efekat odabranih heteropolivolframata najmanji je nakon 2 h, a najveći nakon 6 h od primene, što ukazuje da njihovo dejstvo ima postepen nastup i duže trajanje. Rezultati toksikološkog istraživanja baziranog na biohemijskim parametrima funkcije i patohistološkoj analizi jetre i bubrega pokazuju da peroralna primena ispitivanih sintetisanih heteropolivolframata u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 20 mg/kg tokom dve nedelje izaziva blagi do umereni stepen hepato- i nefrotoksičnosti kod zdravih pacova. U poslednjem eksperimentalnom protokolu, koji je imao za cilj da detaljnije istraži farmakološki profil sintetisanih heteropolivolframata kao potencijalnih antidijabetika, pokazano je da peroralna primena $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/dan) tokom tri nedelje značajno podstiče sekreciju insulina iz β -ćelija Langerhansovih ostrvaca pankreasa kod dijabetičkih pacova, što može biti jedan od mehanizama dobijenog antihiperглиkemijskog dejstva ispitivanih jedinjenja. Pored antihiperглиkemijskog dejstva, pokazano je da ispitivani heteropolivolformat ispoljava i hepatoprotektivno, nefroprotektivno,

kardioprotektivno i neuroprotektivno dejstvo kod dijabetičkih pacova, što je procenjeno na osnovu analize: (1) relativne mase organa, (2) biohemijskih parametara funkcije jetre (serumske koncentracije ukupnih proteina i albumina i serumske aktivnosti AST, ALT i ALP) i bubrega (serumske koncentracije uree, kreatinina, mokraćne kiseline, KIM-1 i NGAL), (3) parametara oksidativnog stresa (SOD-1, GPx-1 i MDA) u homogenatu tkiva, (4) aktivnosti AChE, Na⁺/K⁺-ATPaze i ecto-ATPaza u sinaptozomima izolovanim iz celih mozgova i (5) patohistoloških promena organa korišćenjem konvencionalne svetlosne i elektronske mikroskopije.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Uprkos razvoju brojnih novih hipoglikemijskih lekova u proteklih 20-tak godina, epidemiološke studije pokazuju da je 2015. godine od komplikacija dijabetesa umrlo oko 6,7 miliona ljudi, što ukazuje da veliki broj obolelih i dalje ne postiže zadovoljavajuću glikoregulaciju (Zheng i sar., 2018). Stoga, neophodna su dalja istraživanja sa idejom pronalaska novih antidijabetika, jeftinih i lakih za primenu, koji bi imali snažan efekat na hiperglikemiju, ali uz minimalne neželjene efekte.

Zahvaljujući brojnim istraživanjima na animalnim modelima koja su imala za cilj da istraže biološka svojstva POM, došlo se do zapažanja da ova kompleksna neorganska jedinjenja, pored antimikrobnog i antitumorskog dejstva, mogu biti delotvorna u snižavanju hiperglikemije kod dijabetičkih pacova (Aureliano i sar. 2022, Čolović i sar., 2020). Shodno tome, poslednjih nekoliko godina ispitivana je antihiperglikemijska aktivnost znatnog broja strukturno različitih POM i heteropolivolframata (Balici i sar., 2015, Nomiya i sar., 2001, Ilyas i sar., 2014), ali ovo je prva studija koja je istraživala antidijabetičku aktivnost sintetisanih {NaP₅W₃₀} i {AgP₅W₃₀}. Pre detaljnog ispitivanja farmakološkog i toksikološkog profila, najpre je u preliminarnoj *screening* studiji procenjeno da li odabrana sintetisana jedinjenja uopšte imaju svojstvo da snižavaju hiperglikemiju kod dijabetičkih pacova. Dobijeni rezultati ove studije pokazali su da jednokratna intraperitonealna primena {NaP₅W₃₀} i {AgP₅W₃₀} (5, 10 i 20 mg/kg) dozno i vremenski zavisno snižava hiperglikemiju kod dijabetičkih pacova. Nakon ovog zapažanja, stekli su se bili uslovi za dalja *in vivo* istraživanja bezbednosti i efikasnosti odabranih sintetisanih heteropolivolframata kao potencijalnih novih lekova-kandidata u terapiji dijabetesa.

Imajući u vidu da „rizici koje lek nosi moraju da budu manji od očekivane koristi“ (Classen, 2003), kao i da postoji relativno malo podataka u literaturi o bezbednosnom profilu POM, najpre je ispitivana akutna peroralna toksičnost $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ i $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 20 mg/kg, pošto se ona pokazala kao najefikasnija u snižavanju hiperglikemije kod dijabetičkih pacova. Dobijeni rezultati su pokazali da primena ispitivanih heteropolivolframata tokom 14 dana nije imala štetne uticaje na dnevni unos hrane i vode, opšte zdravstveno stanje i ponašanje pacova. Takođe, nije uočena statistički značajna razlika u telesnoj masi između kontrolne grupe i grupa koje su dobijale $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}/\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama (Balici i sar., 2015, Nomiya i sar., 2001, Čolović i sar., 2017), koje su našle da primena strukturno različitih POM ne dovodi do promene telesne mase kod eksperimentalnih miševa i pacova. Pored toga, ova toksikološka studija je prikazala da peroralna primena sintetisanih jedinjenja (20 mg/kg/dan) tokom 14 dana ne utiče na koncentraciju glukoze u serumu zdravih pacova. Na osnovu navedenih rezultata, kao i rezultata prethodnih studija (Čolović i sar., 2017), može se zaključiti da POM, uključujući i ispitivane heteropolivolframate, iako snižavaju hiperglikemiju kod dijabetičkih pacova, ne izazivaju hipoglikemiju kod normoglikemičkih pacova. Budući da se većina unetih supstanci najčešće metaboliše u jetri, a eliminiše putem bubrega, hepatotoksičnost i nefrotoksičnost su prijavljeni kao česti neželjeni efekti tokom pretkliničkih i kliničkih faza istraživanja novih lekova (Classen, 2003). Stoga, u daljem toku akutne peroralne toksikološke studije procenjivana je hepatotoksičnost i nefrotoksičnost ispitivanih heteropolivolframata kod zdravih pacova. Na osnovu analiziranih biohemijskih parametara funkcije, kao i stepena i karaktera patohistoloških promena u jetri, može se zaključiti da peroralna primena ispitivanih heteropolivolframata u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 20 mg/kg tokom dve nedelje izaziva blagi hepatitisni oblik oštećenja jetre, bez masivne destrukcije parenhima, uz normalne vrednosti aktivnosti serumskih transaminaza i smanjenu sintetsku funkciju jetre, što sve zajedno ukazuje na blagi stepen oštećenja jetre. Pored toga, pokazano je da sintetisani $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ i $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ izazivaju blagi do umereni porast koncentracije azotnih jedinjenja (ureje i kreatinina) u krvi, kao i oštećenja mitohondrija tubularnih epitelnih ćelija, koja se uočavaju na transmisionoj elektronskoj mikroskopiji, dok se korišćenjem svetlosne mikroskopije ne uočavaju patohistološke promene u bubrezima tretiranih pacova. Navedeni rezultati su u skladu sa prethodno objavljenom studijom (Wang i sar., 2014), koja ukazuje da se POM sa antivirusnim dejstvom nakon peroralne primene akumulira u visokom procentu u bubregu životinja, ali tačan mehanizam njegovog nefrotoksičnog dejstva nije poznat.

Sveukupno, dobijeni rezultati akutne peroralne toksikološke studije, koja se prvenstveno zasniva na biohemijским i patohistološkim analizama, upućuju da peroralna primena ispitivanih heteropolivolframata (20 mg/kg/dan) tokom dve nedelje izaziva blagi do umereni stepen hepato- i nefrotoksičnosti kod zdravih pacova, što uslovljava uvođenje mere opreza u obliku redovnog praćenja funkcionalnih testova jetre i bubrega.

Imajući u vidu (1) zaključak studije Nomiya i sar. (2001) da antidijabetička aktivnost POM pre svega zavisi od geometrijskog oblika, a ne od vrste (ne)metala u kompleksu, ali i (2) zaključak *screening* studije da je $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ moćniji antihiperglikemijski agens u odnosu na $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ kao i (3) zaključak akutne peroralne toksikološke studije da $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$, u odnosu na $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$, ispoljava blaži stepen hepato- i nefrotoksičnosti kod zdravih pacova, u poslednjem eksperimentalnom protokolu ovog istraživanja, koji je ispitivao moguće mehanizme antidijabetičkog delovanja heteropolivolframata, korišćen je samo $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ i to u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 20 mg/kg. S tim u vezi, najpre je ispitivan uticaj tronedeljne primene $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/dan) na vrednosti hiperglikemije, kao i na nivo HbA_{1c} dijabetičkih pacova, koji je zatim upoređivan sa uticajem primene humanog dugodelujućeg insulina (6 IJ/dan), kako bi mogla da se tumači antihiperglikemijska aktivnost ispitivanog heteropolivolframata. Dobijeni rezultati su pokazali da tronedeljna peroralna primena ispitivanog heteropolivolframata (20 mg/kg/dan) statistički značajno snižava hiperglikemiju kod dijabetičkih pacova u poređenju sa (kontrolnom) dijabetičkom grupom. Slične rezultate dobili su Ilyasi i sar. (2014), koji su pokazali da primena $\text{Na}_6[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kod miševa sa eksperimentalnim dijabetesom izazvanim jednokratnom primenom aloksana statistički značajno snižava hiperglikemiju (za oko 62%) nakon 8 h od njegove primene u poređenju sa početnom vrednošću hiperglikemije ($t = 0$ h). Budući da su dosadašnje *in vivo* studije na animalnim modelima (Balici i sar., 2015, Nomiya i sar., 2001, Ilyas i sar., 2014) ispitivale samo uticaj POM na hiperglikemiju, ali ne i na druge parametre glikoregulacije, u ovom istraživanju, po prvi put, analiziran je uticaj primene ispitivanog heteropolivolframata, kao predstavnika POM, na nivo HbA_{1c} dijabetičkih životinja. Dobijeni rezultati pokazuju da tronedeljna peroralna primena $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 20 mg/kg/dan statistički značajno snižava nivo HbA_{1c} za 1,8% u odnosu na (kontrolnu) dijabetičku grupu. To ukazuje da ispitivani heteropolivolframata ne utiče samo na kratkotrajnu, već i na dugotrajnu glikoregulaciju, zbog čega može da se pretpostavi da bi on mogao sprečiti razvoj i progresiju makro- i mikrovaskularnih dijabetičkih komplikacija, koje su u direktnoj korelaciji

sa nivoom HbA_{1c}. Treba posebno istaći da dobijeni efekat ispitivanog heteropolivolframata na parametre glikoregulacije, ne samo da postoji, već je i izuzetno sličan sa efektom primene egzogenog insulina (6 IJ/dan).

U cilju rasvetljavanja mogućih mehanizama dejstva heteropolivolframata koji učestvuju u snižavanju hiperglikemije, ispitivan je peroralni uticaj {NaP₅W₃₀} u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 20 mg/kg na koncentraciju insulina u serumu dijabetičkih životinja. Dobijeni rezultati pokazuju da primena ispitivanog heteropolivolframata tokom tri nedelje povećava koncentraciju insulina u serumu dijabetičkih životinja, odnosno podstiče njegovo oslobađanje iz β-ćelija pankreasa, što može biti jedan od mehanizama njegovog antihiperglikemijskog dejstva. Imajući u vidu zaključak *in vitro* studije Zhou i sar. (2011) da ispitivani heteropolivolframata može da spreči formiranje oligomera β-amiloida, koji se kasnije spajaju i stvaraju nerastvorljiva amiloidna vlakna, kao i štetan uticaj ovih vlakana na funkciju β-ćelija pankreasa (Hoppener i sar., 2006), može se indirektno zaključiti da {NaP₅W₃₀} stimuliše sekreciju insulina kod dijabetičkih životinja tako što sprečava pogrešno uvijanje amiloidnog polipeptidnog ostrvca i njegovu agregaciju u ekstracelularnom prostoru pankreasa.

Nedavno objavljene *in vitro* studije (Pereira i sar., 2009, Yraola i sar., 2007) pokazuju da određeni POM, pre svega oni koji sadrže vanadijum, mogu da smanje rezistenciju tkiva na insulin, odnosno da povećaju preuzimanje i iskorišćavanje glukoze u perifernim tkivima (skeletalno-mišićno i masno tkivo). Međutim, dobijeni rezultati pokazuju da primena {NaP₅W₃₀} tokom tri nedelje nije uticala na vrednost HOMA-IR indeksa kod dijabetičkih životinja u poređenju sa (kontrolnom) dijabetičkom grupom.

Dijabetes predstavlja izuzetno važan faktor rizika za nastanak različitih i po život opasnih poremećaja ravnoteže elektrolita u organizmu (Pipeleers i sar., 2019). Ovi poremećaji prevashodno nastaju kod loše regulisanih oblika usled hiperglikemije, hipoinsulinemije, poremećaja acidobazne ravnoteže, malapsorpcionih sindroma i poremećaja bubrežne funkcije, ali ponekad su uslovljeni i primenjenom terapijom. Iz tih razloga, u ovom istraživanju procenjivan je uticaj tronedeljne peroralne primene {NaP₅W₃₀} u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 20 mg/kg na koncentracije elektrolita u krvi dijabetičkih životinja. Dobijeni rezultati su pokazali da se serumske koncentracije natrijuma, kalijuma, hlorida, neorganskog fosfata, ukupnog kalcijuma i magnezijuma, kao i koncentracije jonizovanog kalcijuma i jonizovanog magnezijuma u nekoagulisanjoj punoj krvi, nisu značajno menjale kod dijabetičkih životinja

tretiranih ispitivanim heteropolivolframatom u odnosu na (kontrolnu) dijabetičku grupu, što povoljno utiče na bezbednosni profil ove supstance.

Budući da poremećaji metabolizma lipida imaju značajnu ulogu u aterogenezi, kao i u nastanku kardiovaskularnih događaja kod bolesnika sa dijabetesom (Verges i sar., 2005), u ovom istraživanju ispitivan je uticaj tronedeljne peroralne primene {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/ dan) na lipidne konstituente krvi kod dijabetičkih životinja. Dobijeni rezultati pokazuju da ispitivani heteropolivolframatom statistički značajno snižava koncentracije ukupnog i HDL-holesterola u serumu dijabetičkih životinja u poređenju sa (kontrolnom) dijabetičkom grupom. Nasuprot ovim rezultatima, ne uočava se statistički značajna razlika u serumskim koncentracijama LDL-holesterola, Apo-A1, Apo-B i ukupnih triglicerida između dijabetičkih životinja tretiranih ispitivanim heteropolivolframatom i (kontrolne) dijabetičke grupe. Kako je ovo istraživanje prva *in vivo* studija koja je ispitivala uticaj heteropolivolframata, kao predstavnika POM, na biohemijske parametre lipidnog statusa u krvi dijabetičkih pacova, neophodno je dalje i detaljnije istraživanje lipidnih parametara, koje bi razjasnilo uočen fenomen.

Neadekvatno regulisana hiperglikemija i metabolički poremećaji koji je prate mogu da izazovu oštećenje funkcije i strukture jetre, pre svega preko izazivanja metaboličkog i oksidativnog stresa, dovodeći do hronične inflamacije niskog stepena (Cotrozzi i sar., 1997). Stoga, u ovom istraživanju procenjivan je hepatoprotektivni uticaj tronedeljne peroralne primene {NaP₅W₃₀} (20 mg/kg/ dan) kod dijabetičkih pacova određivanjem: (1) relativne mase jetre, (2) biohemijskih parametara funkcije jetre (aktivnosti AST, ALT i ALP, kao i koncentracije ukupnih proteina i albumina), (3) parametara oksidativnog stresa u homogenatu jetre (koncentracije SOD-1, GPx-1 i MDA) i (4) patohistoloških promena u jetri korišćenjem konvencionalne svetlosne i transmisionne elektronske mikroskopije. Sprovedeno istraživanje pokazuje da ispitivani heteropolivolframatom značajno snižava aktivnosti ALT i ALP u serumu dijabetičkih životinja u poređenju sa (kontrolnom) dijabetičkom grupom. Istovremeno, uočava se normalizacija morfoloških promena na patohistološkim preparatima jetre dijabetičkih životinja koje su dobijale ispitivani heteropolivolframatom tokom tri nedelje. Nasuprot ovim rezultatima, relativna masa jetre, serumska aktivnost AST i serumske koncentracije ukupnih proteina i albumina, kao i koncentracije SOD-1, GPx-1 i MDA u homogenatu jetre, nisu se značajno menjale kod dijabetičkih životinja tretiranih ispitivanim heteropolivolframatom u poređenju sa (kontrolnom) dijabetičkom grupom. Ovakvi nalazi govore u prilog da odabrani

heteropolivolframmat kod dijabetičkih životinja sprečava razvoj i progresiju oštećenja jetre nezavisno od oksidativnog metabolizma, te su neophodna dalja, opsežna ispitivanja kompleksnih mehanizama hepatoprotektivnog dejstva ispitivanog heteropolivolframata pokazanog u ovom istraživanju.

Dobro je poznato da dugotrajno dejstvo dijabetesa i metaboličkih poremećaja koji ga prate, dovode do promena na glomerulima i bubrežnim tubulima (Reidy i sar., 2014). Iz tog razloga, savremeni međunarodni vodiči preporučuju da se prilikom odabira leka za snižavanje koncentracije glukoze u krvi daje prednost onima sa dokazanim nefroprotektivnim dejstvom, kako bi se sprečio nastanak, ali i progresija hronične bubrežne bolesti (Buse i sar., 2020). U tom smislu, procenjivan je nefroprotektivni uticaj tronedeljne peroralne primene $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 20 mg/kg kod dijabetičkih pacova određivanjem: (1) relativne mase bubrega, (2) biohemijskih parametara funkcije bubrega (koncentracije uree, kreatinina, mokraćne kiseline, KIM-1 i NGAL), (3) parametara oksidativnog stresa u homogenatu bubrega (koncentracije SOD-1, GPx-1 i MDA) i (4) patohistoloških promena u bubrežima korišćenjem konvencionalne svetlosne i transmisione elektronske mikroskopije. Pokazano je da ispitivani heteropolivolframmat statistički značajno snižava koncentraciju uree u serumu dijabetičkih životinja, u odnosu na (kontrolnu) dijabetičku grupu. Nasuprot ovim rezultatima, koncentracije mokraćne kiseline, KIM-1 i NGAL nisu se značajno menjale kod dijabetičkih životinja tretiranih ispitivanim heteropolivolframatom, u poređenju sa (kontrolnom) dijabetičkom grupom. Međutim, koncentracije SOD-1 i MDA pokazuju da ispitivani heteropolivolframmat značajno snižava nivo oksidativnog stresa u bubrežima dijabetičkih životinja. Takođe, na patohistološkim preparatima bubrega zapaža se uspostavljanje normalne građe bubrega kod dijabetičkih životinja koje su dobijale ispitivani heteropolivolframmat tokom tri nedelje.

Smatra se da povišen nivo oksidativnog stresa ima važnu ulogu u razvoju i progresiji dijabetičke kardiomiopatije (Huynh i sar., 2014). Stoga, u ovom istraživanju ispitivan kardioprotektivan uticaj tronedeljne peroralne primene $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ (20 mg/kg/ dan) kod dijabetičkih pacova određivanjem: (1) relativne mase srca i (2) parametara oksidativnog stresa u homogenatu srca. Dobijeni rezultati pokazuju da primena ispitivanog heteropolivolframata smanjuje koncentraciju SOD-1 u homogenatu srca dijabetičkih životinja, u poređenju sa (kontrolnom) dijabetičkom grupom. Nasuprot ovome, ispitivani heteropolivolframmat nije uticao na relativnu masu srca kao i na koncentracije GPx-1 i MDA u homogenatu srca

dijabetičkih životinja u odnosu na (kontrolnu) dijabetičku grupu. Smanjena koncentracija SOD-1 ukazuje da {NaP₅W₃₀} smanjuje kapacitet antioksidativne zaštite u srcu dijabetičkih životinja, te su neophodna dalja i detaljnija ispitivanja.

Američko udruženje kardiologa i Centar za kontrolu bolesti dali su 2003. godine preporuku da bi za procenu kardiovaskularnog rizika, pored tradicionalnih faktora rizika, trebalo ispitati i biohemijske parametre inflamacije (Pearson i sar., 2003). Imajući to u vidu, u ovom istraživanju određivane su koncentracije CRP i feritina u serumu eksperimentalnih životinja, u cilju procene zaštitnog dejstva ispitivanog heteropolivolframata na razvoj vaskularne inflamacije. Dobijeni rezultati pokazuju da primena ispitivanog heteropolivolframata (20 mg/kg/dan) tokom tri nedelje nije značajno uticala na serumske koncentracije CRP i feritina kod dijabetičkih pacova u odnosu na (kontrolnu) dijabetičku grupu. Međutim, treba naglasiti da navedene rezultate treba tumačiti sa rezervom, jer se serumske koncentracije ispitivanih biohemijskih parametara inflamacije nisu statistički značajno menjale kod (kontrolnih) dijabetičkih životinja u odnosu na kontrolnu normoglikemičku grupu, što indirektno može da ukaže da kod (kontrolnih) dijabetičkih životinja nije došlo do razvoja inflamatornih aterosklerotskih plakova i dijabetičke vaskulopatije.

Smatra se da povećan nivo oksidativnog stresa u različitim regionima mozga, ali i promena aktivnosti enzima uključenih u procese neurotransmisije, imaju važnu ulogu u nastanku i razvoju dijabetičke encefalopatije (Nandi i sar., 2019, Liguri i sar., 1990). Shodno tome, u ovom istraživanju procenjivan je neuroprotektivni uticaj tronedeljne peroralne primene {NaP₅W₃₀} u pojedinačnoj dnevnoj dozi od 20 mg/kg kod dijabetičkih pacova određivanjem: (1) aktivnosti AChE, Na⁺/K⁺-ATPaze i ecto-ATPaza i (2) parametara oksidativnog stresa u sinaptozomima izolovanim iz celih mozgova pacova. Dobijeni rezultati pokazuju da primena ispitivanog heteropolivolframata povećava sinaptozomalnu aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze kod dijabetičkih životinja u poređenju sa (kontrolnom) dijabetičkom grupom, što indirektno govori u prilog da ispitivani heteropolivolframmat može da spreči i nastanak dijabetičke encefalopatije. Nasuprot ovome, nije dobijena značajna razlika u sinaptozomalnoj aktivnosti AChE i ecto-ATPaza, kao i u sinaptozomalnoj koncentraciji SOD-1, GPx-1 i MDA između (kontrolne) dijabetičke grupe i dijabetičke grupe koja je dobijala ispitivani heteropolivolframmat tokom tri nedelje.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Dinčić M, Čolović MB, Matutinović MS, Četković M, Stevović TK, Mougharbel AS, Todorović J, Ignjatović S, Radosavljević B, Milisavljević M, Kortz U, Krstić DZ. ***In vivo* toxicity evaluation of two polyoxotungstates with potential antidiabetic activity using Wistar rats as a model system.** RSC Advances (2020) 10(5):2846-55. M22, IF 3,361

Dinčić M, Čolović MB, Todorović J. **Jedinjenja vanadijuma — novi mogući lekovi u terapiji šećerne bolesti.** Medicinski podmladak. doi: 10.5937/mp75-43694.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Heteropolivolframati kao mogući antidijabetici: uticaj na hiperglikemiju i procena hepato- i nefrotoksičnosti u eksperimentalnom modelu dijabetesa izazvanim streptozotocinom kod pacova**“ kandidata dr Marka Dinčića predstavlja original naučni rad koji po prvi put istražuje antidijabetičko i toksično svojstvo sintetisanih $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ i $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$. Pregledom literature može se zaključiti da su dosadašnje studije ispitivale samo uticaj strukturno različitih POM na snižavanje hiperglikemije, a da je ovo prva *in vivo* studija koja je, pored antihiperglikemijskog dejstva, istraživala i pokazala hepatoprotektivno, nefroprotektivno, kardioprotektivno i neuroprotektivno dejstvo sintetisanog $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ kod dijabetičkih životinja. Izučavanje mogućih mehanizama dejstva heteropolivolframata koji učestvuju u snižavanju hiperglikemije dovelo je do saznanja da ispitivani heteropolivolframati stimuliše oslobađanje insulina iz β -ćelija Langerhansovih ostrvaca pankreasa. Ovo predstavlja poseban naučni doprinos ove disertacije, jer mehanizmi antihiperglikemijskog delovanja POM još uvek nisu dovoljno istraženi niti rasvetljeni. Takođe, po prvi put je pokazano da akutna peroralna primena $\{\text{NaP}_5\text{W}_{30}\}$ i $\{\text{AgP}_5\text{W}_{30}\}$ ispoljava blagi do umereni hepato- i nefrotoksični efekat kod zdravih pacova. Moglo bi se reći i da ovaj nalaz ima naučnu vrednost zato što se u literaturi nalazi relativno malo podataka o bezbednosnom profilu bioaktivnih POM, a dobro je poznata činjenica da svaki novi lek-kandidat mora da ispuni tri osnovna zahteva: kvalitet, bezbednost i efikasnost. Budući da dijabetes poprima pandemijske razmere i predstavlja ozbiljan globalni zdravstveni problem, predmet ove doktorske disertacije je od izuzetnog značaja za napredak nauke u pravcu pronalaženja novih ne-insulinskih lekova-kandidata u terapiji dijabetesa.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a

metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

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

U Beogradu i Kragujevcu, 07.07.2023. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Danijela Krstić

Prof. dr Mila Četković Milisavljević

Prof. dr Branimir Radosavljević

Doc. dr Neda Milinković

Prof. dr Zorica Jovanović

Mentori:

Prof. dr Jasna Todorović

VNS dr Mirjana Čolović
