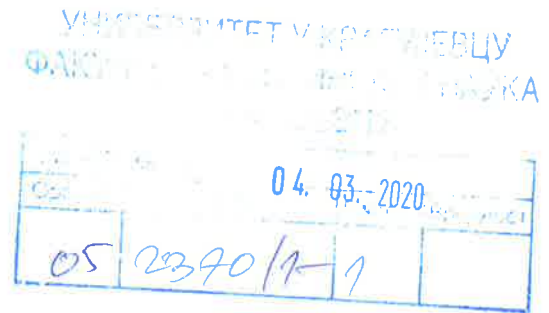


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-93/32, од 19.02.2020. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Јована Рудића**, под називом:

„Испитивање утицаја стандардизованог екстракта ароније на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника“

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

1. **Проф. др Марина Томовић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, председник
2. **Проф. др Александра Димитријевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан
3. **НС Верица Милошевић**, научни саветник 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 **Јован Рудић**, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за пријаву теме докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Јован Рудић је рођен 6. новембра 1969. године у Бијелом Пољу, где је завршио основну и средњу школу. Медицински факултет завршио је у Београду. Специјализацију из гинекологије и акушерства завршио је у Београду, ВМА, ГАК Народни фронт као и ужу специјализацију.

Студент је Докторских академских студија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином уписао је 2014/15. године. Усмени докторски испит положио је са оценом 10 (десет).

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „Испитивање утицаја стандардизованог екстракта ароније на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника“

Предмет: Одређивање морфолошких карактеристика јајника, хормонског и оксидационог статуса код пацова са синдромом полицистичних јајника након примене стандардизованог екстракта ароније

Хипотезе:

1. Постоје промене у морфолошким карактеристикама јајника, хормонском и оксидационом статусу код пацова са синдромом полицистичних јајника.
2. Примена метформина утиче на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.

3. Примена стандардизованог екстракта ароније утиче на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.
4. Симултана примена метформина и стандардизованог екстракта ароније утиче на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, је објавио 1 рад у целини у часопису категорије M51, у коме је први аутор, чиме је стекао услов за пријаву теме докторске дисертације:

Rudic J, Raicevic S, Babic G. Preeclampsia - prediction and monitoring factors. Ser J Exp Clin Res. 2017; doi: 10.2478/SJECR-2018-0026 M51

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Синдром полицистичних јајника (PCOS) представља хетерогени ендокринолошки поремећај који се јавља код жена у репродуктивном периоду. Подаци из литературе указују да је код жена у репродуктивној доби преваленца PCOS 15-25%, након имплементације Ротердамских критеријума који подразумевају присуство 2 од 3 ентитета: хиперандрогенизам, овулаторну дисфункцију и ултрасонографски потврђено присуство цисти на јајнику. Иако је PCOS најчешћи узрок неплодности код жена, етиопатогенетски механизми још увек нису довољно расветљени. Основни ендокринолошки поремећај је повећана секреција или активност андрогена, док је инсулинска резистенција присутна код великог броја пацијената. Дисфункција хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине доводи до ановулације, поремећаја функције негативне повратне спреге естрогена и прогестерона, повећања секреције лутеинизирајућег хормона и смањења секреције фоликуло-стимулирајућег хормона. PCOS захвата бројне органске системе, што доводи до различитих компликација, укључујући менструалну дисфункцију, неплодност, хирзутизам, акне, гојазност, метаболички синдром.

Коришћење анималних модела PCOS има значајан утицај на расветљавање етиопатогенетских механизма који леже у основи овог поремећаја, као и испитивање потенцијалних терапеутских приступа у третману PCOS. Један од добро установљених

модела је апликација андрогена у препуберталном периоду, током 5 недеља третмана. Међутим, новије студије показују да се код постпуберталних животиња, добијају резултати који указују на већу сличност овог синдрома на анималном моделу са хуманом популацијом.

Повећан оксидациони стрес и инфламација ниског степена представљају неке од претпостављених патогенетских механизма у развоју синдрома полицистичних јајника.

Метформин је широко заступљен у третману PCOS. Механизам дејства метформина подразумева активацију аденозин монофосфатом активираних киназа (АМПК), уједно спречавајући оксидативно оштећење ћелије инхибицијом продукције реактивних кисеоничних врста од стране митохондрија.

Различити антиоксиданси могу имати користи у третману PCOS. Све више се користе алтернативни приступи у терапији PCOS (третман биљним препаратима).

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај ове студије се огледа у доприношењу расветљавања патогенетских механизма PCOS као и потенцијалном терапијском ефекту стандардизованог екстракта ароније самостално или у комбинацији са метформином. Циљеви студије би били:

1. Испитати морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.
2. Испитати утицај примене метформина на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.
3. Испитати утицај примене стандардизованог екстракта ароније на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.
4. Испитати утицај симултане примене метформина и стандардизованог екстракта ароније на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Подаци из литературе указују да је код жена у репродуктивној доби преваленца PCOS 15-25%, након имплементације Ротердамских критеријума. Студије показују постојање генетске

компоненте у патогенези овог синдрома, која је потенцирана утицајем различитих фактора из околине. Коришћење анималних модела (најчешће су коришћени глодари) PCOS има значајан утицај на расветљавање етиопатогенетских механизма који леже у основи овог поремећаја, као и испитивање потенцијалних терапеутских приступа у третману PCOS. Повећан оксидациони стрес и инфламација ниског степена представљају неке од претпостављених патогенетских механизма у развоју синдрома полицистичних јајника. *Aronia Melanocarpa* је биљка из фамилије *Rosaceae* представља један од најбогатијих извора полифенола међу воћем, са високим садржајем антоцијанина и флавоноида идентификованим као одговорним једињењима за терапеутски потенцијал. Подаци из литературе указују на антиоксидациони потенцијал ароније. Постоје подаци да антоцијанини могу да активирају АМПК, што може бити интересантно због сличности са ефектима метформина који је широко заступљен у третману PCOS. Механизам дејства метформина подразумева активацију аденозин монофосфатом активираних киназа (АМПК), уједно спречавајући оксидативно оштећење ћелије инхибицијом продукције реактивних кисеоничних врста од стране митохондрија.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

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

2.7.2. Популација која се истражује

Експерименти ће се спровести у складу са одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за употребу животиња у експериментима. Истраживање ће се спровести на 36 пацова (по 6 у свакој групи), женског пола, Wistar albino соја (старости 6 недеља, просечне телесне масе 150-170 g – постпуберталне животиње). Животиње ће боравити (3 животиње по кавезу) у контролисаним условима околине (температура - 23 ± 1 °C, циклус светло/мрак - 12/12h) уз неограничен приступ храни и води током трајања протокола.

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/ЕЕС) и принципима етичности.

Животиње ће бити сврстане у 2 велике групе (контрола – 6 животиња и PCOS – 30 животиња). По шест животиња из обе групе ће бити жртвоване ради потврде успешно индукованог PCOS. Након индукције PCOS, животиње из те групе биће подељене у 4 подгрупе: PCOS + физиолошки раствор ($n=6$); PCOS + метформин ($n=6$); PCOS + СЕА ($n=6$); PCOS + метформин + СЕА ($n=6$).

2.7.3. Узорковање

Индукција PCOS код пацова

Женке које имају уредан еструсни циклус ће бити подељене у 2 групе. Прва група (контролна група, $n=6$) ће примати сусамово уље (растварач, у истој запремини као и PCOS група), супкутано, током 5 недеља. Друга група (PCOS група, $n=30$) ће бити подвргнута супкутаној апликацији дихидроепиандростерона (DHEA: sc-202,573; Santa Cruz Biotechnology), раствореног у 0.2 ml сусамовог уља, у дози 6 mg/100g телесне масе, сваког дана током 5 недеља третмана. Након периода индукције, ради потврде PCOS, животиње из контролне групе, као и 6 животиња из PCOS групе биће жртвоване декапитацијом на гиљотини након анестезије (50 mg/kg кетаминa и 100 mg/kg ксилазина). Биохемијске и хистолошке анализе ће бити спроведене у циљу потврде индукције PCOS код пацова (очекује се хиперандрогенемија, појава цисти на јајнику, одсуство жутих тела). Цитолошки преглед вагиналног бриса биће вршен током последњих 12 дана третмана, у циљу идентификације фазе еструсног циклуса (очекује се перзистентан метаеструс/диеструс). Животиње из контролне групе ће бити жртвоване у метаеструс/диеструс фази циклуса, ради елиминације утицаја фазе циклуса на параметре од интереса.

Након потврде индукције PCOS, пацови из PCOS групе ће бити сврстани у 4 групе (6 животиња по групи) и третирани на следећи начин: физиолошки раствор, метформин (500 mg/kg дневно), стандардизовани екстракт ароније - СЕА (0.45 ml/kg) и метформин+ СЕА (у наведеним дозама). Наведени третмаани биће спроведени гаважом, сваког дана,

током 28 дана третмана. Дозе DHEA, метформина и стандардизованог екстракта ароније су изабране на основу података из литературе.

Током трајања протокола, вршиће се цитолошка анализа вагиналног бриса. Након 28 дана од индукције PCOS, животиње ће бити жртвоване декапитацијом на гилотини након анестезије (50 mg/kg кетамина и 100 mg/kg ксилазина) а узорци крви и ткива биће узети за даљу анализу.

2.7.4. Варијабле

Антропометријски параметри

Једном недељно, као и непосредно пре жртвовања биће мерена телесна маса животиња.

Биохемијски параметари

Из серума се одређују вредности триглицерида, укупног холестерола, LDL и HDL холестерола стандардним методама. Нивои тестостерона, естрадиола, прогестерона, LH, FSH, Анти-Милеровог хормона (AMH) и инсулина се анализирају из узорака серума ELISA методом уз коришћење комерцијалних реагенаса. Из плазме и лизата еритроцита ће се одређивати вредности параметара антиоксидационог система заштите, као и про-оксиданаса: индекс липидне пероксидације мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анион радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2), каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH).

Из хомогената ткива јајника биће одређивани и нивои ензима антиоксидативне заштите и вредности AMH.

Хистолошка анализа органа

Леви јајник и утерус биће изоловани и припремљени за анализу. Морфометријска анализа јајника биће спроведена у циљу квантификације примарних, секундарних, терцијарних, атретичних и цистичних фоликула, као броја жутих тела уз коришћење светлосног микроскопа. Имунохистохемијска анализа ће бити спроведена након обележавања AMPK у ткиву јајника, у циљу евалуације потенцијалног механизма дејства примењених супстанци.

Ултразвучна анализа јајника

На почетку, као и једном недељно током трајања протокола, животиње ће бити подвргнуте ултразвучној анализи јајника. Ултразвучна анализа ће бити вршена након примене адекватне анестезије (50 mg/kg кетамина и 100 mg/kg ксилазина). Врши ће се мерење оба јајника у три димензије, као и рачунање волумена. Анализу ће увек вршити исти истраживач.

Орални тест оптерећења глукозом (ОГТТ)

Дан пре жртвовања, након ноћног гладовања, животињама ће бити урађен ОГТТ. Након одређивања вредности гликемије наше, животињама ће гаважом бити администрирано 2g/kg глукозе, а узорци крви за гликемију биће узимани након 30, 60, 120 и 180 минута. Гликемија ће бити одређивана помоћу апарата Accu-Chek Performa, уз коришћење адекватних трачица, након пункције репне вене.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун величине узрока је извршен на основу резултата претходно објављене студије у којој је праћен утицај ресерватрола на морфолошке карактеристике јајника, оваријалну резерву и хормонски статус код пацова. За прорачун је коришћен Т-тест за везани узорак, двоструко, уз предпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма. Узимањем у обзир резултата наведене студије, укупан студијски узорак је прорачунат на 36 (6 животиња по групи).

2.7.6. Статистичка обрада података

Подаци добијени истраживањем ће бити обрађени методама дескриптивне и аналитичке статистике и приказани табеларно и графички. Статистичка обрада ће обухватити употребу SPSS софтвера, 21.0 (*SPSS 21.0 for Windows*). За испитивање нормалности расподеле користиће се тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapir Wilk*, и графици и *normal QQ plot*. Статистичка значајност ће се одређивати Студент-овим Т тестом и ANOVA тестом за узорке који имају нормалну расподелу и *Mann-Whitney* и *Kruskal-Wallis*

тестом за узорке који немају нормалну расподелу. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да употреба стандардизованог екстракта ароније самостално или у комбинацији са метформином доведе до побољшања морфолошких карактеристика јајника, хормонског и оксидативног статуса код животиња којима је индукован PCOS. Значај ове студије се огледа у доприношењу расветљавања патогенетских механизма PCOS као и потенцијалном терапијском ефекту стандардизованог екстракта ароније самостално или у комбинацији са метформином.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Синдром полицистичних јајника (PCOS) представља хетерогени ендокринолошки поремећај који је јавља код жена у репродуктивном периоду. Преваленца PCOS је 15-25%, према европским дијагностичким критеријумима. Ротердамски критеријуми за дијагнозу PCOS подразумевају присуство 2 од 3 следећа ентитета: хиперандрогенизам, овулаторну дисфункцију и ултрасонографски потврђено присуство цисти на јајнику. Повећан оксидациони стрес и инфламација ниског степена представљају неке од претпостављених патогенетских механизма у развоју синдрома полицистичних јајника. Жене са PCOS имају поремећен оксидациони статус, који корелира са параметрима као што су централна гојазност, године старости, артеријски крвни притисак, гликемија, инсулинемија, ниво триглицерида и инсулинска резистенција. Златни стандард у терапији PCOS је метформин. Различити антиоксиданси, такође, могу имати користи у третману PCOS, међутим и поред бројних терапијских поступака не постижу задовољавајући резултати. Аронија (*Aronia Melanocarpa*) је биљка из фамилије *Rosaceae*. У Европи се често користи у исхрани, као састојак сокова, вина, чајева, џемова и сличних намирница. Аронија представља један од најбогатијих извора полифенола међу воћем, са високим садржајем антоцијанина и флавоноида идентификованим као одговорним једињењима за терапеутски потенцијал. Ова биљка поседује доказани гастропротективни, хепатопротективни антипролиферативни и антиинфламаторни и антиоксиданти потенцијал. Постоје подаци

да антоцијанини могу да активирају АМРК, што може бити интересантно због сличности са ефектима метформина. Циљ ове студије је испитивање утицаја примене стандардизованог екстракта ароније самостално, као и у комбинацији са метформином на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус, као и метаболичке промене код пацова са синдромом полицистичних јајника.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се доц. др Јована Јоксимовић Јовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*

Доц. др Јована Јоксимовић Јовић 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 доц. др Јоване Јоксимовић Јовић 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.
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.
3. 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;122:151-62.
4. Boroja T, Katanić J, Rosić G, Selaković D, **Joksimović J**, Mišić D, Stanković V, Jovičić N, Mihailović V. Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: Phytochemical profile

and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity. Food Chem Toxicol. 2018;118:252-63.

5. 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.
6. **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.
7. **Joksimović J**, Selaković D, Jakovljević V, Mihailović V, Katanić J, Boroja T, Rosić G. Alterations of the oxidative status in rat hippocampus and antidepressant effect of chronic testosterone enanthate administration. Mol Cell Biochem. 2017;433(1-2):41-50.

4. Научна област дисертације

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

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Марина Томовић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, председник
2. **Проф. др Александра Димитријевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан
3. **НС Верица Милошевић**, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

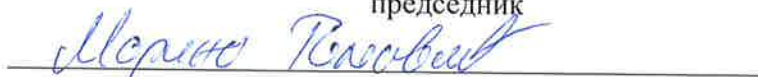
На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Јован Рудић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Јована Рудића, под називом: „Испитивање утицаја стандардизованог екстракта ароније на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

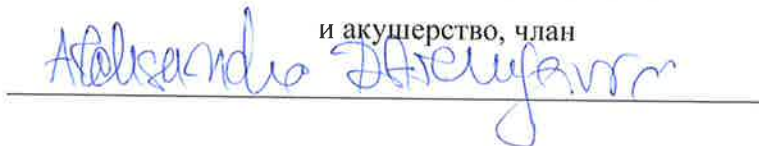
Проф. др Марина Томовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија,

председник



Проф. др Александра Димитријевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија

и акушерство, члан



НС Верица Милошевић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан



У Крагујевцу, 24.02.2020. године