

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА ВМА
УНИВЕРЗИТЕТА ОДБРАНЕ

Одлуком бр. 1-344 од 17.07.2020. године са 79. седнице Наставно-научног већа Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду одржане 29.06.2020. године именована је комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом:

"Утицај репетитивне транскранијалне магнетне стимулације на експресију неуротрофичног фактора можданог порекла, транспортере за глутамат и оксидативно стање у селективно осетљивим можданим структурама пацова"

кандидата др мед. **Бојане Манчић**, запослене на Одељењу патологије Опште болнице у Панчеву.

Ментор: ВС проф. др сц. мед. Милица Нинковић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду.

Комисија за оцену завршене докторске дисертације именована је у саставу:

1. Пуковник проф. др сц. мед. Тихомир В. Илић, редовни професор, Универзитет одбране у Београду, Медицински факултет Војномедицинске академије, председник
2. ВС др Ивана Стевановић, научни саветник, Универзитет одбране у Београду, Медицински факултет Војномедицинске академије, члан
3. Проф. др сц. мед. Ивана Стојановић, редовни професор, Универзитет у Нишу, Медицински факултет, члан

На основу анализе приложене докторске дисертације, комисија за оцену завршеног докторског рада једногласно подноси Наставно-научном већу Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација др мед. Бојане Манчић написана је на 129 страна и подељена на следећа поглавља: увод (30 страна), хипотезе и циљеви истраживања (3 стране), материјал и методе (10 страна), резултати (27 страна), дискусија (31 страна), закључак (2 стране) и литература (20 страна). Увод је илустрован са 3 слике, резултати су приказани на 12 слика и 2 табеле, док се у дискусији налази 6 слика. У дисертацији су цитирани подаци из 262 референце. Рад по структури има све елементе докторске дисертације и садржи сажетак на српском и енглеском језику, податке о комисији и садржај.

У предложеном докторском раду истраживање је пратило неуропротективне и неуромодулаторне промене које покреће транскранијална магнетна стимулација и које су, упркос бројним истраживањима и даље неразјашњене.

У поглављу увод др Манчић приказује сазнања из области репетитивне транскранијалне магнетне стимулације (рТМС), као облика неинвазивне мождане стимулације чијом се применом могу изазвати дуготрајне промене у синаптичкој пластичности моторне коре. Такође, др Манчић обезбеђује податке о променама синаптичке трансмисије у односу на примену различитих протокола рТМС, а које су потврђене индиректно бројним хуманим студијама. У циљу расветљавања процеса који се налазе у основи ових промена, методологија истраживања је проширена на анималне моделе, који упркос значајних ограничења, омогућавају праћење промена у мозгу које је из етичких разлога немогуће пратити на људима.

Показано је да примена регуларних низова транскранијалних магнетних стимулуса индукује синаптичку пластичност мождане коре и то тако да нискофреквентни низови стимулуса смањују, док високофреквентни низови повећавају кортикалну екситабилност. Неуронске мреже које осцилују тета или гама осцилацијама могу боље да интерферирају са тета типом „прасковите“ стимулације. У том смислу, коришћен је облик ТМС, структурисан као високофреквентан „прасак“ стимулуса са тета фреквенцом (енг. *theta burst stimulation*; ТБС) интермитентног обрасца (иТБС) који подстиче екситацијску неуротрансмисију, односно континуираног облика ТБС (кТБС) који изазива супресију екситацијске неуротрансмисије.

Како је више студија на здравим добровољцима показало да се са старењем смањује капацитет моторне кортикалне пластичности у одговору на различите рТМС протоколе, кандидаткиња је сагледала значај структурних и биохемијских промена којима мождано ткиво одговара на деловање ТБС по различитим протоколима, како би се потенцијално фармаколошким процедурама могли подржати позитивни ефекти примењене стимулације.

У процесима синаптичке пластичности значај глутамата као доминантног екситацијског неуротрансмитера потврђен је у бројним истраживањима. Услед масовне активности неурона која се дешава при деловању ТМС, настају промене у количини ослобођеног глутамата, што је праћено динамичним биохемијским интеракцијама између неурона и астроцита. У овим процесима веома битну улогу имају транспортери за глутамат (везикуларни транспортер *vGluT1*, као и мембрански транспортери *GLAST* и *GLT-1*).

У експресији ових транспортера значајну улогу има и неуротрофични фактор можданог порекла (*BDNF*), који утиче на процесе модулације синтезе протеина у дендритима неурона на локалном нивоу, у зависности од нивоа активности дате синапсе. Значајан утицај интеракција *BDNF* и компоненти антиоксидативне заштите (нпр. митохондријске супероксид дисмутазе) на степен когнитивних функција потврђен је на животињама.

Полазећи од сазнања да су истраживања о функционалним субцелуларним променама у односу на различите протоколе ТБС малобројна или недостају, др Манчић предмет својих истраживања базира на функционалној активности *BDNF* и транспортерима за глутамат, као и њиховој повезаности са променама оксидативног стања у селективно осетљивим можданим структурама.

На основу наведених познатих података из литературе, др Манчић је поставила следеће **хипотезе**:

1. Једнократни и виšekратни иТБС/кТБС протоколи изазивају промену експресије мембранских и везикуларних транспортера за глутамат у моторној кори, стријатуму, хипокампусу и малом мозгу младих и адултних пацова.
2. Једнократна и виšekратна примена иТБС/кТБС доводи до промене експресије *BDNF* у свим испитиваним селективно осетљивим структурама мозга младих и адултних пацова.
3. Једнократни и виšekратни иТБС/кТБС протоколи не мењају значајно оксидативни статус ткивних компоненти у моторној кори, стријатуму, хипокампусу и малом мозгу младих и адултних животиња.

Из хипотеза су јасно дефинисани **циљев** истраживања:

1. Утврдити утицај једнократне и виšekратне примене ТМС по иТБС/кТБС протоколима на промене у експресији везикуларног (*vGluT-1*) и мембранских (*GLAST* и *GLT-1*) транспортера за глутамат у ткиву моторне коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга младих и адултних пацова.
2. Утврдити разлике у експресији везикуларног (*vGluT-1*) и мембранских (*GLAST* и *GLT-1*) транспортера за глутамат у ткиву моторне коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга између младих и адултних пацова након једнократне и виšekратне примене ТМС по иТБС/кТБС протоколима.
3. Утврдити утицај једнократне и виšekратне примене ТМС по иТБС/кТБС протоколима на промене у експресији *BDNF* у селективно осетљивим структурама мозга младих и адултних пацова.
4. Утврдити разлике у експресији *BDNF* у ткиву моторне коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга између младих и адултних пацова након једнократне и виšekратне примене ТМС по иТБС/кТБС протоколима.
5. Утврдити утицај једнократне и виšekратне примене ТМС по иТБС/кТБС протоколима на промене биохемијских параметара оксидативног стања (липидне пероксидације, активности антиоксидативних ензима и концентрацију глутатиона) у селективно осетљивим можданим структурама младих и адултних пацова.
6. Утврдити разлике у биохемијским параметрима оксидативног стања (липидне пероксидације, активности антиоксидативних ензима и концентрацију глутатиона) у селективно осетљивим можданим структурама између младих и адултних пацова након једнократне и виšekратне примене ТМС по иТБС/кТБС протоколима.
7. Утврдити повезаност промена биохемијских параметара оксидативног стања и експресије транспортера за глутамат у ткиву моторне коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга младих и адултних пацова након једнократне и виšekратне примене ТМС по иТБС/кТБС протоколима.
8. Утврдити повезаност промена експресије транспортера за глутамат и *BDNF* у селективно осетљивим структурама мозга младих и адултних пацова након једнократне и виšekратне примене ТМС по иТБС/кТБС протоколима.

9. Утврдити повезаност промена биохемијских параметара оксидативног стања и експресије *BDNF* у ткиву моторне коре, стријатума, хипокампуса и малог мозга младих и адултних пацова након једнократне и вишекратне примене ТМС по иТБС/кТБС протоколима.

У поглављу **материјал и методе** кандидаткиња је на јасан, прецизан и детаљан начин представила дизајн експерименталне студије. Истраживање је спроведено као експериментална студија на животињама *in vivo*. Комплетно истраживање је урађено на Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије у Београду.

Током рада са животињама поштовани су Етички принципи рада на лабораторијским животињама Војномедицинске академије у Београду као и Закон о заштити и добробити животиња („Службени гласник РС“, број 41/09), који поштују правила Директиве европског парламента о заштити животиња коришћених за научне сврхе 2010/63/ЕУ од 22.09.2010. године. Експеримент је одобрен од стране Министарства пољопривреде и заштите животне средине, Управе за ветерину, Републике Србије (бр. 323-07-7363/2014-05/1).

Величина узорка у истраживању је израчуната на основу очекиваних вредности параметара оксидативног статуса у експерименталним групама. Групе су између себе биле поређене (у оба смера) према статистичком програму *G*Power3.1*. Студијски узорак који претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (независни *t* тест или *Mann-Whitney* тест) између две измерене варијабле омогућио је снагу студије 80 %.

Све добијене вредности су презентоване као средња вредност \pm стандардна девијација. Након тестирања нормалности расподеле варијабли по групама, за утврђивање статистичке значајности коришћени су анализа варијансе и независни *t* тест за обележја са нормалном расподелом. За тестирање зависности између појединих варијабли коришћен је тест линеарне регресије уз утврђивање и тестирање *Spearman*-овог коефицијента корелације. Статистичка обрада добијених резултата вршена је комерцијалним програмским пакетом *GraphPad Prism*, верзија 5.03. Статистичка значајност одређена је на $p < 0,05$.

У поглављу **резултати**, аутор приказује детаљно обрађене податке и јасно представља све добијене резултате.

Дискусија је написана јасно и прегледно уз упоредни приказ познатих података из литературе и добијених резултата из докторске дисертације.

Закључци сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада.

Литература садржи 262 референце.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

Кандидаткиња у овом поглављу детаљно представља и описује добијене резултате у 6 подгрупа младих и 6 подгрупа адултних животиња.

Добијени резултати показују:

1. Ткивне промене у селективно осетљивим можданим структурама пацова су зависне од структуре и временског обрасца примењеног протокола ТБС као и узраста експерименталних животиња.
 - Вишекратна примена иТБС код младих пацова повећава експресију *vGluT-1* у стријатуму, хипокампусу и церебелуму, док код адулта доводи до смањења експресије у можданој кори.
 - Код младих животиња се са једнократном иТБС апликацијом повећава *GLAST* у хипокампусу и малом мозгу, док са вишекратним иТБС третманом расте *GLAST* у можданој кори а смањује се у хипокампусу.
 - Вишекратна примена иТБС протокола код адулта смањује експресију *GLT-1* у хипокампусу и церебелуму.
 - Код младих животиња једнократни иТБС смањује *BDNF* у хипокампусу, а вишекратни иТБС смањује *BDNF* у можданој кори.
 - Вишекратни иТБС протокол код адулта повећава експресију *GFAP* у хипокампусу и малом мозгу.
 - Једнократна примена кТБС смањује *vGluT-1* у можданој кори адулта, док вишекратни протокол повећава *vGluT-1* у можданој кори младих пацова.
 - Код младих животиња једнократни кТБС смањује *GLAST* у хипокампусу и повећава у церебелуму, док код адулта повећава експресију у хипокампусу и церебелуму.
 - Вишекратни кТБС протокол код младих пацова доводи до повећања експресије *GLAST* у можданој кори и стријатуму.
 - Вишекратни кТБС протокол код адулта смањује експресију *GLT-1* у хипокампусу и церебелуму.
 - Једнократна примена кТБС код младих пацова повећава *BDNF* у церебелуму, док вишекратни кТБС третман смањује експресију у можданој кори и малом мозгу.
2. Примена иТБС/кТБС протокола не покреће стање оксидативног стреса у селективно осетљивим можданим структурама младих и адултних пацова, али повећава оксидативно оштећење протеина у стријатуму адулта.

В) Упоредна анализа докорске дисертације са резултатима из литературе

У поглављу дискусија докторанд садржајно и критички сагледава резултате у складу са постојећим сазнањима добијеним анализом података из литературе из области примене транскранијалне магнетне стимулације на здравим пацовима *Wistar* соја. Начин писања дискусије и примењени аргументи, јасно показују да др Манчић у потпуности влада проблематиком области којом се бави тема докторске дисертације.

Истраживања у склопу ове докторске дисертације су допринела кључним сазнањима о целуларним механизмима деловања једнократних и вишекратних тТБС/кТБС протокола. Такође, резултати предложене студије пружају прецизне податке о динамици и интензитету узрасно специфичних промена у функцији глутамата и неуротрофичног фактора можданог порекла. Процентом оксидативног стања добијен је тачан увид у степен метаболичких промена у селективно осетљивим можданим структурама. Како у литератури нема података на истраживањима примене ТМС на здравим животињама, проширење сазнања о овим механизмима на животињском моделу, уз резултате електрофизиолошких истраживања на здравим добровољцима, оправдава примену рТМС код здравих особа, у сврху побољшања концентрације, пажње и когниције. У том смислу, могуће је и евентуално проширење терапијских могућности за комбиновану примену ТМС са фармаколошким средствима, чиме би се побољшала перспектива лечења различитих поремећаја нервног система.

Г) Објављени радови из ове докторске тезе

Mancic B, Stevanovic I, Ilic T, Djuric A, Stojanovic I, Milanovic S, Ninkovic M. Transcranial theta-burst stimulation alters GLT-1 and vGluT1 expression in rat cerebellar cortex. *Neurochem Int* 2016; 100: 120-127.

M22; IF=3.385

Д) Закључак и предлог

Кандидат др мед. Бојана Манчић испуњава све услове дефинисане Чланом 7. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације и промоцији доктора наука ("Службени војни лист", бр. 20/12; 25/13 и 12/16) што обухвата написану докторску дисертацију и рад прихваћен за објављивање у часопису из категорије М22 (истакнути међународни часопис) са IF=3.385 у оквиру докторске тезе у којој је кандидат први аутор на раду.

Докторска дисертација под називом "**Утицај репетитивне транскранијалне магнетне стимулације на експресију неуротрофичног фактора можданог порекла, транспортере за глутамат и оксидативно стање у селективно осетљивим можданим структурама пацова**" представља оригиналан и актуелан научни рад из области неуронаука. Истраживање је спроведено са свим начелима етичког приступа и научно-истраживачког рада. Теза је написана јасно, систематично, студиозно и целовито.

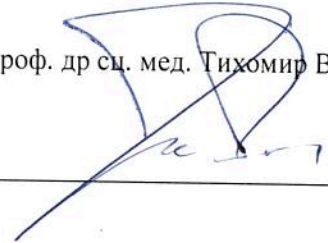
Добијени резултати представљају значајан допринос фундаменталним сазнањима о функционалним субцелуларним променама у односу на различите протоколе ТБС, због чега је посебна пажња посвећена функционалној активности *BDNF* и транспортерима за глутамат, као и њиховој повезаности са променама оксидативног стања у селективно осетљивим структурама мозга.

На основу изнетог, имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, комисија закључује да докторска дисертација др Манчић испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева, и као таква, представља значајан допринос проучавању у датој области. Будући да

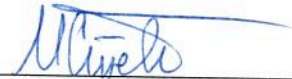
кандидаткиња испуњава све законом предвиђене услове за одбрану докторске дисертације, комисија предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду да овај рад прихвати као завршену докторску дисертацију докторанда др мед. Бојане Манчић и омогући његову јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду, 28.08.2020.

Пуковник проф. др сц. мед. Тихомир В. Илић



ВС научни саветник др Ивана Стевановић



Проф. др сц. мед. Ивана Стојановић



РЕПУБЛИКА СРБИЈА
МИНИСТАРСТВО ОДБРАНЕ
УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ
Медицински факултет ВМА

— Бр. 1-404
31 AUG 2020 год.
БЕОГРАД