

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Стручног већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-268/49, од 13. 04. 2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Драгице Селаковић, под називом:

„Бихевиорални ефекти хроничне примене супрафизиолошких доза андрогених анаболичких стероида и програмираног тренажног процеса код пацова“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник
2. **Проф. др Драган Миловановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан
3. **Доц. др Нела Пушкаш**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан
4. **Проф. др Зорица Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
5. **Доц. др Владимир Јањић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу следећи

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Драгица Селаковић рођена је 29. 07. 1984. године у Крагујевцу. Уписала Медицински факултет у Крагујевцу 2003. године, који је завршила 24. 02. 2012. године са просечном оценом 8.91. Обавила је приправнички стаж и положила стручни испит. Школске 2014/2015. године је уписала трећу годину докторских академских студија, на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Положила је све испите предвиђене планом и програмом студијског програма, и остварила просечну оцену 9.83, као и усмени докторантски испит са оценом 10. Од августа 2013. радила је као сарадник у настави за ужу научну област Физиологија на свим студијским програмима на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, док је од 2015. године у звању асистента.

Активно се бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за бихевиорална истраживања. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Бихевиорални ефекти хроничне примене супрафизиолошких доза андрогених анаболичких стероида и програмираног тренажног процеса код пацова“

Предмет: Утврђивање бихевиоралних ефеката хроничне примене супрафизиолошких доза андрогених анаболичких стероида (нандролон деканоата и тестостерон енантата) и програмираног тренажног процеса код пацова.

Хипотеза: Дуготрајна примена супрафизиолошких доза андрогених анаболичких стероида и програмираног тренажног процеса утиче на физичку спремност и више мождане функције пацова.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је као први аутор објавила рад у целини у часопису категорије M52 који излази на једном од водећих светских језика, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

Selakovic D and Joksimovic J. Behavioural effects of short-term total food restriction in rats. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research. 2014; 15 (3): 129-137. **M52 – 1,5 бод**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Андрогени анаболички стероиди (ААС), синтетски деривати тестостерона, се већ деценијама користе у терапијске сврхе, мада се у последње време повећава преваленца бихевиоралних поремећаја (непровоцирана агресија и насиље...) који настају као последица злоупотребе ААС, нарочито код адолесцената. Студије извођене на анималним моделима су, такође, показале улогу ААС у модулацији емоционалног понашања. Ипак, подаци из литературе су веома контрадикторни, па су тако описани анксиолитички, као и анксиогени ефекти ААС на пацовима. Како би се отклониле дилеме у вези са бихевиоралним ефектима ААС, у овој студији ће се анализирати ефекти два представника најчешће коришћених ААС, нандролон деканоата и тестостерон енантата, у супрафизиолошким дозама које одговарају дозама за које постоје подаци код злоупотреба у хуманој популацији. Иако постоје бројни подаци о корисности дуготрајне физичке активности на физичку спремност, утицај тренинга на емоционалне аспекте понашања је релативно касно утврђен, како у хуманој популацији, тако и код животиња. Међутим, резултати добијени након симултаног претретмана ААС и дуготрајног тренажног процеса су веома контрадикторни. Описано је да истовремена примена ААС и тренинга поправља физичку спремност код пацова, али и да администрација ААС смањује корисне ефекте тренинга на физичку спремност и анксиозност.

Хронични третман са ААС утиче на експресију андрогених и естрогених рецептора у специфичним регионима мозга одговорним за модулацију понашања. Дуготрајни тренажни процес, такође, утиче на експресију андрогених и естрогених рецептора у хипокампусу са одговарајућим бихевиоралним манифестацијама. Ефекти истовремене примене ААС и дуготрајног тренинга на понашање, који су повезани са експресијом рецептора полних хормона у специфичним регионима мозга, још увек нису описани. Хистоморфолошке студије су потврдиле утицај дуготрајног тренинга на експресију парвалбумина (калцијум-везујућег протеина габаергичких инхибиторних неурона) у

хипокампусу, што за последицу има промене у бројним вишим функцијама мозга, при чему не постоје подаци о утицају ААС на експресију парвалбумина.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Значај студије се огледа у томе што би резултати овог истраживања требало да омогуће прецизније дефинисање ефеката хроничног третмана супрафизиолошким дозама ААС, попут оних који се срећу код злоупотреба у хуманој популацији, на физичку спремност и више функције мозга. Такође, резултати ове студије би требало да омогуће бољи увид у бихевиоралне ефекте симултаног коришћења ААС и дуготрајног тренинга, што представља најчешћи облик коришћења ААС у адолесцентној популацији. Значај ове студије се може манифестовати и кроз пружање бољег увида у хистоморфолошку основу промена у понашању (алтерације у експресији рецептора за полне хормоне, као и у експресији парвалбумина у специфичним регионима мозга одговорним за модулацију понашања) које могу бити последица дуготрајне злоупотребе ААС.

Циљ и хипотезе студије

Циљеви студије су утврђивање бихевиоралних ефеката хроничне примене супрафизиолошких доза андрогених анаболичких стероида (нандролон деканоата и тестостерон енантата), дуготрајног програмираног тренажног процеса, као и симултане администрације ААС и дуготрајног програмираног тренажног процеса код пацова. Поред тога, циљеви би обухватили и дефинисање могуће хистоморфолошке основе (промене у експресији рецептора полних хормона, као и промене у експресији парвалбумина у специфичним регионима мозга) за промене у понашању пацова индуковане хроничним третманом ААС и/или дуготрајним тренажним процесом.

Хипотезе истраживања су да хронична примена супрафизиолошких доза нандролон деканоата и тестостерон енантата, дуготрајни програмирани тренажни процес, као и симултана администрација ААС са дуготрајним програмираним тренажним процесом утичу на физичку спремност и више мождане функције пацова. Такође, у хипотезе сврставамо и да су промене у понашању пацова индуковане хроничним третманом ААС и/или дуготрајним тренажним процесом удружене са променама у експресији рецептора полних хормона, као и са променама у експресији парвалбумина у специфичним регионима мозга.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Андрогени анаболички стероиди (ААС), синтетски деривати тестостерона, се користе у терапијске сврхе од средине двадесетог века. Готово у исто време, врхунски спортисти су почели да користе ААС у циљу побољшања спортских резултата. У последњих неколико деценија се злоупотреба ААС масовно проширила међу мушкарцима у периоду адолесценције. Масовна злоупотреба ААС се повезује са повећаном преваленцом бихевиоралних поремећаја (непровоцирана агресија и насиље...), нарочито код адолесцената. Улога ААС у модулацији емоционалног понашања је потврђена и у

студијама извођеним на анималним моделима. Резултати ових студија су веома контрадикторни, па су тако описани анксиолитички, као и анксиогени ефекти ААС на пацовима. У циљу јасног дефинисања бихејвиоралних ефеката ААС, у овој студији ће се анализирати ефекти два представника најчешће коришћених ААС, нандролон деканоата и тестостерон енантата, у супрафизиолошким дозама које одговарају дозама за које постоје подаци код злоупотреба у хуманој популацији. Подаци о корисним ефектима дуготрајне физичке активности на физичку спремност су одавно познати и недвосмислени, али је утицај тренинга на емоционалне аспекте понашања релативно касно утврђен, како у хуманој популацији, тако и код животиња. Бихејвиорални ефекти симултане примене ААС и дуготрајног тренажног процеса су веома контрадикторни. Познато је да истовремена примена ААС и тренинга поправља физичку спремност код пацова, али и да администрација ААС смањује корисне ефекте тренинга на физичку спремност и анксиозност.

2.7. Методе истраживања

У питању је експериментална студија на животињама и анималном материјалу *in vivo* и *in vitro*.

Планирано истраживање би обухватило 64 пацова (Wistar albino сој, мушки пол, старости 10-12 недеља; просечне телесне масе 250-300 g; са Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња, Војно-Медицинска академија Београд). Животиње ће боравити (4 животиње по кавезу) у контролисаним условима околине (температура - 23 ± 1 °C, циклус светло/мрак - 12/12h) уз неограничен приступ храни и води.

Истраживање ће бити подељено у осам (8) експерименталних група (8 животиња у групи):

1. контролна група за нандролон* - супкутана администрација стерилисаног рафинисаног маслиновог уља у запремини од 2-3 ml, једном недељно, током 6 недеља;
2. нандролон група* - супкутана администрација нандролон деканоата (20 mg/kg телесне масе), раствореног у стерилисаном рафинисаном маслиновом уљу, максималне укупне запремине од 3 ml, једном недељно, током 6 недеља;
3. тренинг група за нандролон** - пливање у базену (вода загрејана до 31 ± 1 °C), у трајању од 60 минута, 5 узастопних дана са 2 дана паузе, током 6 недеља;
4. комбинована група за нандролон - супкутана администрација нандролон деканоата (20 mg/kg телесне масе), раствореног у стерилисаном рафинисаном маслиновом уљу, максималне укупне запремине од 3 ml, једном недељно, уз пливање у базену (вода загрејана до 31 ± 1 °C), у трајању од 60 минута, 5 узастопних дана са 2 дана паузе, током 6 недеља;
5. контролна група за тестостерон* - супкутана администрација стерилисаног рафинисаног маслиновог уља у запремини од 2-3 ml, једном недељно, током 6 недеља;

6. тестостерон група* - супкутана администрација тестостерон енантата (20 mg/kg телесне масе), раствореног у стерилисаном рафинисаном маслиновом уљу, максималне укупне запремине од 3 ml, једном недељно, током 6 недеља;
7. тренинг група за тестостерон** - пливање у базену (вода загрејана до $31\pm 1^\circ\text{C}$), у трајању од 60 минута, 5 узастопних дана са 2 дана паузе, током 6 недеља;
8. комбинована група за тестостерон - супкутана администрација тестостерон енантата (20 mg/kg телесне масе), раствореног у стерилисаном рафинисаном маслиновом уљу, максималне укупне запремине од 3 ml, једном недељно, уз пливање у базену (вода загрејана до $31\pm 1^\circ\text{C}$), у трајању од 60 минута, 5 узастопних дана са 2 дана паузе, током 6 недеља;

* животиње из ових група ће бити стављане у базен (под истим условима као и тренинг и комбиноване групе) у трајању од 1-2 минута, једном недељно, током 6 недеља

** животиње из ових група ће имати супкутану администрацију стерилисаног рафинисаног маслиновог уља у запремини од 2-3 ml, једном недељно, током 6 недеља

Након спроведеног хроничног третмана, животиње ће бити подвргнуте тестирању.

Бихевиорални тестови

Промене у понашању ће се одређивати на основу параметара добијених из тестова који ће се изводити у различитим лавиринтима:

А. Тест отвореног поља (параметри):

1. укупни пређени пут (cm)
2. просечна брзина кретања (cm/s)
3. укупно време проведено у централној зони (s)
4. учесталост уласка у централну зону
5. проценат времена кретања током трајања теста
6. усправљање
7. тимарење
8. број дефекација
9. број уринирања

Б. Тест уздигнутог крстастог лавиринта (параметри):

1. укупно време проведено у отвореним крацима (s)

2. учесталост уласка у отворене краке
3. укупни пређени пут (cm)
4. просечна брзина кретања (cm/s)
5. проценат времена кретања током трајања теста
6. нагињање
7. усправљање

В. Тест Барнсовог лавиринта (параметри):

1. проценат скраћења времена између два покушаја
2. проценат скраћења пређеног пута између два покушаја

Г. Тест ходања по брвну (параметар):

1. време потребно за прелазак (s)

Д. Провоцирани тест ходања по брвну (параметри):

1. време потребно за прелазак (s)
2. проценат скраћења времена у односу на резултат теста ходања по брвну

Ђ. Тест вруће плоче (параметар):

1. време до реакције (s)

Е. Ротарод тест (параметар):

1. време проведено на ротирајућем ваљку (s)

Ж. Тест хватања за жицу (параметар):

1. време до пада са жице (s)

З. Тест качења за реп (параметри):

1. време до прве имобилности (s)
2. број епизода имобилности
3. укупно трајање имобилности (s)

Извођење тестова ће се снимати дигиталном видео камером, а добијени видео записи ће се обрађивати помоћу одговарајућег софтверског пакета (Ethovision software [version XT 10 base] Noldus Information Technology, the Netherlands), у циљу добијања нумеричких параметара за квантификацију бихевиоралних манифестација.

Узорковање биолошког материјала

После завршеног тестирања, животиње ће, након анестезије (интраперитонеално примењена комбинација кетамина - 10 mg/kg и ксилазина - 5 mg/kg) бити жртвоване декапитацијом на гилотини. Узорци крви ће бити узимани у циљу одређивања хормонског статуса, док ће узорци можданог ткива бити узимани ради, евентуалне, хистолошке верификације промена изазваних наведеним третманима.

А. У узорцима крви биће одређиване концентрације:

1. тестостерона
2. естрогена

Б. У узорцима можданог ткива биће одређивана експресија:

1. андрогених рецептора
2. естрогених рецептора
3. парвалбумина

При експерименталном раду биће поштовани прописи о добробити лабораторијских животиња и правилник за рад са експерименталним животињама Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, који су усклађени са европском директивом у овој области.

Статистичка обрада података ће се вршити на следећи начин:

За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користиће се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користиће се Студентов т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, користиће се *Bonferroni* тест. Статистичка обрада података ће се радити у статистичком пакету *SPSS 18.0 for Windows*.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекивани резултати ће омогућити прецизније дефинисање ефеката хроничног третмана супрафизиолошким дозама ААС, попут оних који се срећу код злоупотреба у хуманој популацији, на физичку спремност и више функције мозга. Такође, резултати ове студије ће омогућити увид у бихевиоралне ефекте симултаног коришћења ААС и дуготрајног

тренинга, што представља најчешћи облик коришћења ААС у адолесцентној популацији. Такође, резултати овог истраживања ће омогућити бољи увид у хистоморфолошку основу промена у понашању (алтерације у експресији рецептора за полне хормоне, као и у експресији парвалбумина у специфичним регионима мозга одговорним за модулацију понашања) које могу бити последица дуготрајне злоупотребе ААС.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Злоупотреба андрогених анаболичких стероида (ААС) се манифестује кроз низ бихејвиоралних поремећаја. Циљ овог истраживања је утврђивање бихејвиоралних ефеката хроничне примене (6 недеља) супрафизиолошких доза нандролон деканоата и тестостерон енантата (које одговарају дозама за које постоје подаци код злоупотреба у хуманој популацији), као и ефекте симултане администрације ААС и дуготрајног програмираног тренажног процеса на анималном моделу пацова. Испитивање бихејвиоралних ефеката ААС и дуготрајне физичке активности ће се реализовати на основу параметара добијених у тестовима који ће се изводити у различитим лавиринтима: тест отвореног поља, тест уздигнутог крстастог лавиринта, тест Барнсовог лавиринта, тест ходања по брвну, тест вруће плоче, ротарод тест, тест хватања за жицу и тест качења за реп. Резултати ове студије омогућиће и дефинисање могуће хистоморфолошке основе (промене у експресији рецептора полних хормона и парвалбумина у специфичним регионима мозга одговорних за понашање) на бихејвиоралне промене пацова индуковане хроничним третманом супрафизиолошким дозама ААС и/или дуготрајним тренажним процесом.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Проф. др Гвозден Росић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови у вези са темом докторске дисертације:

Rosic G, Joksimovic J, Selakovic D, Milovanovic D, Jakovljevic V. Anxiogenic effects of chronic exposure to nandrolone decanoate (ND) at supraphysiological dose in rats: a brief report. *Neuro Endocrinol Lett.* 2014;35(8):703-10.

Obradovic Z, Pantovic S, Rosic G, Selakovic Z, Rosic M. The new experimental model for behavioral investigations in animal studies. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28:77-86.

Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, Srejovic I, Zivkovic V, Tatalović N, Orescanin-Dusic Z, Mitrovic S, Ilic M, Jakovljevic V. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. *Toxicol Lett* 2016; 242:34-46.

V. Zdravkovic, S. Pantovic, G. Rosic, A. Tomic-Lucic, N. Zdravkovic, M. Colic, Z. Obradovic, and M. Rosic. Histamine blood concentration in ischemic heart disease patients. J Biomed Biotechnol 2011; 2011:315709.

M.A. Rosic, S. Pantovic, G.L. Rosic, A. Tomic-Lucic, T. Labudovic, V. Zivkovic and V. Jakovljevic. Glucagon effects on ischemic vasodilatation in the isolated rat heart. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010; 2010:231832.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Физиологија.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник
2. **Проф. др Драган Миловановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан
3. **Доц. др Нела Пушкаш**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан
4. **Проф. др Зорица Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
5. **Доц. др Владимир Јањић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија, члан

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове др Драгице Селаковић, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита утицај хроничне примене супрафизиолошких доза андрогених анаболичких стероида (нандролон деканоата и тестостерон енантата), дуготрајног програмираног тренажног процеса, као и симултане администрације ААС и дуготрајног програмираног тренажног процеса на бихевиоралне ефекте код пацова. Поред тога, значајан допринос ће се остварити и кроз дефинисање могуће хистоморфолошке основе (промене у експресији рецептора полних хормона, као и промене у експресији парвалбумина у специфичним регионима мозга) за промене у понашању пацова индиковане хроничним третманом ААС и/или дуготрајним тренажним процесом.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Драгице Селаковић бити од великог научног и практичног значаја у смислу проучавања различитих манифестација у понашању услед хроничне примене супрафизиолошких доза андрогених анаболичких стероида, дуготрајног програмираног тренажног процеса, као и симултане администрације ААС и дуготрајног програмираног тренажног процеса код пацова.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Драгице Селаковић „**Бихевиорални ефекти хроничне примене супрафизиолошких доза андрогених анаболичких стероида и програмираног тренажног процеса код пацова**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник

2. **Проф. др Драган Миловановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан

3. **Доц. др Нела Пушкаш**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан

4. **Проф. др Зорица Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

5. **Доц. др Владимир Јањић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија, члан

У Крагујевцу, 20. 04. 2016.