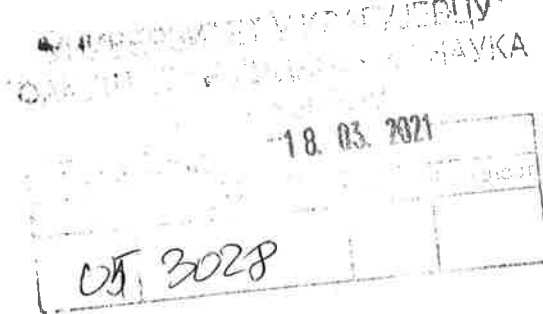


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



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

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу број IV-03-175/25 од 10.03.2021. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Наталије Арсенијевић, под називом:

**„Ефекти примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване наночестицама калцијум фосфата код пацова“**

Чланови комисије су:

1. Доц. др Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. Проф. др Милица Поповић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, члан;
3. Проф. др Гаврило Брајовић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Базичне стоматолошке науке, члан.

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

## 2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

### 2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат Наталија Арсенијевић рођена је 02.11.1984. године у Крагујевцу. Стоматолошки факултет, Универзитета у Београду уписала је школске 2003./2004. године, где је дипломирала 05.07.2011. године са просечном оценом 8.62 (осам шездесет и два). Школске 2011./2012. године уписује Академске докторске студије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Специјалистичке студије из области Болести зуба и ендодонција уписала је 20.1.2015. и друга је година.

Приправички стаж је обавила у Заводу за стоматологију у Крагујевцу и положила стручни испит 2012. године. Од 2020. године је запослена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу као истраживач приправник за област Болести зуба и ендодонција.

### 2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

**Наслов:** Ефекти примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване наночестицама калцијум фосфата код пацова

**Предмет:** Утврђивање бихевиоралних манифестација неуротоксичности, као и промена вредности параметара оксидативног стреса и апоптозе у ткиву мозга пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.*

**Хипотеза:** Примена наночестица калцијум фосфата самостално или са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* изазива промене у понашању, као и промене нивоа параметара оксидативног стреса и апоптозе у можданом ткиву пацова.

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

Кандидат је објавио рад у целини у часопису категорије М51 у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Arsenijevic N, Milenkovic J, Milanovic P, Arnaut A, Jovanovic M, Velickovic S, Scepanovic R, Selakovic D. Does an alteration in nociceptive response to mineral components of dental composites involve changes in oxidative status? A brief report. Ser J Exp Clin Res. 2020. doi: 10.2478/sjecr-2020-0050. M51

#### 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Композити представљају најчешће бирани материјал за надокнаду изгубљеног зубног ткива, међутим широка клиничка примена указла је на могућност стварања секундарног каријеса као најчешћег разлога пропадања композитних испуна. Настанак секундарног каријеса се може превенирати обезбеђивањем услова за реминерализацију зубних ткива која непосредно окружују испун, због чега се данас развијају композитни материјали који отпуштају наночестице калцијум фосфата, а које су широко примењене у превентивним, рестауративним и регенеративним третманима у различитим областима медицине. Иако су се калцијум фосфати дуго сматрали биокомпатибилним материјалима, у досадашњим истраживањима је показно да њихова примена изазива промене у функцији различитих органа, као и да су ове промене повезане са проремећајем оксидативног баланса и апоптозом. Такође, према подацима из литературе антиоксидативна суплементација природним продуктима може умањити штетне ефекте дејства хроничног уноса нано-калцијум фосфата. Природни продукт са потврђеним антиоксидативним дејством је и екстракт биљке *Filipendula ulmaria*, вишегодишње биљке распрострањене у Европи и Азији, који испољава и низ других фармаколошких дејства.

Иако постоје подаци о механизму дејства и дистрибуцији након системске апликације, чини се да су токсични ефекти нано-калцијум фосфата недовољно разјашњени. Поред сазнања да ове честице пролазе крвно-мождану баријеру, њихово дејство на централни нервни систем је непознато.

#### 2.5. Значај и циљ истраживања

##### Значај студије:

Резултати ове студије могу бити од значаја у превенцији различитих врста токсичности, укључујући и неуротоксичност, које су повезане са применом нано-калцијум фосфата у стоматолошкој пракси.

### Циљеви студије:

Циљ овог рада је да се испита потенцијални неуропротективни ефекат екстракта биљке *Filipendula ulmaria* на потенцијалну неуротоксичност изазвану наночестицама калцијум фосфата.

У складу са основним циљем дефинисани су и специфични задаци истраживања:

1. Утврђивање бихевиоралних манифестација након примене наночестица три различита једињења калцијум фосфата (хидроксиапатита, трикалцијум фосфат хидрата и аморфног калцијум фосфата) код пацова;
2. Утврђивање бихевиоралних манифестација након симултане примене наночестица три различита једињења калцијум фосфата (хидроксиапатита, трикалцијум фосфат хидрата и аморфног калцијум фосфата) и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. код пацова;
3. Утврђивање промена вредности параметара оксидативног стреса и апоптозе у ткиву мозга пацова третираних наночестицама калцијум фосфата без или са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

### 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Иако су калцијум фосфати дуго сматрани биокомпатибилним материјалима, у истраживању на пацовима, интраперитонеална примене нано-хидроксиапатита је узроковала апоптозу ћелија јетре и бубрега, док подаци из истраживања на култури глија ћелија указују да је нано-хидроксиапатит инхибирао раст ћелија уз индукцију апоптозе праћену повећаном продукцијом ROS и смањењем нивоа активности SOD. Резултати *in vitro* студије на туморским ћелијама јетре открили су да је нано- $\beta$ -трикалцијум фосфат проузроковао цитотоксичност повезану са примењеном дозом и временом изложености, док је транспорт наночестица ендоцитозом био праћен унутарћелијским повећањем нивоа јона калцијума и фосфата, као и повећаном продукцијом ROS, а апоптоза је била посредована и спољашњим и унутрашњим апоптостским путевима. Такође, наночестице аморфног калцијум фосфата су изазвале

апоптозу ћелија леукемије селективно делујући на G1 фазу ћелијског циклуса, док је цитотоксични ефекат био пропорционалан времену изложености.

С друге стране, према подацима из литературе, антиоксидативна суплементација природним продуктима (куркумином, хитосаном и екстрактом цикорије) може умањити штетне ефекте дејства хроничног уноса калцијум фосфата. Међу природним продуктима са потврђеним антиоксидативним дејством налази се и екстракт биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* вишегодишње биљке распрострањене у Европи и Азији. Екстракт биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* испољава и друга фармаколошка дејства као што су антиинфламаторно, антипролиферативно и антимикубно.

Међутим, и поред података о механизму дејства и дистрибуцији након системске апликације, као и потврде да ове честице пролазе крвно-мождану баријеру, чини се да су токсични ефекти нано-калцијум фосфата недовољно разјашњени, а њихово дејство на централни нервни систем је непознато.

## **2.7. Метод истраживања**

### **2.7.1. Врста студије**

Експериментална студија на животињама *in vivo* и на материјалу анималног порекла *in vitro*.

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

Планирано истраживање би обухватило 42 пацова мушког пола Wistar albino соја (старости 10-12 недеља, просечне телесне масе 180-200 g) са Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња, Војномедицинска академија Београд. Животиње ће боравити (3 животиње по кавезу) у контролисаним условима околине (температура -  $23 \pm 1$  °C, циклус светло/мрак - 12/12h) уз неограничен приступ храни и води током 30 дана 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 (6 животиња по групи):

1. контролна група – без третмана;

2. НА група – администрација наночестица хидроксиапатита у концентрацији од 17.8 mg/kg телесне масе;
3. ТСП група – администрација наночестица трикалцијум фосфат хидрата у концентрацији од 11 mg/kg телесне масе;
4. АСП група – администрација наночестица аморфног калцијум фосфата у концентрацији од 9.65 mg/kg телесне масе;
5. НА+FU група – администрација наночестица хидроксиапатита у концентрацији од 17.8 mg/kg телесне масе и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* у концентрацији од 100 mg/kg телесне масе;
6. ТСП+FU група – администрација наночестица трикалцијум фосфат хидрата у концентрацији од 11 mg/kg телесне масе и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* у концентрацији од 100 mg/kg телесне масе;
7. АСП+FU група – администрација наночестица аморфног калцијум фосфата у концентрацији од 9.65 mg/kg телесне масе и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* у концентрацији од 100 mg/kg телесне масе.

Калцијум фосфати и екстракт биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. би били примењени орално, растворени у води за пиће, свакодневно током 30 дана, при чему би се пратио дневни унос воде и омогућио дневни унос испитиваних супстанци у претходно наведеним концентрацијама.

#### **2.7.4. Варијабле које се мере у студији**

##### **2.7.4.1. Бихевиорални тестови**

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

###### **2.7.4.1.1. Тест отвореног поља (параметри):**

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

2.7.4.1.2. 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. проценат времена кретања током трајања теста
5. број нагињања
6. број усправљања
7. број епизода укупне експлоративне активности

2.7.4.1.3. Тест качења за реп (параметри):

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

2.7.4.1.4. Тест препознавања новог објекта (параметри):

1. време проведено у зони новог објекта (s)
2. број улазака у зону новог објекта
3. време током кога је глава усмерена у смеру новог објекта (s)

2.7.4.1.5. Тест вруће плоче (параметри):

1. време до реакције (s)

2.7.4.1.6. Тест подизања репа (параметри):

1. време до реакције (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.

**Узорковање биолошког материјала**

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 гилотини. Узорци мозданог ткива ће бити узимани у циљу одређивања промена оксидативног статуса и апоптозе изазваних наведеним третманима.

#### **2.7.4.2. 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)

#### **2.7.4.3. Параметри за процену апоптотске активности („real-time PCR“ метод):**

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

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.

#### **2.7.5. Снага студије**

У недостатку података у литератури који описују неуротоксичност нано-калцијум фосфата, пројекција узорка је изведена на основу претходно публикованих резултата истраживања која показују да нано-калцијум фосфати доводе до повећања оксидативног оштећења ћелија, при чему је познато да повећање оксидативног стреса у мозданом ткиву доводи до повећања анксиозности, што је квантификовано смањењем брзине кретања у тесту отвореног поља. Средња вредност величине овог параметра у контролној групи је била  $9 \pm 0.5$  cm/s, док је у експерименталној групи (са протоколом који је довео до повећања оксидативног стреса у мозгу) била знатно мања  $4.5 \pm 0.3$  cm/s. На основу тога, претпоставка је да ће у овој студији употреба нано-калцијум фосфата смањити величину (смањити брзину) овог параметра у експерименталним групама најмање за поменуто 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 6 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 42 експерименталне животиње.

### 2.7.6. Статистичка обрада података

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. *p* вредност мања од 0.05 сматраће се статистички значајном. Целокупна статистичка анализа биће одрађена у статистичком пакету SPSS, верзија 18.0 (*IBM SPSS Statistics 18*).

### 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекивани резултати ће омогућити дефинисање бихевиоралних ефеката хроничне администрације нано-калцијум фосфата, као и утицај овог третмана удруженог са третманом екстрактом биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* код пацова. Такође, очекује се и утврђивање промена нивоа оксидативног стреса и апоптозе током примене нано-калцијум фосфата, са или без симултане администрације екстракта биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* Очекује се и да промене у понашању пацова индуковане третманом нано-калцијум фосфатима, самостално или заједно са третманом екстрактом биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.*, буду удружене са променама оксидативног стреса и апоптозе у možданом ткиву пацова.

### 2.9. Оквирни садржај дисертације

Композити представљају најчешће биране стоматолошке материјале за надокнаду изгубљеног зубног ткива. У превенцији стварања секундарног каријеса, све чешће се користе биоактивни композити са способношћу отпуштања наночестица

калцијум фосфата, за које је познато да изазивају оксидативни дисбаланс, апоптозу и поремећај функција органа. Познато је да природни продукти богати антиоксидансима умањују штетне ефекте калцијум фосфата. Међу природним продукtima са потврђеним антиоксидативним дејством је и екстракт биљке *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. за који се очекује да може смањити потенцијалну неуротоксичност изазвану нано-калцијум фосфатима. Истараживање ће бити спроведено на пацовима третираним *per os* нано-калцијум фосфатима (хидроксиапатитом, трикалцијум фосфат хидратом и аморфним калцијум фосфатом), без или са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria*, током 30 дана. Промене у понашању ће се утврдити применом одговарајућих бихевиоралних тестова, док ће се у ткиву мозга одређивати маркери оксидативног статуса и апоптозе.

### 3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се проф. др Гвозден Росић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија. Предложени ментор 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

Проф. др Гвозден Росић

1. Stankovic JSK, Selakovic D, Mihailovic V, Rosic G. Antioxidant Supplementation in the Treatment of Neurotoxicity Induced by Platinum-Based Chemotherapeutics-A Review. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7753. **M21**
2. Srejovic I, Selakovic D, Jovicic N, Jakovljević V, Lukic ML, Rosic G. Galectin-3: Roles in Neurodevelopment, Neuroinflammation, and Behavior. *Biomolecules.* 2020;10(5):798. **M22**
3. Kumburovic I, Selakovic D, Juric T, Jovicic N, Mihailovic V, Stankovic JK, Sreckovic N, Kumburovic D, Jakovljevic V, Rosic G. Antioxidant Effects of *Satureja hortensis* L. Attenuate the Anxiogenic Effect of Cisplatin in Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:8307196. **M21**
4. 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. **M21**

5. Katanić J, Pferschy-Wenzig EM, Mihailović V, Boroja T, Pan SP, Nikles S, Kretschmer N, Rosić G, Selaković D, Joksimović J, Bauer R. Phytochemical analysis and anti-inflammatory effects of *Filipendula vulgaris* Moench extracts. *Food Chem Toxicol.* 2018;122:151-162. **M21**

#### **4. Научна област дисертације**

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

#### **5. Научна област чланова комисије**

1. Доц. др Драгица Селаковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. Проф. др Милица Поповић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, члан;
3. Проф. др Гаврило Брајовић, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Базичне стоматолошке науке, члан.

## Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашњег научно-истраживачког рада др Наталије Арсенијевић, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Наталије Арсенијевић под називом „Ефекти примене екстракта биљке *Filipendula ulmaria (L.) Maxim.* на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване наночестицама калцијум фосфата код пацова” и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

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



---

**Проф. др Милица Поповић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, члан



---

**Проф. др Гаврило Брајовић**, ванредни професор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Базичне стоматолошке науке, члан



---

У Крагујевцу, 12. март 2021. године