

05. 03. 2020

05 2474/3-3

**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-03-93/30 од 19. 02. 2020. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Радета Вуковића под називом:

„Значај антиоксидантне суплементације N-ацетилцистеином у третману манифестација неуротоксичности изазване дисплатином код пацова“

Чланови комисије су:

1. **проф. др Гвозден Росић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **проф. др Тихомир Илић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, 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 Раде Вуковић је рођен 05. јула 1977. године у Прибоју, Република Србија. Основну школу и гимназију је завршио у Прибоју. Медицински факултет у Београду уписао је школске 1996/1997 године, а звање доктора медицине стекао је 2004. године. Након завршених студија обавио је обавезан приправнички стаж и положио стручни испит 2005. године у Београду. Запошљава се у Војномедицинском центру у Београду као лекар опште праксе. Специјализацију из области Анестезиологије је уписао 2009. године на Војномедицинској академији у Београду и успешно завршио у року, са одличном оценом. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао је школске 2017/2018. године – изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Положио је све испите предвиђене планом и програмом студија. Усмени докторски испит положио је у јулу 2019. године.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Значај антиоксидантне суплементације N-ацетилцистеином у третману манифестација неуротоксичности изазване цисплатином код пацова“

Предмет: Испитивање утицаја антиоксидантне суплементације N-ацетилцистеином на промене у понашању које настају након једнократне администрације цисплатине, уз анализу биомаркера оксидативног стреса у ткиву хипокампуса пацова.

Хипотеза: Антиоксидантна суплементација N-ацетилцистеином 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:

Vukovic R, Kumburovic I, Jovicic N, Velickovic S, Arnaut A, and Selakovic D. Antioxidant supplementation with N-acetylcysteine protects against cisplatin-induced motor impairment in rats. Ser J Exp Clin Res. 2019; doi: 10.2478/sjocr-2019-0076. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Цисплатина, cis-diamminedichloroplatinum (II), је добро познати цитостатик који се користи у терапији различитих врста малигнитета, попут саркома, карцинома меких ткива, мишића и костију. Иако су цитотоксичке карактеристике цисплатине познате више од пола века и са успехом се примењују у лечењу малигнух болести неколико деценија, терапија цисплатином за последицу има и бројне пратеће ефекте који доводе до повећане продукције проинфламаторних цитокина, митохондријалне дисфункције, апоптозе и оксидативног стреса. Нежељени ефекти терапије цисплатином се манифестују кроз хепатотоксичност, нефротоксичност, ототоксичност, дисфункције дигестивног тракта, кардиотоксичност и неуротоксичност. Клинички знаци неуротоксичности изазване цисплатином се уочавају у форми когнитивних поремећаја, дезоријентације, као и визуелних и аудитивних поремећаја. Везивањем за митохондријалну ДНК, цисплатина доводи до прекида репликације и транскрипције што за последицу има повећање оксидативног стреса.

N-ацетилцистеин (NAC), аминокиселина која садржи сумпор, представља снажан антиоксиданс. Показано је да је NAC неопходан као извор цистеина потребног за синтезу глутатиона (GSH), кој представља значајан неензимски унутарћелијски антиоксиданс. Имајући то у виду, примена NAC представља потенцијални терапијски приступ у третману различитих облика неуротоксичности који често ограничавају ефикасност терапије цисплатине. Поред стандардно широког индикацијског поља за примену NAC, које најчешће укључује муколитичке ефекте и терапију код предозирања ацетаминофеноном, значајне терапијске ефекте NAC је показао у третману неуролошких и психијатријских обољења.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања

По први пут би се испитивала могућност примене антиоксидантне суплементације NAC-ом код пацова третираних цисплатином, у смислу утицаја на бихевиоралне манифестације неуротоксичности која представља једно од типичних нежељених дејстава терапије цисплатином. Евентуално смањивање оксидативног оштећења 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 NAC-ом на бихевиоралне манифестације неуротоксичности цисплатине, појединачни циљеви овог истраживања би били:

1. Утврђивање бихевиоралних промена изазваних применом цисплатине код пацова;
2. Утврђивање бихевиоралних промена изазваних применом N-ацетилцистеина код пацова;
3. Утврђивање бихевиоралних промена изазваних симултаном применом цисплатине и N-ацетилцистеина код пацова;
4. Утврђивање промена вредности параметара оксидативног стреса у ткиву мозга код пацова третираних цисплатином и/или N-ацетилцистеином;
5. Утврђивање повезаности промене параметара оксидативног стреса у ткиву хипокампуса и бихевиоралних промена након примене цисплатине и N-ацетилцистеина.

Хипотезе истраживања

1. Примена цисплатине код пацова утиче на промене у понашању;
2. Примена N-ацетилцистеина утиче на промене у понашању код пацова;
3. Симултана примена цисплатине и N-ацетилцистеина утиче на промене у понашању код пацова;
4. Примена цисплатине и N-ацетилцистеина изазивају промене параметара оксидативног стреса у ткиву хипокампуса пацова;
5. Промене параметара оксидативног стреса у ткиву хипокампуса су повезане са бихевиоралним променама које настају након примене цисплатине и N-ацетилцистеина.

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 ирверзибилних) 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. Постоје бројни подаци који говоре о корисним ефектима антиоксидантне суплементације N-ацетилцистеином у превенцији/смањењу оксидативног оштећења различите етиологије. Како један од основних механизма токсичности цисплатине укључује и повећање оксидативног стреса, што је потврђено у бројним органским системима испитиваним на анималним моделима, нова истраживања у вези са терапијском применом N-ацетилцистеина, која би обухватила и испитивања утицаја на неуротоксичност изазвану цисплатином, представљају потенцијалну могућност за примену ове врсте адјувантне терапије у третману нежељених ефеката цисплатине у централном нервном систему.

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 било спроведено на 32 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). Смештај животиња ће се реализовати (4 животиње по кавезу) у контролисаним условима околине (температура - 23 ± 1 °C, циклус светло/мрак - 12/12h) уз неограничен приступ храни и води током 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), принципима етичности и ARRIVE упутству.

2.7.3. Узорковање

Истраживање ће бити спроведено на животињама подељеним у 4 (четири) експерименталне групе (8 у групи):

1. контролна група - интраперитонеална администрација физиолошког раствора у запремини од 1 ml, првог и петог дана протокола;

2. цисплатина (CIS) група - интраперитонеална администрација физиолошког раствора у запремини од 1 ml првог дана и цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе) петог дана протокола;

3. N-ацетилцистеин (NAC) група - интраперитонеална администрација N-ацетилцистеина (NAC) (500 mg/kg телесне масе) првог и петог дана протокола;

4. Цисплатина и N-ацетилцистеин (CIS+NAC) група - интраперитонеална администрација N-ацетилцистеина (500 mg/kg телесне масе) првог и петог дана протокола, и цисплатине (7.5 mg/kg телесне масе) петог дана протокола.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Бихевиорални тестови

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

A. Тест отвореног поља, у трајању од 5 минута (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

B. Тест уздигнутог крстастог лавиринта, у трајању од 5 минута (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

Бихевиорални тестови ће бити снимани 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 гиљотини. Узорци хипокампуса ће бити узимани у циљу одређивања промена оксидативног статуса 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)

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 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 (11). 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 поменуту 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 (12) 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 (13), 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 четири (4) групе, укупан узорак је утврђен на 32 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

Резултати овог истраживања ће утврдити бихевиоралне ефекте примене цисплатине, као и утицај суплементације N-ацетилцистеином код пацова. Истовремено, очекује се и промена оксидативног статуса у хипокампусу током примене цисплатине, са или без симултане администрације N-ацетилцистеина. Очекује се и да промене у понашању пацова индуковане третманом цисплатином и/или N-ацетилцистеином буду удружене са променама оксидативног стреса у хипокампусу пацова. Потенцијални протективни ефекат суплементације N-ацетилцистеином би омогућио већи простор за терапијску примену цисплатине.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Бројни нежељени ефекти изазвани терапијом цисплатином су обично праћени оксидативним оштећењем и апоптозом ћелија у различитим ткивима. Неуротоксичне манифестације примене цисплатине појављују се заједно са повећањем оксидативног стреса у одређеним регионима мозга. N-ацетилцистеин је добро познат лек са потврђеним антиоксидантним својствима. Очекује се да симултана примена NAC и цисплатине умањи бихевиоралне манифестације неуротоксичности цисплатине. Истраживање ће обухватити 32 мужјака Wistar albino пацова у четири једнаке групе (контрола, цисплатина - CIS, NAC и CIS+NAC). Првог дана, контролна и CIS група ће интраперитонеално примити физиолошки раствор, NAC и CIS+NAC групе бити интраперитонеално третиране са NAC (500 mg/kg). Петог дана, контролна група примаће интраперитонеално физиолошки раствор, CIS и CIS+NAC групе примити цисплатину (7.5 mg/kg), а NAC и CIS+NAC групе примиће NAC (500 mg/kg). Десетог дана ће бити спроведено бихевиорално тестирање. У ткиву хипокампуса ће се одређивати маркери оксидативног статуса.

3. Предлог ментора

Комисија предлаже за ментора ове дисертације **др Драгицу Селаковић**, доцента 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 доц. др Драгице Селаковић 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 Гвозден Росић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **Проф. др Тихомир Илић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан.

Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове, Комисија закључује да кандидат др Раде Вуковић 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 N-ацетилцистеином на бихевиоралне манифестације неуротоксичности изазване цисплатином. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна.

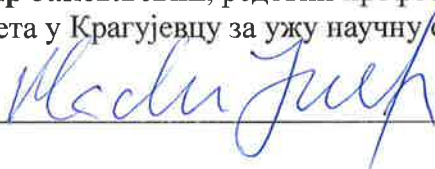
Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др Радета Вуковића: „**Значај антиоксидантне суплементације N-ацетилцистеином у третману манифестација неуротоксичности изазване цисплатином код пацова**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

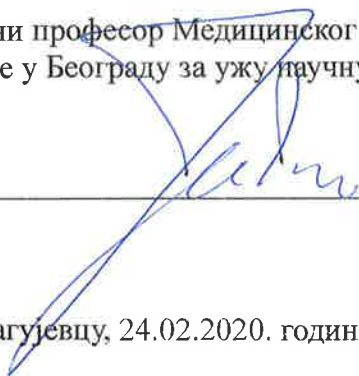
Проф. др Гвозден Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник



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



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



У Крагујевцу, 24.02.2020. године