

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-7479/3-7 од 10.10.2012. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **др мед. Јелене Подгорац** под називом:

Утицај примене валпроичне киселине током приплода и гестације на анималном моделу миша - ефекат на психомоторни развој код потомака

На основу одлуке Наставно-научног већа, формирана је Комисија у саставу:

1. Проф. др Драган Миловановић, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
2. Проф. др Владимир Јаковљевић, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија, и
3. Др сци. Слободан Секулић, члан, научни саветник Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду, за ужу научну област Неуробиологија.

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **др мед. Јелена Подгорац**, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Биографија кандидата

Др Јелена Подгорац је рођена у Београду 13.05.1979. године где је завршила основну школу и Шесту београдску гимназију. Године 1998. уписала је Медицински факултет Универзитета у Београду и на истом завршила студије 2007. године. Исте године на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу уписала је докторске студије из области Неуронаука. Почетком 2008. године започела је као стручни сарадник ангажовање на пројекту Министарства науке П143021: „Ефекти трауматских, неуротоксичних и неуропротективних фактора на електричну активност мозга сисара. Анализа и моделирање“ у Лабораторији за електрофизиологију, Одељења за Неурофизиологију, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“. Од фебруара 2010. године запослена је као истраживач сарадник. Године 2011. ангажована је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије П175006: „Неуролошки развој код пренаталне изложености плода антиепилептичној терапији“.

У оквиру Европске сарадње у области научног и техничког истраживања Јелена Подгорац се активно укључила у два пројекта из домена биомедицине: COST Action BM0601 (NeuroMath) и BM0605 (On Consciousness). Похађала је међународну летњу школу о различитим приступима изучавања свести, Корзика 2009. Године 2010. била је учесник летње школе „Brain computer interface“ у Патрасу. Одржала је два предавања “Animal models of depression” и “Toxic effect of antiepileptic drugs on cerebellum“ 2010. и 2011. године у оквиру „Brain Awareness Week“. Године 2012. у оквиру „Stress and Behavior Conference” St. Petersburg одржала је предавање „The effect of valproic acid on neurodevelopment of mice during pregnancy”.

Подаци о објављеним радовима

Кандидат Јелена Подгорац је објавила рад у целини као први аутор, у часопису са рецензијом, више радова у часописима међународног значаја као коаутор и више радова објављених као сажети:

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја (категорија M20):

1. Sekulic S, **Podgorac J**, Goran Kekovic, Žarkov M, Kopitovic A. Significance of adequate postural control in the appearance of habitual upright bipedal locomotion. Medical Hypotheses 2012; doi:10.1016/j.mehy.2012.07.019 **M23-3 бода**
2. Sekulic S, Bozic A, Zarkov M, Kekovic G, **Podgorac J**, Novakov-Mikic A, Martac L, Barna T, Milovanovic A, Pusic I, Stojanovic D, Pepelcevic N. Changes in the anterior presentation in sheep fetuses due to their ventro-sacral position in the second half of gestation. Philippine Journal of Veterinary Medicine 2012; 49: 51-56. **M23-3 бода**
3. Martać Lj, **Podgorac J**, Sekulić S. Evaluation of the neurotoxic effect of aluminium on the wistar rat. Archives of Biological Sciences 2010; 62: 585-588. **M23-3 бода**
4. Martac Lj, Grbic G, Kekovic G, **Podgorac J**, Culic M, Sekulic D, Lalosevic D, Capro I. (2010): Spectral changes of brain activity in offspring of rats exposed to aluminium during gestation and lactation. Arch Biol Sci **62**: 9-13. **M23-3 бода**
5. Kekovic G, Stojadinovic G, Martac Lj, **Podgorac J**, Sekulic S, Culic M. (2010): Spectral and fractal measures of cerebellar and cerebral activity in various types of anaesthesia. Acta Neurobiol Exp **70**: 1-9. **M23-3 бода**
6. Ćulić M, Keković K, Grbić G, Martać M, Soković M, **Podgorac J**, Sekulić S. (2009): Wavelet and fractal analysis of rat brain activity in seizures evoked by camphor essential oil and 1,8-cineole. Gen Physiol Bioph, Special Issue **28**: 33-40. **M23-3 бода**

Научни рад објављен у целини у часописима националног значаја (категорија M50):

1. **Podgorac J**, Ćapro I, Sekulić S, Pepelčević N, Martać Lj, Keković G. Funkcija serotoninских рецептора I и њихов утицај на понашање. MD-Medical Data 2012 4(2): 167-170 **M53-1 бод**
2. Keković G, Sekulić S, **Podgorac J**, Mihaljev-Martinov J, Gebauer-Bukurov K. The slow and infraslow oscillations of cortical neural network. Neurology, Psychiatry and Brain Research 2012; 18 (4): 175-180. **M52-1.5 бода**

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: Утицај примене валпроичне киселине током приплода и гестације на анималном моделу миша - ефекат на психомоторни развој код потомака

Предмет истраживања је испитивање показатеља неуролошког развоја на анималном моделу глодара (мишева) код пренаталне изложености антиепилептичној монотерапији, односно валпроичној киселини у субтерапијској дози. Истраживање пружа увид у ефекат моноантилептичне терапије на сазревање нервног система и њене последице на понашање. На овај начин би се проширила базична сазнања сагледавањем штетног деловања антиепилептичне терапије на плод човека, који би имао за циљ да фокус терапијских процедура прошири на популацију деце која се рађају без телесних малформација, али која би имала измењено понашање односно, поремећај расположења типа депресије/анксиозности.

Хипотезе

1. Примена валпроичне киселине током гестације има дозно-зависни ефекат код потомака
2. Примена валпроичне киселине у субтерапијској дози током гестације изазива промене у функционисању нервног система код потомства
3. Примена валпроичне киселине током гестације изазива промене у понашању типа анксиозност/депресија код потомака
4. Примена валпроичне киселине током гестације изазива поремећај моторног и сензорног система код потомства.

2.3. Подобност кандидата

Кандидат Јелена Подгорац положила је усмени докторски испит. У току студија објавила је седам радова у научним часописима међународног значаја и један рад у националном часопису у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Лекови који се узимају током трудноће из мајчиног прећи у фетални крвоток и код потомства изазивају неуробихејвиоралне поремећаје приликом изложености и субтоксичним дозама. Експозиција валпроичној киселини током трудноће изазива оштећења која се могу сврстати у три велике групе: велике телесне аномалије (дефект неуралне тубе, конгенитални срчани дефект, расцеп усне и непца, аномалије уринарног тракта, оштећење удова), кранио-фацијални дизморфизам, когнитивни дефект и поремећај понашања. Еurocat⁴- база података новорођенчади рођених са конгениталним аномалијама, обухватила је осам кохортних студија, које су укључиле 1565 трудница, које су током прва три месеца добијале валпроат као монотерапију. Исход у 118 случајева био је заступљеност великих конгениталних аномалија, односно 7,95% телесних оштећења је регистровано код потомака, док је у контролној групи била испод 3%. Оштећење централног нервног система плода, чије мајке су као монотерапију пиле валпроат је у директној релацији са механизмом дејства валпроата током гестације. Наиме, валпроат поред тога што делује путем Na^+ и Ca^{++} канала, своје дејство остварује повећањем трансмисије гама-амино-бутерне киселине (ГАБА), која током гестације има ексцитаторну улогу и делује као епигенски фактор, односно контролише ћелијску пролиферацију, миграцију и сазревање дендрита. Током развоја нервног система, ГАБА своју функцију не остварује путем синаптичке трансмисије, већ паракриним дејством, дифузно, несинаптички и има улогу трофичког фактора. Управо оваква функција и

механизам дејства сматра се да доводи поремећаја у формирању ламинарне кортикалне структуре.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Сврха истраживања је постнатално испитивање моторног и сензорног развоја и понашање глодара, чије мајке би биле третиране валпроичном киселином током гестације. Циљеви студије су:

1. дозно-зависни ефекат валпроичне киселине на потомство, која би се примењивала током целе гестације
2. ефекат субтерапијских доза валпроичне киселине, током целокупног периода гестације, које не изазивају телесне аномалије, већ имају утицај на понашање, као и на рани моторни развој.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Истраживањем литературе, стиче се увид да су се у оквиру базичних истраживања вршила испитивања утицаја валпроата, на анималном моделу глодара (пацов/миш), током гестације у одређеном временском интервалу (7-18, односно 12-17 гестацијског дана) дозе од 150мг/кг, 200мг/кг, 400мг/кг које су биле администриране субкутано или „per os“ путем сонде или 600мг/кг као појединачна доза 12.5 гестацијског дана. Тестови којим су јединке испитиване постнатално, чије мајке су биле третиране валпроичном киселином, били су: „тест отвореног поља“, „Порсолтово принудно пливање“, „startle acoustic reaction“, „hole-board test“, Y лавиринт тест.

2.7. Методе истраживања

Експерименталне животиње

У огледу ће бити коришћене женке и мужјаци здравих белих лабораторијских мишева соја NMRI, одабрани методом случајног избора из окота на Војномедицинској академији у Београду. Током експеримента животиње ће боравити у стандардним лабораторијским условима на Заводу за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију, Медицинског факултета у Новом Саду. Собна температура ће бити (20 – 25 степени Целзијусових), влажност ваздуха $55\% \pm 1.5\%$, са циклусом светлост-тама по 12 сати и животињама ће бити омогућен слободан приступ храни и води.

Испитивања би се вршила свакодневним третманом четири групе женки субкутаном администрацијом раствора валпроичне киселине од момента спаривања са мужјаком (период приплода), током целе гестације до окота. Испитивање дозно-зависног ефекта биће засновано на једнаком размаку између доза. Постојале би 4 групе женки NMRI соја које би биле третиране раствором валпроичне киселине од 50мг/кг, 100мг/кг, 200мг/кг и од 400мг/кг. У свакој групи било би 6 женки. Пета група представљала би контролну групу (6 женки NMRI соја) које ће бити третиране субкутано физиолошким раствором. У једном анималном кавезу биле би здружене две мишице са једним мужјаком. Потомство би било испитивано постнатално V, X и XV дана „рефлекс окретања из супинације у пронацију“ тестом и „тестом качења репа“. „Рефлекс окретања из супинације у пронацију“ тест омогућава испитивање рефлекса постуре и представља способност окретања јединке из положаја супинације у положај пронације. Јединка се на равној подлози поставља трупом у дорзални положај и мери се време које је потребно јединки да са сва 4 екстремитета додирне подлогу, такође се

сагледава тип окрета. Тестом качења репа јединка се поставља у позицију у којој виси 20цм изнад подлоге, тачка фиксације је 0,5 цм од врха репа јединке.

Извођење теста омогућава увид у покрете главе, трупа и екстремитета и време за које јединка постане потпуно непокретна. Време испитивања јединки је ограничено на 3 мин. Испитивање се спроводи V, X и XV дана услед карактеристика моторног понашања, које се тада јављају и могу бити регистроване. Наиме, петог дана јединка почиње да одиже главу и њушка у хоризонталној равни, почиње да пузи са испруженим задњим екстремитетима. Десетог дана јединка је способна да заузме квадрипедалну позу и вентралну (трбушну) регију од подлоге. У том периоду, примећује се нагла функционална матурација задњих екстремитета. Од четрнаестог дана јављају се вертикални покрети (уздицање), јединка почиње да седи на задњим екстремитетима, док предње користи за манипулацију. Од петнаестог дана, заступљено је комплексно моторно понашање (10). „Hot plate test“ би се спровео у периоду адолесценције миша, XXV дана постнатално и био би поновљен XXXII дана. Понављани „hot plate test“ као феномен условног учења, спровео би се по методи Ле Бара и сарадника (11). „Подигнути крстасти лавиринт“ тестом јединке би биле испитиване XXXV постнаталног дана. „Подигнути крстасти лавиринт“ би се спровео по протоколу Валфа и сарадника (12). XL дана јединке би биле испитиване „тестом отвореног поља“ по методи Саенце и сарадника (13).

Варијабле које се мере у студији

Тестом „Рефлексног окретања из супинације у пронацију“ испитивао би се развој моторног дела нервног система. Регистровала би се три типа: „U“ окрет, „Вадичеп“ окрет, „Адултни“ окрет. Исход тестирања био би успешан, односно неуспешан и мерила би се латенца у току које би се извршио окрет.

„Тестом качења репа“ мерило би се време које је потребно да јединка постане комплетно непокретна.

„Hot plate“ тестом испитивала би се латенца од момента стављања јединке на подлогу загрејану на 50°C до трзања задњег екстремитета. Време тестирања је ограничено на 40 сек.

„Подигнути крстасти лавиринт“ тестом мерили би се следећи параметри: фреквенца у отвореним крацима - број улазака миша са све 4 шапе у отворене краке, фреквенца у затвореним крацима - број улазака миша са све 4 шапе у затворене краке, време централне платформе- време које миш проведе са све 4 шапе на централној платформи, време у отвореним крацима- време које миш проведе са све 4 шапе у отвореним крацима и време у затвореним крацима- време које миш проведе са све 4 шапе у затвореним крацима

Понашање које се односи на процену ризика ће се пратити на основу следећег: број уздицања предњим шапама у затвореним крацима и централној платформи, понашање типа истезања- број у отвореним и затвореним крацима, нагињање миша са стране отвореног крака на доле- из затвореног или отвореног крака и централне платформе.

Тестом отвореног поља мерило би се 9 параметара: укупна дистанца пређена током тестирања, укупна дистанца пређена у централној и периферној зони, укупан број уздицања, проценат времена проведеног у централној зони, проценат пређене дистанце у централној и периферној зони, време које јединка проведе мирујући у централној и периферној зони, просечна брзина којом се јединка кретала у арени, број улазака у централну зону, време првог уласка у централну зону

Снага студије и величина узорка

На основу литературе „Методе у анализи понашања у неуронаукама“ и коришћењем рачунарског програма „G power“ (верзија 3.1.3) величина група је одређена F тестирањем на основу следећих почетних параметара: снага студије од 80% ($\beta=0.8$) и вероватноће грешке првог типа $\alpha=0.05$ процењена је величина узорка за 5 испитиваних група, где је довољан број од 40 јединки по групи.

Врста студије

Експериментална студија на животињама *in vivo*.

Статистичка обрада

Добијени подаци би статистички били обрађени у SPSS програму (верзија 15). Резултати били би представљени табеларно и графиконима, а значајност ће се тестирати параметарским тестовима (независним- и упареним- t тестом и факторском анализом варијансе) и непараметарским (Man-Whitney и Kruskal Wallis тестом). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p<0,05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Користећи батерију тестова за испитивање понашања, развоја моторике и супраспиналне ноцицепције биће испитан утицај валпроичне киселине током гестације и последице третмана на развој нервног система глодара. Очекује се да резултати покажу кашњење у моторном развоју, оштећење сензорног система и промене у понашању јединки чије мајке би биле третиране током приплода и гестације валпроичном киселином у субтерапијским дозама које не би изазвале телесне малформације. Значај предложеног истраживања је у сагледавању суптилних испада у понашању јединки, који најчешће не буду уочени у клиничкој пракси. Корелација би се односила на хумано потомство којем нису регистроване телесне аномалије по рођењу.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Користећи доступну батерију тестова за понашање биће испитана моторике, сензорни систем и поремећаји расположења потомака чије мајке су биле третиране субтерапијским дозама валпроичне киселине током гестације.

2.10. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **Др Слободана Секулића**, научног сарадника Медицинског факултета, Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Неурологија. Др Слободан Секулић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и планираном методологијом, као и искуство и остварене резултате у развоју научно-наставног подмлатка.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Неуронауке

2.12. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Драган Миловановић, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
2. Проф. др Владимир Јаковљевић, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Физиологија, и
3. Др сци. Слободан Секулић, члан, научни саветник Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду, за ужу научну област Неуробиологија.

Закључак и предлог Комисије

1. На основу досадашњег научно истраживачког рада и публикованих радова Комисија је закључила да кандидат др мед. Јелена Подгорац испуњава све услове прописане Статутом Факултета и законом о Универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације;

2. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна;

3. Комисија сматра да ће докторска дисертација кандидата др мед. Јелене Подгорац утврдити значај субтерапијских доза валпроичне киселине током гестације које не изазивају телесне малформације код експерименталних животиња већ имају улогу у патогенези поремећаја понашања њихових потомака;

4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Јелене Подгорац, под називом **„Утицај примене валпроичне киселине током приплода и гестације на анималном моделу миша - ефекат на психомоторни развој код потомака“** и одобри њену израду.

1. Проф. др Драган Миловановић, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,

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

3. Др сци. Слободан Секулић, члан, научни саветник Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду, за ужу научну област Неуробиологија.
