

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
У КРАГУЈЕВЦУ – БИУ

ПРИМЉЕНО:		06.06.17	
Орг. јед.	Број	Прилог	Број лист
05	7278-1		

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

### 1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-456/26 од 03.05.2017. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др Јасмине Сретеновић** под називом:

**“Имунохистохемијске карактеристике и редокс статус хипофизно-гонадалног система након апликације анаболичког стероида перипуберталним и адултним мужјацима пацова“**

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. **Проф. др Сузана Пантовић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан;
3. **НС Верица Милошевић**, научни саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

### ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Јасмина Сретеновић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

## 2.1. Кратка биографија кандидата

Др Јасмина Сретеновић је рођена 1985. године у Краљеву, где је завршила основну школу и средњу медицинску школу. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу је уписала 2004. године, а завршила 2012. године. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу је уписала 2012 године, изборно подручје: Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Школске 2016/2017 поново је уписала 3 годину докторских академских студија на Факултету Медицинских Наука у Крагујевцу, положила је усмени докторски испит. Током студија била је студент демонстратор 5. година на предмету Хистологија и ембриологија од школске 2005/2006. до 2009/2010. године. Учествовала је на студентским конгресима. Међународну професионалну праксу у оквиру размене студената у трајању од месец дана обавила је на клиници за дерматовенерологију „А. Сигрос“ у Атини, септембра 2008.

## 2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

**Наслов:** “Имунохистохемијске карактеристике и редокс статус хипофизно-гонадалног система након апликације анаболичког стероида перипуберталним и адултним мужјацима пацова“

**Предмет:** Испитивање морфолошких промена које настају током адаптације хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине услед самосталне или комбиноване примене нандролон-деканата и физичке активности код мужјака пацова различите старосне доби.

**Хипотезе:** Хронична апликација нандролон деканата самостално или у комбинацији са физичким напором, изазива адаптивну реакцију хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине механизмом негативне повратне спреге што има за последицу смањење лучења гонадотропина и тестостерона. Снижење нивоа ових хормона у крви је последица или смањења броја секреторних ћелија или снижења њихове активности. Употреба ААС може довести и до промена прооксидативних и антиоксидативних ензима као и до атрофије тестиса. Ови ефекти су израженији у млађој популацији него у адултној.

### 2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Јасмина Сретеновић, је објавила рад у целини у часопису категорије M52, у коме је први аутор, чиме је стекла услов за пријаву теме докторске дисертације.

**Sretenovic J, Zivkovic V, Srejovic I, Milosavljevic Z.** The effects of high doses of nandrolone decanoate on cardiac muscle tissue. *Ser J Exp Clin Res.* 2016; 17 (4): 303-308. **M52**

### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Анаболички стероиди су синтетски деривати мушког полног хормона тестостерона. Настали су као покушај да се повећа анаболички, а да се смањи андрогени ефекат. Због својих анаболичких ефеката, употреба стероида, је последњих неколико деценија, постала широко распрострањена и неконтролисано примењивана како међу професионалним спортистима тако и међу рекреативцима. Најчешће их користе атлетичари, пливачи, бициклисти, дизајнери тегова и бодибилдери у циљу побољшања физичких перформанси, снаге, јачине и мишићне масе. Појединци узимају 10 до 100 пута веће дозе од терапијских, што доводи до одређених штетних ефеката на многе органске системе. ААС могу да се дају орално, парентерално у виду интрамускуларних инјекција, трансдермално у виду фластера и површинских гелова. Већина истраживања показала да је најчешћи временски период узимања ААС у интервалу од 4-12 недеља (што представља један стероидни циклус). Након завршетка једног циклуса следи период „чишћења“ у трајању од 4-6 недеља.

Тестостерон је примарно мушки полни хормон кога синтетишу тестиси. Он има различите функције у различитим фазама живота. У пубертету, овај хормон појачава лучење хормона раста и одговоран је за настанак секундарних сексуалних карактеристика које дечака преводу у мушкарца. Тестостерон регулише многе физиолошке процесе код одраслих мушкараца, укључујући метаболизам протеина мишића, сексуалне и когнитивне функције, еритропоезу, ниво липида у плазми, метаболизам коштаног ткива и др.

За сада се мало зна како физичка активност делује на хипофизно-гонадалну осовину, а имајући у виду да се мали број истраживача бавио испитивањем самосталних и комбинованих ефеката анаболичких стероида и физичке активности на хипофизно-гонадални систем, циљ овог истраживања је био испитивање самосталног ефекта

анаболичких стероида и физичке активности, али и њиховог удруженог ефекта на хистоморфометријске карактеристике ћелија циљних ткива као и на редокс статус организма пацова.

## 2.5. Значај и циљ истраживања

Имајући у виду заступљеност злоупотребе анаболичких стероида код професионалних и рекреативних спортиста, као и последице овакве примене анаболичких стероида, ово истраживање може да допринесе разумевању процеса који представљају патолошки супстрат за настајање поремећаја у функционисању хипофизно-гонадалног система услед узимања анаболичких стероида у различитом животном добу, као и утицај физичке активности на ове промене.

Циљ ове студије би био да испита морфолошке промена које настају током адаптације хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине услед самосталне или комбиноване примене нандролон-деканата и физичке активности код мужјака пацова различите старосне доби. У складу са овим општим циљем постављени су и следећи специфични циљеви:

1. Испитати морфофункционалне и стереолошке карактеристике FSH, LH ћелија хипофизе и тестиса младих и адултних мужјака пацова;
2. Испитати хистоморфометријске карактеристике скелетног мишића и масног ткива;
3. Утврдити серумске вредности фоликулостимулирајућег, лутеинизирајућег хормона, тестостерона;
4. Испитати учешће различитих параметара оксидативног стреса (нитрита ( $\text{NO}^-$ ), супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) као и антиоксидативних ензима типа каталазе (CAT), супероксид-дисмутазе (SOD) и глутатиона (GSH);
5. Утврдити корелацију између про-оксидативних и антиоксидативних параметара и хистолошких одлика FSH и LH ћелија;
6. Утврдити вредности гликемије и инсулинемије наше
7. Упоредити добијене резултате према старосној доби пацова.

## **2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима**

Нандролон-деканоат је дериват нортестостерона и најчешће се примењује у облику депо-препарата (Deca-Durabolin®, Organon, Holland). Данас је један од најчешће коришћених анаболичких стероида. Високо је анаболичан и има релативно низак андрогени индекс. Испољава ниску хепатотоксичност. Ранија истраживања показала су да злоупотреба ААС може изазвати многе штетне ефекте, као што су структурне и функционалне промене на јетри (укључујући и хепатоцелуларни карцином), хипертрофију леве коморе са диспропорционалном акумулацијом екстрацелуларног колагена и последичном фиброзом. Високе дозе ААС могу да изазову извештан степен тестикуларне атрофије, ултраструктурне промене на тестису и смањење нивоа циркулишућег тестостерона, као и да утичу на хипоталамо-хипофизно-гонаду осовину (HPG), у смислу смањења нивоа фоликулостимулирајућег хормона (FSH) и лутеинизирајућег хормона (LH). У литератури је описано да злоупотреба ААС може довести до већег ризика за настанак рака простате и импотенције.

За сада се мало зна како физичка активност делује на хипофизно-гонадалну осовину, али постоје подаци који указују на то да она доводи до промена нивоа полних хормона. Подаци у литератури су контрадикторни јер су утврђени како пораст тако и пад нивоа тестостерона у зависности од врсте физичке активности.

Ефекат комбиноване примене високих доза ААС и тренинга на репродуктивни систем мушкараца још увек није довољно истражен.

## **2.7. Методе истраживања**

### **2.7.1. Врста студије**

Хронична, експериментална студија на материјалу анималног порекла *in vitro*.

### **2.7.2. Популација која се истражује**

Планирано истраживање би обухватило 64 мужјака пацова Wistar albino соја. Животиње би биле старости 5 недеља (перипуберталне), просечне телесне масе 100-130g и 10 недеља (адултне), просечне телесне масе 200-250g све из виваријума Војномедицинске академије у Београду. Пацови би се чували у плексиглас-транспарентним кавезима, 4 животиње по

кавезу, са дном обложеним шушком, са храном и водом доступном *ад либитум* и константним амбијенталним условима (температура  $21\pm 2$  °C; влажност  $55\pm 5$  %; циклус светло-тама на 12ч са почетком светлог периода у 8:00 ч).

### **2.7.3. Узорковање**

Истраживање би обухватило хроничну серију експеримената.

У оквиру хроничне серије експеримената постојале би по четири испитиване групе, (8 животиња у свакој испитиваној групи) перипубеталних и адултних пацова и то:

1. Прву групу би сачињавале животиња које не тренирају и не примају нандролон-деcanoат (контролна група);
2. У другој групи би биле животиње које тренирају пливање у трајању од 1 сата дневно (5 дана у недељи) и не примају нандролон-деcanoат;
3. Трећу групу би чиниле животиње које не тренирају али примају нандролон-деcanoат у виду депо препарата (nandrolone decanoate - 20 mg/kg, s.c., у трајању од 4 недеље);
4. Четврту групу би чиниле животиње које тренирају пливање у трајању од 1 сата дневно (5 дана у недељи) и примају нандролон-деcanoат у виду депо препарата (nandrolone decanoate - 20 mg/kg, s.c., у трајању од 4 недеље).

### **2.7.4. Варијабле**

Пре почетка, али и током истраживачког периода, све животиње ће бити под сталним мониторингом при чему ће се недељно пратити телесна маса сваке животиње. Животиње које тренирају пливање, свакодневно ће пливати у посебно конструисаном базену за пацове димензија 120x80x50 cm (дужина, висина, ширина), пет дана у недељи, сат времена дневно. Температура воде биће 37°C. Након завршеног четворонедељног третмана нандролон-деcanoатом и тренингом, животиње ће бити жртвоване методом цервикалне дислокације у кетамин-ксилазин интраперитонеалној анестезији, при чему ће се узимати узорци крви и ткива. Непосредно пре жртвовања, прикупиће се узорци крви из репне вене. Узорци крви ће одстојати 15 мин на собној температури, а затим ће се центрифугирани (15 мин на 3000 обртаја), након чега ће се одвојити серум и/или плазма од супернатанта. Из серума ће се одређивати вредности тестостерона, FSH и LH, док би се из узорка плазме

одређивале вредности маркера оксидативног стреса ( $\text{NO}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ , TBARS,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и вредности антиоксидативних ензима (CAT, SOD, GSH). Такође ће се из прикупљених узорака одређивати вредности гликемије и инсулинемије наше.

Изоловане хипофизе, тестиси, скелетни мишићи и масно ткиво пацова би били измерени и фиксирани у 4% неутралном параформалдехиду (PFA) и припремани специјалним протоколима за хистолошку анализу. Фиксирање ткива би се вршило на собној температури током 24h. По завршеној фиксацији, узорци ткива били би дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (30%, 50%, 70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калупљени у парапласту. Попречни серијски пресеци, дебљине 5  $\mu\text{m}$  за тестис, скелетни мишић и масно ткиво и 3  $\mu\text{m}$  за хипофизу, биће сечени на ротационом микротому. Добијени пресеци ће се сушити на собној температури неколико дана, а након тога ће се депарафинисати у ксилолу и рехидратисати у опадајућем низу алкохола (100%, 96% и 70%), испирати у води, а потом бојити *Haematoxylin*-ом по *Mayer*-у, и 2% раствором еозина. Препатати ће бити дехидратисати, просветљени ксилолом и монтирати на плочице са DPX-ом према стандардном протоколу. Узорци ће бити анализирани на светлосном микроскопу на великом увећању.

За имунохистохемијско бојење ткива, серијски резови дебљине 5  $\mu\text{m}$  и 3  $\mu\text{m}$ , биће монтирани на посебне високо адхерентне плочице *UltraSuperFrost*. У ткиву хипофизе ће се обележавати FSH и LH ћелије применом специфичних примарних антитела ( $\beta\text{FSH}$  и  $\beta\text{LN}$ ), док би се на ткиву тестиса обележавао андрогени рецептор.

### **2.7.5. Снага студије и величина узорка**

Прорачун укупног узорка је заснован на претходно публикованим резултатима. За прорачун је коришћен Т-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма. Узимајући у обзир резултате ове студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 64 (односно по 8 животиња у свакој групи).

### **2.7.6. Статистичка обрада података**

За статистичку обраду резултата ће бити коришћен статистички програм *SPSS 18.0 for Windows*. Од метода аналитичке статистике за поређење нумеричких обележја посматрања између две групе користиће се Т-тест у случају нормалне расподеле података, или Mann-

Whitney тест у случају расподеле података различите од нормалне. За поређење просечних вредности параметарских обележја користиће се анализа варијансе (ANOVA) као и непараметарска варијанта теста по *Kruskal-Wallis* у зависности од расподеле података. Сви добијени резултати биће приказани табеларно и/или графички. Вредност  $p < 0,05$  сматраће се статистички значајном, вредност  $p < 0,01$  високо значајном.

## **2.8. Очекивани резултати докторске дисертације**

Добијени резултати ће послужити бољем разумевању одговора хипофизно-гонадалне осовине који настају употребом ААС. Ова сазнања могу бити корисна имајући у виду све учесталију употребу ових ААС међу млађим и старијим спортистима као и рекреативцима. Праћењем биохемијских параметара крви и маркера оксидационог стреса омогућио би се увид у промене морфофункционалних и стереолошких карактеристика испитиваних ткива насталих услед самосталне и комбиноване примене нандролон-деканата и физичке активности.

## **2.9. Оквирни садржај докторске дисертације**

Циљ овог истраживања је да испита ефекте анаболичких стероида и физичке активности, самостално или комбиновано, на морфолошке промене које настају током адаптације хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине код мужијака пацова различитог животног доба. Имајући у виду преваленцију злоупотребе анаболичких стероида, као и број ткива и органа на које ове супстанце остварују ефекте, а самим тим и могућност настајања великог броја поремећаја, резултати овог истраживања су свакако корисни са аспекта расветљавања њиховог дејства на хомеостазу хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине.

## **3. Предлог ментора**

За ментора ове докторске дисертације се предлаже проф. др Зоран Милосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија.

Проф. др Зоран Милосављевић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и 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 Зорана Милосављевића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Nikolic I, Andjelkovic M, Zaric M, Zelen I, Canovic P, **Milosavljevic Z**, Mitrovic M. Induction of mitochondrial apoptotic pathway by raloxifene and estrogen in human endometrial stromal ThESC cell line. Arch Med Sci. 2017; 13(2):293-301.
2. Kastratović T, Arsenijević S, Matović Z, Mitrović M, Nikolić I, **Milosavljević Z**, Protrka Z, Šorak M, Đurić J. Methotrexate and myotrexate induce apoptosis in human myoma fibroblasts (T hES cell line) via mitochondrial pathway. Acta Pol Pharm. 2015; 72(3):455-64.
3. Zaric M, Mitrovic M, Nikolic I, Baskic D, Popovic S, Djurdjevic P, **Milosavljevic Z**, Zelen I. Chrysin induces apoptosis in peripheral blood lymphocytes isolated from human chronic lymphocytic leukemia. Anticancer Agents Med Chem. 2015; 15(2):189-95.
4. **Milosavljevic Z**, Zelen I, Sazdanovic M. Autonomic innervation of the periglomerular arteries. Anal Quant Cytopathol Histpathol. 2014; 36(3):161-6.
5. **Milosavljevic Z**, Zelen I, Tanaskovic I, Sazdanovic M. Morphometric analysis of muscularis proper and myenteric plexus of the normal human oesophagus. Age related changes. Folia Morphol (Warsz). 2013; 72(3):223-9.

### 4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином

### 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 Сузана Пантовић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан;
3. **НС Верица Милошевић**, научни саветника Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан;

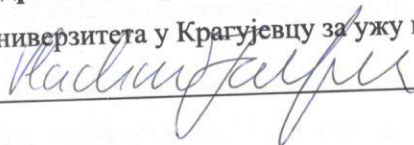
## ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, др Јасмина Сретеновић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

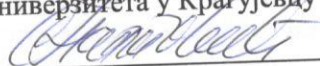
Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Јасмине Сретеновић, под називом **“Имунохистохемијске карактеристике и редоке статус хипофизно-гонадалног система након апликације анаболичког стероида перипуберталним и адултним мужјацима 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;

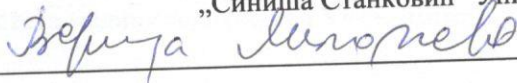


2. Проф. др Сузана Пантовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, члан;



3. НС Верица Милошевић, научни саветника Института за биолошка истраживања

„Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан;



У Крагујевцу, 09.05.2017. године