

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИМЛ. БРОЈ:		11. 10. 2021.	
Орг. јед.			Бредност
05	10776		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу број IV-03-683/40 од 17.09.2021. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Радомира Шћепаковића, под називом:

„Утицај антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на манифестације системске токсичности наночестица калцијумфосфата 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. **Доц. др Мирослав Васовић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Орална хирургија, члан;
3. **Доц. др Марија Бубало**, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална медицина, 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 Радомир Шћепановић рођен је 02.04.1984. године у Београду. Стоматолошки факултет, Универзитета у Београду уписао је школске 2003./2004. године, где је дипломирао 2012. године. Специјалистичке Академске студије II степена: Стоматолошки факултет Београд, модул имплантологија, уписао је 2015. године. 2016. године уписује Академске докторске студије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Здравствену специјализацију из Оралне хирургије на Стоматолошки факултет у Београду је завршио 2021. године. Од 2014. је запослен на Војномедицинској академији.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: Утицај антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на манифестације системске токсичности наночестица калцијумфосфата код пацова

Предмет: Утврђивање морфофункционалних индикатора системске токсичности, као и промена вредности параметара оксидативног стреса и апоптозе у ткиву јетре, бубрега и тестиса пацова третираних наночестицама калцијум фосфата, самостално или са екстрактом биљке *Filipendula ulmaria*.

Хипотеза: Примена наночестица калцијум фосфата изазива промене вредности индикатора системске токсичности, док симултана антиоксидантна суплементација екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* умањује степен токсичности.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису категорије M51 у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

Šćepanović R, Stevanović M. An Overview of Bone Replacement Materials – Biological Mechanisms and Translational Research. Ser J Exp Clin Res.2021.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Калцијумфосфати представљају једињења од посебног значаја у многим научним областима са растућом потребом за њиховом употребом у медицини. За разлику од синтетских полимера који се користе у биомедицинске сврхе, калцијумфосфати су природно присутни у људском организму и широко прихваћени као материјали избора за регенерацију минерализованих ткива са примарном применом у стоматологији. Бројна клиничка истраживања базирана су на испитивању различитих форми ове групе једињења (хидроксиапатит, монокалцијум фосфат, дикалцијум фосфат, трикалцијум фосфат, тетракалцијум фосфат и аморфни калцијум фосфат. Међутим, недавни напредак у развоју биоматеријала усмерава клиничке индикације за примену калцијумфосфата ка облику наночестица, како би се повећао њихов потенцијал реминерализације ткива.

Истовремено са све већом применом нано-калцијумфосфата расте и забринутост за штетне ефекте које изазивају. Наиме, потврђено је да примену наночестица калцијумфосфата прате различите системске морфофункционалне промене. И у *in vitro* и *in vivo* истраживањима, њихова примена резултирала је повећаним оксидативним стресом, апоптозом и оштећењем ДНК, праћене неуротоксичношћу, нефротоксичношћу, хепатотоксичношћу и гонадотоксичношћу. Будући да је у основи патофизиолошког механизма токсичности нано-калцијумфосфата оксидативно оштећење са последичном апоптозом, не изненађује све већи број истраживања која испитују ефикасност природних антиоксиданата у смањењу њихових штетних ефеката. Истовремено, постоји све већи интерес за коришћење различитих природних производа, са потврђеним антиоксидативним потенцијалом, у медицинске сврхе.

Filipendula ulmaria је лековита биљка која се широко истражује због својих антиоксидативних, антимикуробних, противупалних и антипролиферативних својстава, који се приписују високом садржају фенолних једињења. Такође, недавно истраживање потврдило је њено благотворно дејство у неуротоксичности изазваној системском применом наночестица калцијумфосфата.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије:

Резултати ове студије могу бити од значаја у превенцији системске токсичности, која је у вези са применом нано-калцијум фосфата у стоматолошкој пракси.

Циљеви студије:

Циљ овог истраживања је утврђивање вредности биохемијских и хормонских индикатора функције јетре, бубрега и тестиса у серуму, вредности маркера оксидативног статуса и апоптозе, као и хистолошке промене ткива наведених органа након примене наночестица калцијумфосфата (хидроксиапатит, трикалцијум фосфат хидрат и аморфни калцијум фосфат), као и након симултане примене наночестица калцијумфосфата и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* код пацова.

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

1. Утврђивање вредности биохемијских и хормонских индикатора функције јетре, бубрега и тестиса у серуму, вредности маркера оксидативног статуса и апоптозе, као и хистолошке промене ткива наведених органа након примене наночестица калцијумфосфата (хидроксиапатит, трикалцијум фосфат хидрат и аморфни калцијум фосфат) код пацова;
2. Утврђивање вредности биохемијских и хормонских индикатора функције јетре, бубрега и тестиса у серуму, вредности маркера оксидативног статуса и апоптозе, као и хистолошке промене ткива наведених органа након симултане примене наночестица калцијумфосфата (хидроксиапатит, трикалцијум фосфат хидрат и аморфни калцијум фосфат) и екстракта биљке *Filipendula ulmaria* код пацова.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Калцијум фосфати се сматрају биокомпатибилним материјалима. Истраживања спроведена на анималним експерименталним моделима су показала да је интраперитонеална примена нано-хидроксиапатита доводила до апоптозе ћелија јетре и бубрега. Истовремено, подаци добијени у студији на култури глија ћелија су потврдила да нано-хидроксиапатит инхибира раст ћелија, уз индукцију апоптозе и повећану продукцијом слободних кисеоничких радикала, као и смањење антиоксидантне заштите. *In vitro* студије на туморски измењеним хепатоцитима је показала да примена нано- β -трикалцијум фосфат изазива цитотоксичност у зависности од примењене дозе и

времена експозиције, при чему је транспорт наночестица био праћен унутарћелијским оксидативним и јонским дисбалансом. Показано је да и наночестице аморфног калцијум фосфата доводе до апоптозе ћелија леукемије, док је цитотоксични ефекат био пропорционалан времену изложености. Коначно, скорашња студија је показала да хронична примена различитих калцијум фосфата у облику наночестица доводи до неуротоксичности са карактеристичним бихевиоралним манифестацијама.

Антиоксидантна суплементација природним продуктима може ублажити штетне ефекте наночестица калцијум фосфата. Екстракт биљке *Filipendula ulmaria*, поред антиоксидантних својстава показује и друге ефекте, попут антиинфламаторног, антипролиферативног и антимикробног.

2.7. Метод истраживања

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија 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 180-200g) са Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња, Војно-Медицинска академија Београд. 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 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 у групи):

1. контролна група – без третмана;
2. НА група – администрација наночестица хидроксиапатита у концентрацији од 17.8 mg/kg телесне масе;
3. ТСР група – администрација наночестица трикалцијум фосфат хидрата у концентрацији од 11 mg/kg телесне масе;

4. АСР 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 *Filipendule ulmarie* 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 *Filipendule ulmarie* у концентрацији од 100 mg/kg телесне масе;
7. АСР+FU група – администрација наночестица аморфног калцијум фосфата у концентрацији од 9.65 mg/kg телесне масе и екстракта *Filipendule ulmarie* у концентрацији од 100 mg/kg телесне масе.

Калцијум фосфати и екстракт *Filipendule ulmarie (L.) Maxim.* би били примењени орално, растворени у води, 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

24 сата по окончању третмана, животиње ће након анестезије (интраперитонеално примењена комбинација кетаминa – 10 mg/kg телесне масе и ксилазина – 5 mg/kg телесне масе) бити жртвоване декапитацијом на гиљотини. Прикупљени узорци крви користиће се за одређивање вредности биохемијских параметара и анализу концентрације полних хормона, док ће се узорци ткива јетре, бубрега и тестиса користити у циљу одређивања параметара оксидативног статуса и апоптозе, као и хистолошких промена изазваних наведеним третманима.

I. Одређивање биохемијских параметара у серуму

1. креатинин ($\mu\text{mol/L}$)
2. уреа (mmol/L)
3. калцијум (mmol/L)
4. триглицериди (mmol/L)
5. укупни холестерол (mmol/L)
6. HDL холестерол (mmol/L)

7. LDL холестерол (mmol/L)
8. лактат дехидрогеназа (LDH) (U/L)
9. алкална фосфатаза (ALP) (U/L)
10. аланин аминотрансфераза (ALT) (IU/L)
11. аспартат аминотрансфераза (AST) (IU/L)

II. Одређивање параметара хормонског статуса у серуму

1. Тестостерон (ng/mL)
2. Лутеинизирајући хормон (LH) (mIU/mL)

III. Параметри за (спектрофотометријску) квантификацију оксидативног статуса у 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)

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

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

V. Хистолошка анализа ткива

Утврђивање морфолошких карактеристика ткива испитиваних органа.

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 системску токсичност нано-калцијум фосфата, пројекција узорка је изведена на основу претходно публикованих резултата истраживања која показују да нано-калцијум фосфати (нано-НА) доводе до

повећања оксидативног оштећења ћелија, при чему је познато да повећање оксидативног стреса у мозданом ткиву доводи до функционалних и морфолошких промена. 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

Очекује се да ће резултати студије расветлити утицај хроничног, системског дејства наночестица калцијумфосфата као и њихов утицај при удруженом дејству са антиоксидативном суплементацијом екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* код пацова.

Очекивани резултати студије ће омогућити утврђивање промена морфофункционалних карактеристика испитиваних органа након примене наночестица калцијумфосфата, са или без симултане администрације екстракта биљке *Filipendula ulmaria*. Очекује се и да промене вредности биохемијских параметара и концентрације полних хормона пацова индуковане третманом нано-калцијум фосфатима, самостално или заједно са третманом екстрактом биљке *Filipendula ulmaria*, буду удружене са променама оксидативног стреса и апоптозе у ткивима јетре, бубрега и тестиса пацова.

Резултати ове студије могу дати смернице за даља истраживања потенцијалне медицинске примене материјала за надокнаду ткива која треба да укључе и систематску процену нуспојава. Такође, очекује се да би антиоксидативна суплементација

природним антиоксидантима могла бити начин за превенирање системске токсичности у широкој и све чешћој примени нано-калцијумфосфата у свим гранама стоматологије.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Како је у клиничким студијама немогуће испитивати ефекте калцијумфосфата на здравој популацији, анимални експериментални модели омогућавају једини прави увид у механизме токсичности, као и у потенцијалне превентивне третмане. Ово је експериментална студија на пацовима. Животиње ће бити третиране различитим врстама калцијумфосфата (хидроксиапатит – HA, 17.8 mg/kg, дневно; трикалцијум фосфат хидрат – TCP, 11 mg/kg, дневно; аморфни калцијумфосфат – ACP, 9.65 mg/kg, дневно) и екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* (FU, 100 mg/kg, дневно), растворених у води за пиће током 30 дана. Промене морфофункционалних индикатора функције јетре, бубрега и тестиса ће се утврдити применом одговарајуће методологије.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације предлаже се доц. др Драгица Селаковић, доцент 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

доц. др Драгица Селаковић

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, Jakovljevic 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. Проф. др Гвозден Росић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. Доц. др Мирослав Васовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Орална хирургија, члан;
3. Доц. др Марија Бубало, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална медицина, члан.

Закључак и предлог комисије

На основу увида у резултате досадашњег научно-истраживачког рада др Радомира Шћепановића, 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 Радомира Шћепановића под називом „Утицај антиоксидантне суплементације екстрактом биљке *Filipendula ulmaria* на манифестације системске токсичности наночестица калцијумфосфата 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



Доц. др Мирослав Васовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у
Крагујевцу за ужу научну област Орална хирургија, члан



Доц. др Марија Бубало, доцент Медицинског факултета Војномедицинске академије
Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална медицина, члан



У Крагујевцу, 22.09.2021. године