

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

01.10.2019.	
05	19 185-1

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-716/50 од 16. 09. 2019. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Игора Кумбуровића под називом:

„Ефекти примене екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване цисплатином 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 Тихомир Илић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан;
3. **Доц. др Драгица Селаковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан.

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

2. Извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Игор Кумбуровић је рођен 08.03.1975. године у Котору, Република Црна Гора. Основну школу и гимназију – математички смер је завршио у Котору. Медицински факултет у Крагујевцу уписао је школске 1994/1995 године, а звање доктора медицине стекао је 2002. године. Након завршених студија обавио је обавезан приправнички стаж и положио стручни испит 2003. године у Београду. Запошљава се у Општој болници у Котору као одељенски лекар. Специјализацију из области опште хирургије је уписао 2005. године на Медицинском факултету у Београду и успешно завршио у року, са одличном оценом. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао је школске 2012/2103. године – изборно подручје Неуронауке. Положио је све испите предвиђене планом и програмом студија. Усмени докторски испит положио је у јуну 2019. године. Од 2016. године је директор Дома здравља у Котору и ради као хирург у Општој болници у Котору.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Ефекти примене екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване цисплатином код пацова“

Предмет: Испитивање утицаја екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на промене у понашању које настају након једнократне администрације цисплатине, уз анализу биомаркера оксидативног стреса и апоптозе у ткиву хипокампуса пацова.

Хипотеза: Антиоксидантна суплементација екстрактом биљке *Satureja hortensis* L. утиче на промену понашања која настаје након примене цисплатине код пацова.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је као први аутор објавио један рад у целини у часопису категорије M51 на једном од водећих светских језика, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Kumburovic I, Kumburovic D, Vujovic S, Rajkovic Z, Velickovic S. The effects of *Satureja hortensis* L. Extract on cisplatin-induced behavioral alterations in the tail suspension test, Serbian Journal of Experimental and Clinical Research, 2019; DOI:10.2478/sjecr-2019-0029. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Цисплатина ($\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$) је антитуморски лек који је широко распрострањен у хемиотерапији за различите врсте малигнитета. Платински комплекси остварују своје дејство претежно унакрсним повезивањем са ДНК (уз индукцију оксидативног стреса – ОС), што иницира програмирану ћелијску смрт – апоптозу. Иако се сматра врло ефикасном у третману тумора, цисплатина је екстремно токсична и узрокује различите нежељене ефекте, као што су: нефротоксичност, неуротоксичност, ототоксичност и повраћање. Бројна нежељена дејства представљају главни лимитирајући фактор у терапији цисплатином. Испитивања неуротоксичности цисплатине на анималним експерименталним моделима су показала да долази до оштећења неурона церебралног кортекса, са израженим променама на Пуркињијевим ћелијама, које су есенцијална структура за контролу покрета. У различитим студијама, терапија цисплатином је доводила до поремећаја когнитивних функција код људи, као и поремећаја расположења код пацова.

С обзиром да је механизам деловања цисплатине удружен са повећањем ОС, бројне експерименталне студије су показале корисне ефекте примене антиоксиданаса у смањењу нежељених ефеката који настају као последица повећања ОС. *Satureja hortensis* L. (чубар), једногодишња биљка из породице *Lamiaceae*, има лековита својства која су од давнина позната у народној медицини. У листу ове биљке присутан је висок садржај антиоксиданаса у облику фенолних једињења, нарочито рузмаринске киселине и флавоноида. Примена рузмаринске киселине у превенцији промена параметра ОС, као и последичних промена у когнитивним функцијама код стрептозотоцином изазваног дијабетеса, је дала добре резултате у студији на пацовима. Поред тога, доказан је и антидепресантни ефекат рузмаринске киселине у студијама *in vivo*, као и потенцијални механизам дејства који остварује критичну улогу у фармаколошком дејству овог једињења

у студијама *in vitro*. Како се позитивни ефекти рузмаринске киселине остварују не само уклањањем слободних радикала, већ и индиректним механизмима као што су повећање активности ензима антиоксидативне заштите, односно ослобађање антиинфламаторних сигналних молекула, циљ овог рада је да се испита потенцијални неуропротективни ефекат екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на неуротоксичност изазвану цисплатином.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања

По први пут би се испитивала могућност примене антиоксидантне суплементације у облику екстракта биљке *Satureja hortensis* L. код пацова третираних цисплатином, у смислу утицаја на бихевиоралне манифестације неуротоксичности која представља једно од типичних нежељених дејстава терапије цисплатином. Евентуално смањивање оксидативног оштећења и атенуација апоптотских механизма у нервном систему (са очекиваним степеном побољшања бихевиоралних параметара), као последица наведене врсте антиоксидантне суплементације, би омогућила ублажавање нежељених ефеката цисплатине и на тај начин проширила терапијски интервал за примену ове врсте хемиотерапије.

Циљ истраживања

Уз основни циљ који представља дефинисање утицаја антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Satureja hortensis* L. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности цисплатине, појединачни циљеви овог истраживања би били:

1. Утврђивање бихевиоралних манифестација након примене цисплатине код пацова;
2. Утврђивање бихевиоралних манифестација након примене екстракта биљке *Satureja hortensis* L. код пацова;
3. Утврђивање бихевиоралних манифестација након симултане примене цисплатине и силимарина код пацова;
4. Утврђивање бихевиоралних манифестација након симултане примене цисплатине и екстракта биљке *Satureja hortensis* L. у три различите дозе код пацова;
5. Утврђивање промена вредности параметара оксидативног стреса у ткиву мозга код пацова третираних цисплатином и/или екстрактом биљке *Satureja hortensis* L.

Хипотезе истраживања

1. Примена цисплатине код пацова утиче на промене у понашању;
2. Примена екстракта биљке *Satureja hortensis* L. утиче на промене у понашању код пацова;
3. Симултана примена цисплатине и силимарина утиче на промене у понашању код пацова;
4. Симултана администрација цисплатине и екстракта биљке *Satureja hortensis* L. утичу на промене у понашању код пацова;

5. Примена цисплатине и екстракта биљке *Satureja hortensis* L. изазивају промене нивоа параметара оксидативног стреса у можданом ткиву пацова.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Цисплатина је један од најбољих и први цитостатик на бази метала, са великом применом у савременој хемиотерапији (готово 50% пацијената са дијагнозом малигне болести који се лечи хемиотерапијом добија препарате на бази платине). Ипак, терапија цисплатином има значајна ограничења са клиничког аспекта – резистенција према терапији и бројни нежељени ефекти. Најчешћи нежељени ефекти цисплатине (нефротоксичност, хепатотоксичност, неуротоксичност...) имају исту патофизиолошку основу: оштећење ДНК, повећање оксидативног стреса и стимулацију апоптотских механизма. Из наведених разлога, актуелне су бројне студије у којима се испитује потенцијални протективни ефекат антиоксидантне суплементације код различитих типова токсичности изазваних применом цисплатине, укључујући и неуротоксичност. Како се често дискретне промене расположења могу уочити пре испољавања (често иреверзибилних) класичних манифестација неуротоксичности цисплатине, које се најчешће везују за последице оштећења периферних нерава, бихевиорална тестирања се сматрају веома корисним у детектовању раних фаза неуротоксичности.

Резултати студије у којима су *in vivo* и *in vitro* испитивани утицаји различитих врста антиоксиданаса су показали да овакав третман може довести до значајног смањења оксидативног оштећења изазваног применом цисплатине. У последње време, нарочито су актуелна испитивања утицаја примене препарата природног порекла који садрже значајне концентрације антиоксидантних компоненти. Између осталог, показано је и да екстракт биљке чубар (*Satureja hortensis* L.), аутохтоног порекла, значајно смањује ниво маркера оксидативног оштећења јетре и бубрега изазваног једнократном администрацијом цисплатине. Имајући у виду да су патофизиолошки механизми токсичности цисплатине готово идентични у различитим органским системима, нова истраживања у вези са терапијском применом екстракта ове биљке, која би обухватила и испитивања утицаја на неуротоксичност, представљају потенцијалну могућност за примену природних препарата у третману ове врсте нежељених ефеката цисплатине.

2.7. Методе истраживања

2.7.1 Врста студије

Истраживање је осмишљено као експериментална студија на животињама *in vivo* и на узоркованом материјалу *in vitro*.

2.7.2. Експерименталне животиње

Планирано истраживање би обухватило 56 пацова мушког пола Wistar albino соја (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 током 2 недеље третмана. Све експерименталне процедуре ће се радити у складу са прописаним актима (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC) и ARRIVE упутству.

2.7.3. Узорковање

Истраживање ће бити подељено у седам (7) експерименталних група (8 животиња у групи):

1. контролна група – интраперитонеална администрација физиолошког раствора у запремини од 1 ml, петог дана протокола;
2. цисплатина група – интраперитонеална администрација цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе), петог дана протокола;
3. екстракт биљке *Satureja hortensis* L. група – орална администрација екстракта биљке *Satureja hortensis* L., раствореног у води у концентрацији која, уз просечни дневни унос воде, омогућава дневни унос од 200 mg/kg телесне масе, свакодневно, током 10 дана;
4. цисплатина и силимарин група – интраперитонеална администрација цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе) петог дана протокола, орална примена силимарина раствореног у води у концентрацији која, уз просечни дневни унос воде, омогућава дневни унос од 100 mg/kg телесне масе, свакодневно, током 10 дана;
5. цисплатина и *Satureja hortensis* L. 50 mg група – интраперитонеална администрација цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе) петог дана протокола, орална примена екстракта биљке *Satureja hortensis* L. раствореног у води у концентрацији која, уз просечни дневни унос воде, омогућава дневни унос од 50 mg/kg телесне масе, свакодневно, током 10 дана;
6. цисплатина и *Satureja hortensis* L. 100 mg група – интраперитонеална администрација цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе) петог дана протокола, орална примена екстракта биљке *Satureja hortensis* L. раствореног у води у концентрацији која, уз просечни дневни унос воде, омогућава дневни унос од 100 mg/kg телесне масе, свакодневно, током 10 дана;
7. цисплатина и *Satureja hortensis* L. 200 mg група – интраперитонеална администрација цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе) петог дана протокола, орална примена екстракта биљке *Satureja hortensis* L. раствореног у води у концентрацији која, уз просечни дневни унос воде, омогућава дневни унос од 200 mg/kg телесне масе, свакодневно, током 10 дана.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

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

Тест отвореног поља:

1. укупни пређени пут (cm)

2. укупно време проведено у централној зони (s)
3. учесталост уласка у централну зону
4. проценат времена кретања током трајања теста
5. број усправљања

Тест уздигнутог крстастог лавиринта:

1. укупно време проведено у отвореним крацима (s)
2. учесталост уласка у отворене краке
3. укупни пређени пут (cm)
4. проценат времена кретања током трајања теста
5. број нагињања
6. број усправљања
7. број епизода укупне експлоративне активности

Тест качења за реп:

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 12, Noldus Information Technology, the Netherlands), у циљу добијања нумеричких параметара за квантификацију бихевиоралних манифестација.

После завршеног тестирања, животиње ће, након анестезије (интраперитонеално примењена комбинација кетамина – 10 mg/kg телесне масе и ксилазина – 5 mg/kg телесне масе) бити жртвоване декапитацијом на гилјотини. Узорци хипокампуса ће бити узимани у циљу одређивања промена оксидативног статуса и апоптозе изазваних наведеним третманима.

Параметри за (спектрофотометријску) квантификацију оксидативног статуса у мозданом ткиву:

1. активност каталазе (U/mg протеина)
2. активност супероксид дисмутазе (U/mg протеина)
3. укупни глутатион (mg/g протеина)
4. индекс липидне пероксидације (изражен као TBARS, nmol/mg протеина)

Параметри за процену апоптотске активности („real-time PCR“ метод):

1. релативна експресија проапоптотских гена – Bax, caspase-3
2. релативна експресија антиапоптотских гена – Bcl-2

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Пројекција узорка је изведена на основу претходно публикованих резултата из сличног истраживања у коме су испитивани ефекти цисплатине на брзину кретања у тесту отвореног поља. Средња вредност величине овог параметра у контролној групи је била 9 ± 0.5 cm/s, док је у експерименталној групи (цисплатина 5 mg/kg телесне масе, 5 недеља)

била знатно мања 4.5 ± 0.3 cm/s. На основу тога, претпоставка је да ће у овој студији употреба цисплатине смањити величину (смањити брзину) овог параметра у експерименталним групама најмање за поменути разлику (око 50%). На основу ових података, за т-тест два независна узорка (алфа 0.05, снага студије 0.8, однос 1:1 у две групе), коришћењем одговарајућег рачунарског програма – G*Power 3 добија се број од по 2 експерименталне животиње у свакој групи. Наведени број животиња је повећан на 8 по експерименталној групи сходно методолошким препорукама за корекцију претпостављене непараметарске дистрибуције података као и због броја експерименталних животиња које неће бити део завршне анализе (очекивани губитак током хроничног третмана). Имајући у виду да ће у истраживању бити обухваћено седам (7) група, укупан узорак је утврђен на 56 експерименталних животиња.

2.7.6. Статистичка анализа

Резултати ће се изражавати као средња вредност \pm средња стандардна грешка. За проверу хомогености варијансе добијених резултата користиће се Levene's-ов тест. За проверу нормалности расподеле користиће се Shapiro-Wilk-ов тест. За тестирање разлика између група користиће се једнофакторска ANOVA са одговарајућом post-hoc анализом. р вредност мања од 0.05 сматраће се статистички значајном. Целокупна статистичка анализа биће одрађена у статистичком пакету SPSS, верзија 20.0 (IBM SPSS Statistics 20).

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекивани резултати студије ће омогућити дефинисање бихевиоралних ефеката једнократне администрације цисплатине, као и утицај третмана екстрактом биљке *Satureja hortensis* L. код пацова. Такође, очекује се и утврђивање промена нивоа оксидативног стреса и апоптозе током примене цисплатине, са или без симултане администрације екстракта биљке *Satureja hortensis* L. Очекује се и да промене у понашању пацова индуковане третманом цисплатином и/или екстрактом биљке *Satureja hortensis* L. буду удружене са променама оксидативног стреса и апоптозе у хипокампусу пацова.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Satureja hortensis L. је лековита биљка са високим садржајем антиоксидантних састојака за које се очекује да могу смањити манифестације неуротоксичности изазване цисплатином, с обзиром да неуротоксичност представља једно од најчешћих нежељених дејстава које се јавља након терапијске примене овог често примењиваног цитостатика. Истраживање ће обухватити 56 мужјака Wistar albino пацова подељених у седам група. Животиње ће бити третиране цисплатином петог дана (7.5 mg/kg, i.p.) и екстрактом биљке *Satureja hortensis* L. у дозама (50, 100 и 200 mg/kg, орално), односно силимарином (100 mg/kg) током десет дана. Промене у понашању ће се утврдити на основу бихевиоралних тестова (тест отвореног поља, уздигнутог крстастог лавиринта и тест качења за реп). У ткиву хипокампуса ће се одређивати маркери оксидативног статуса и апоптозе.

3. Предлог ментора

Комисија предлаже за ментора ове дисертације **проф. др Гвоздена Росића**, редовног професора 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 **проф. др Гвоздена Росића** који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Joksimovic J, Selakovic D, Jovicic N, Mitrovic S, Mihailovic V, Katanic J, Milovanovic D, **Rosic G**. Exercise Attenuates Anabolic Steroids-Induced Anxiety via Hippocampal NPY and MC4 Receptor in Rats. *Front Neurosci*. 2019;13:172. doi: 10.3389/fnins.2019.00172.
2. Selakovic D, Joksimovic J, Jovicic N, Mitrovic S, Mihailovic V, Katanic J, Milovanovic D, Pantovic S, Mijailovic N, **Rosic G**. The Impact of Hippocampal Sex Hormones Receptors in Modulation of Depressive-Like Behavior Following Chronic Anabolic Androgenic Steroids and Exercise Protocols in Rats. *Front Behav Neurosci*. 2019;13:19. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00019.
3. Stajic D, Selakovic D, Jovicic N, Joksimovic J, Arsenijevic N, Lukic ML, **Rosic G**. The role of galectin-3 in modulation of anxiety state level in mice. *Brain Behav Immun*. 2019. pii: S0889-1591(19)30074-1. doi: 10.1016/j.bbi.2019.01.019.
4. Selakovic D, Joksimovic J, Zaletel I, Puskas N, Matovic M, **Rosic G**. The opposite effects of nandrolone decanoate and exercise on anxiety levels in rats may involve alterations in hippocampal parvalbumin-positive interneurons. *PLoS One*. 2017; 12(12):e0189595. doi: 10.1371/journal.pone.0189595.
5. Joksimovic J, Selakovic D, Matovic M, Zaletel I, Puskas N, **Rosic G**. The role of neuropeptide-Y in nandrolone decanoate-induced attenuation of antidepressant effect of exercise. *PLoS ONE*. 2017; 12(6): e0178922.

4. Научна област дисертације

Медицина.

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 Тихомир Илић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан;
3. **Доц. др Драгица Селаковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан.

Закључак и предлог комисије

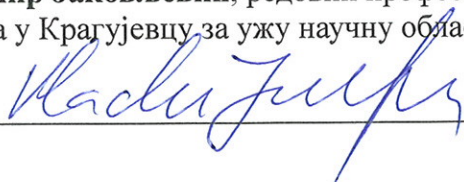
На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове, Комисија закључује да кандидат др Игор Кумбуровић испуњава све услове прописане Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Комисија је утврдила да се ради о оригиналном научном делу које има за циљ да испита утицај антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Satureja hortensis* L. на бихевиорлане манифестације неуротоксичности изазване цисплатином. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

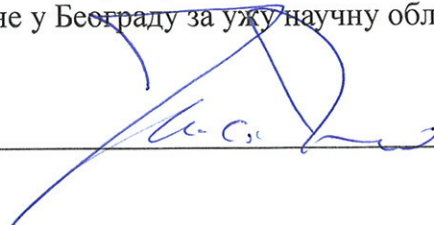
Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Игора Кумбуровића: „Ефекти примене екстракта биљке *Satureja hortensis* L. на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване цисплатином код пацова“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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



Проф. др Тихомир Илић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан;



Доц. др Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан.



У Крагујевцу, 23.09.2019. године