

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 11.05.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Весне Пешић о урађеној докторској дисертацији **Жељка З. Павковића**, истраживача сарадника у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду, под насловом **„Ефекти анестезије индуковане пропофолом на синаптичку пластичност, активност допаминског система и понашање јувенилних пацова“**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Весна Пешић, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, др Сања Дацић, доцент, Универзитет у Београду – Биолошки факултет и др Селма Каназир, научни саветник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Жељка З. Павковића** под насловом **„Ефекти анестезије индуковане пропофолом на синаптичку пластичност, активност допаминског система и понашање јувенилних пацова“**, написана је на **156** страна, садржи **3** табеле и **44** слике, као и **332** библиографске јединице. Докторску дисертацију чине: Насловна страна на српском и енглеском језику, Подаци о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Листа скраћеница, Садржај, Текст по поглављима (Увод – **42** стране; Циљ рада – **2** стране; Материјал и методе – **23** стране; Резултати – **34** стране; Дискусија – **32** стране; Закључци – **2** стране; Литература – **21** страна) и Прилози (Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу).

Анализа докторске дисертације:

У **Уводу** своје докторске дисертације, кандидат Жељко З. Павковић је кроз неколико тематских целина дао податке који објашњавају дејство општих анестетика са акцентом на пропофол, један од најшире коришћених анестетика у клиничкој пракси. Образложене су позитивне и негативне стране његове примене уз концизан приказ механизма буђења из пропофолске анестезије, тј. активације допаминских неурона вентралне тегменталне области, на основу чега се и стекао увид у адиктивни потенцијал пропофола, као и његов утицај на меморијски процес. Описан је феномен бихејвиоралне

сензитизације и укрштене сензитизације, као форме понашања која се јавља код експерименталних животиња након излагања супстанцама са адиктивним потенцијалом и повезује се са потребом за коришћењем дрога код људи, као и биохемијски индикатори развоја сензитизације, тј. промена у допаминској сигнализацији (допамином и цикличним аденозин-монофосфатом регулисани фосфопротеин молекуларне масе 32 килодалтона, DARPP32; постсинаптички протеин који делује као појачивач сигнала посредованог допаминским рецептором типа 1), синаптичкој активности (калцијум-калмодулин зависна протеин киназа типа 2, изоформа алфа, CaMKII α ; протеин који се доминантно налази у ексцитаторним синапсама и главни је чинилац постсинаптичке густине) и неуронској активности (FosB/ Δ FosB, чија је експресија у лимбичком систему од посебног значаја за процену адиктивног стања организма). Наведене су основне карактеристике адолесценције, са акцентом на перипубертетски период/касну јувенилну фазу, који постоји код свих сисарских врста и праћена је великим потенцијалом за развој зависничког понашања. Оваквом концепцијом уводног дела Кандидат истиче да су ефекти пропофолске анестезије на нервни систем који се налази у фази интензивне матурације у највећој мери неистражени, упркос добро познатој чињеници да примена фармаколошки активних супстанци које активирају допаминску трансмисију у субкортикалним регионима мозга у периоду перипубертета може да иницира развој зависничког понашања. У уводном делу Кандидат је такође приказао и основне карактеристике меморијског процеса са акцентом на експлицитну меморију, имајући у виду да општа анестезија утиче на експлицитну епизодичку меморију, која се стиче свесно. Објашњен је принцип препознавања новине (простора и објекта); објашњена је улога дорзалног региона хипокампуса у овом процесу као и улога одређених протеина у молекуларној основи меморијског процеса (неуротрофички фактор синтетисан у мозгу (BDNF) и његов рецептор тропомиозин киназа Б (TrkB), екстрацелијским сигналом регулисане киназе 1 и 2 (ERK_{1/2}), CaMKII α , протеински производи гена раног одговора који су од посебног значаја за меморијски процес (Egr-1, FosB/ Δ FosB). Кандидат је у уводном делу такође описао и значај реорганизације цитоскелета у процесу синаптичке пластичности, наводећи најновије податке о улози протеина адучин бета (A β) у контроли синаптичке стабилности и реорганизације, у одговору на срединске/фармаколошке третмане.

У поглављу **Циљеви истраживања** Кандидат полази од чињенице да је адиктивни потенцијал пропофолске анестезије и њен утицај на експлицитну меморију уочен у адултној популацији, као и да је касна јувенилна/перипубертетска фаза развоја период изузетне осетљивости на дејство адиктивних супстанци и интензивне матурације мнемоничког потенцијала, због чега последице примене пропофолске анестезије у периоду перипубертета могу имати одређене специфичности. Општи циљ докторске дисертације подразумевао је да се испита утицај једнократног излагања пропофолској анестезији, што представља типичан начин клиничке примене анестетика, на допаминску сигнализацију, синаптичку и неуронску активност у различитим регионима мозга (медијални префронтални регион коре великог мозга, таламус, стријатум и дорзални хипокампус) и понашање перипубертетских пацова, као модел система периадолесцентног развоја код људи. Сходно циљу рада, образоване су три тематске

целине у оквиру којих је испитиван утицај третмана на 1) молекулске и промене у понашању које су већ описане након примене адиктивних супстанци, 2) сметње у учењу и позивању експлицитне епизодичке меморије и 3) синаптичку стабилност и реорганизацију у можданим регионима од интереса (медијални префронтални регион коре великог мозга, таламус, стријатум, дорзални хипокампус), у периоду након буђења из анестезије.

У поглављу **Материјал и методе** детаљно је изложена организација експеримента, подела експерименталних животиња у групе и протоколи за све примењене технике, као и статистичку обраду добијених резултата. Све експерименталне процедуре су спроведене у сагласности са Директивом 2010/63/ЕУ о заштити животиња које се користе у експерименталне и научне сврхе и одобрене од стране етичког комитета Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду (под бројем 03-05/14).

У експерименту су коришћени мужјаци пацова *Wistar* соја, стари 35 постнаталних дана, што је перипубертетска старост (ова фаза развоја се дефинише као период од 7-10 дана пре пубертета, што се код мужјака пацова *Wistar* соја односи на 41. (± 1) дан старости). За третман је коришћен пропофол произведен за клиничку употребу (1%, Recofol[®], Schering, Finland). Одређивање адекватне дозе анестетика која се користи у експерименту је био део експерименталног протокола, јер у тренутку извођења експеримента није било литературних података у области. Због обимности експеримента вођено је рачуна да се број експерименталних група за различите технике истраживања рационално формира и максимално смањи број коришћених животиња, због чега све експерименталне групе нису присутне у свим техникама истраживања (укупан број коришћених животиња 168).

У сврхе одређивања релативних промена у експресији протеина од интереса *Western blot* методом коришћене су 4 експерименталне групе, тј. контролна и групе третиране пропофолом (75 мг/кг) и жртвоване у различитим временским тачкама након третмана (4, 24 и 48 сати; 5 јединки по групи). Мождани региони од интереса су били медијални префронтални регион коре великог мозга, стријатум, таламус и дорзални хипокампус. С обзиром да је пропофол растворен у емулзији означеној као Интралипид (Fresenius Kabi AB, Sweden), посебан сет животиња је коришћен као додатна контрола за ефекте изазване ињектирањем пропофола (оформљене 3 групе, након ињектирања интралипида јединке су жртвоване 4, 24 и 48 сати након третмана; 4 јединке по групи). Протеини чија је експресија анализирана *Western blot* методом (од којих највећи део у укупној и фосфорилисаној (p) форми су: допамински рецептор типа 1 (D1DR), DARPP-32/pDARPP-32^{Thr34}, CaMKII α /pCaMKII α ^{Thr286}, FosB/ Δ FosB, BDNF, TrkB/pTrkB^{Y816}, ERK_{1/2}/pERK_{1/2}, Egr1, Aducsin β /pAducsin β). Релативне вредности нивоа протеина су добијене семиквантитативном анализом имуноблотова у односу на *Ponceau S* бојење које је служило као контрола наношења узорака.

Имунохистохемијска истраживања су рађена само за контролну и групу праћену 24 сата након третмана (3 јединке по групи), јер је *Western blot* метода показала да се најинтензивније промене дешавају у тој временској тачки. Један део истраживања је реализован коришћењем микроскопа *Axio Observer Z1* (ZEISS) а други помоћу фотомикроскопа *Leica* (Wetzlar, Germany) са дигиталном камером (DFC 320).

У тестовима понашања експерименталне животиње су тестиране само у једном тесту. Бихејвиорална сензитизација је тестирана код животиња третираних пропофолом и то 4, 24 и 48 сати након третмана, додатним ињектирањем д-амфетамина (6 јединки по групи) или фенциклидина (5 јединки по групи). Код ових јединки је праћена и спонтана моторичка активност, јер су тестови тематски повезани. Ефекат интралипида на спонтану и моторичку активност изазвану применом две наведене дроге је тестиран само у временској тачки 24 сата након ињектирања, јер су код животиња третираних пропофолом након примене две поменуте дроге значајне разлике у понашању уочене само у овој временској тачки. У свим горе поменутих тестовима моторичка активност је тестирана у комерцијалним аренама са аутоматским системом регистрације активности животиње (Opto-Varimex cages, Columbus Instruments, ОН). Тестови анксиозности су спроведени само са контролним и јединкама испитиваним 24 сата након третмана, коришћењем светло/тамне кутије (7 јединки по групи) и уздигнутог крстастог лавиринта (6 јединки по групи). За испитивање ефеката пропофола на меморијски процес у тесту просторне хабитуације тестиране су контролна и група 24 сата након третмана (8 јединки по групи). За испитивање ефеката пропофола на меморијски процес у тесту препознавања новог објекта тестиране су контролна и група 24 сата након третмана (8 јединки по групи), при чему је финални број јединки по групи смањен на 6 и 7, редом, због специфичних особина понашања животиња. Оба меморијска теста су рађена у аренама за тестирање моторичке активности, што је омогућило упоређивање добијених података уз избегавање утицаја димензија арене на препознавање новине.

Добијени резултати су статистички обрађени коришћењем *Statistica 6.0 (StatSoft Inc.)* софтверског пакета и представљени као средња вредност \pm стандардна грешка (за прву тематску целину) или као средња вредност \pm стандардна девијација са индивидуалним вредностима у оквиру групе (за другу тематску целину), уз напомену да су разлике произишле из захтева рецензента при публикацији резултата (Павковић и сарадници, 2017; Павковић и сарадници 2018). Због обимне статистичке анализе статистички параметри и коришћени тестови, као и *p* вредности, су сумирани у табелама.

У поглављу **Резултати** експериментално добијени подаци су класификовани у логично организоване целине и јасно графички приказани.

Од свих анализираних допаминоцептивних можданих региона (медијални префронтални део коре великог мозга, стријатум и таламус) једино су у таламусу уочене значајне промене у експресији фосфорилисане/активираних форме протеина DARPP-32, показатеља постсинаптичке допаминске сигнализације, 4 и 24 сата након третмана, и биле су праћене повећаном експресијом протеина FosB/ Δ FosB, биохемијског показатеља неуронске активности. Промене су локализоване у паравентрикуларном таламичком једру и медиодорзалном таламусу. У стријатуму и медијалном префронталном региону коре великог мозга је уочен пораст у експресији фосфорилисане форме CaMKII α , биохемијског сензора синаптичке активности који има важну улогу у меморији излагања адиктивним супстанцама. Смањење у интензитету анксиозности (процењено на основу резултата у тесту светло/тамне кутије и уздигнутог крстастог лавиринта) је забележено 24 сата након третмана, када је уочен и пад у експресији протеина FosB у стријатуму (што се може

тумачити као тражење сензација услед смањене активности можданог региона значајног за осећај задовољства). Појачан моторички одговор на д-амфетамин и фенциклидин је уочен 24 сата након третмана (укрштена сензитизација), као потврда да без обзира на различите примарне механизме дејства пропофол и две адиктивне супстанце користе исте неуронске путеве за остваривање психомоторичких ефеката. Резултати студије су такође указали да код перипубертетских пацова након излагања пропофолској анестезији постоје извесне потешкоће у позивању меморије и меморисању нових информација у неаверзивним меморијским тестовима (просторна хабитуација, препознавање новог објекта), 24 сата након третмана. Ове последице дејства пропофола су биле праћене променама у експресији молекула који учествују у позивању и реконсолидацији епизодичне меморије (смањење нивоа BDNF/TrkB, Egr-1, Erk1/2; пораст у нивоу CaMKII α , FosB/ Δ FosB), у дорзалном хипокампусу. Такође, у свим испитиваним можданим регионима осим у таламусу је забележен пораст у експресији фосфорилисане форме протеина адусин бета (Aducin β), што је индикација за дестабилизацију цитоскелета и синаптичку реорганизацију.

У **Дискусији** добијених резултата Жељко З. Павковић је, захваљујући добром познавању литературе, успешно објаснио промене уочене након примене пропофолске анестезије код младих животиња, имајући у виду за сада малобројне литературне податке о последицама примене пропофолске анестезије код људи. Посебна пажња је посвећена дискусији промена у понашању (што се може испитати и у хуманој популацији) у контексту биохемијских промена у можданим регионима од интереса (што се може циљано истражити само код експерименталних животиња), наглашавајући значај праћења психомоторичког опоравка у првих 48 сати након излагања пропофолској анестезији. Резултати добијени у оквиру прве тематске целине су по први пут указали да излагање пропофолској анестезији изазива пролазне промене на молекулском нивоу у различитим можданим регионима, као и промене у понашању, које су већ описане након примене супстанци са зависничким/адиктивним потенцијалом. У одсуству додатних фармаколошких третмана све уочене промене нестају до 48. сата након третмана. Резултати добијени у оквиру друге тематске целине су указали да третман утиче на неаверзивну меморију и изазива пролазне промене у експресији молекула значајних за меморијски процес у дорзалном хипокампусу, 24 сата након третмана, што се одражава кроз потешкоће у позивању меморије и препознавању новине, као и меморисању нових информација у тестовима просторне хабитуације и препознавања новог објекта. Резултати добијени у оквиру треће тематске целине су указали да третман изазива дестабилизацију цитоскелета чиме се омогућава синаптичка реорганизација, што остаје да буде испитано у даљем раду.

У поглављу **Закључци** сумирани су и јасно наведени резултати добијени у овој докторској дисертацији.

У поглављу **Литература** наведене су 332 библиографске јединице, што указује да је кандидат темељно и студиозно приступио изучавању проблематике докторске дисертације.

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја (M21):

1. **Pavković Ž.**, Smiljanić K., Kanazir S., Milanović D., Pešić V., Ruždijić S. (2017) Brain molecular changes and behavioral alterations induced by propofol anesthesia exposure in peripubertal rats. *Pediatric Anesthesia*, 27: 962-972.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pan.13182>
2. **Pavković Ž.**, Milanović D., Ruždijić S., Kanazir S., Pešić V. (2018) The influence of propofol anesthesia exposure on nonaversive memory retrieval and expression of molecules involved in memory process in the dorsal hippocampus in peripubertal rats. *Pediatric Anesthesia*, 28: 537-546.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pan.13396>

Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја (M34):

1. **Pavković Ž.**, Pešić V., Milanović D., Tesić V., Rakić Lj., Kanazir S., Ruždijić S. Propofol anesthesia induces transient changes in the expression of CaMKII, PSD95 and β -Actin in adolescent rat brain, FENS Featured Regional Meeting. 2015, 7 – 10 October, Thessaloniki, Greece. Abstract book, p.142.
2. **Pavković Ž.**, Milanović D., Ruždijić S., Kanazir S., Pešić V. Exposure to propofol anesthesia affects FosB/ Δ FosB expression in the dorsal dentate gyrus of peripubertal rats. 2015, 7th Congress Of Serbian Neuroscience Society. 2017, 25-27 October, Belgrade, Serbia. Abstract book, p.44.

Радови из уже научне области:

Радови у часописима међународног значаја:

1. **M23** Klajn A., Drakulić D., Tosić M., **Pavković Ž.**, Schwirtlich M., Stevanović M. (2014) SOX2 overexpression affects neural differentiation of human pluripotent NT2/D1 cells. *Biochemistry (Moscow)*. 79: 1172-1182.
2. **M22** Milanović D., Pešić V., Loncarević-Vasiljković N., **Pavković Ž.**, Popić J., Kanazir S., Jevtović-Todorović V., Ruždijić S. (2016) The Fas Ligand/Fas Death Receptor Pathways Contribute to Propofol-Induced Apoptosis and Neuroinflammation in the Brain of Neonatal Rats. *Neurotoxicity Research*. 30: 434-452.
3. **M22** Podgorac J., Pešić V., **Pavković Ž.**, Martać L., Kanazir S., Filipović L., Sekulić S. (2016) Early physical and motor development of mouse offspring exposed to valproic acid throughout intrauterine development. *Behavior Brain Research*. 311: 99-109.
4. **M21** Smiljanić K., Pešić V., Mladenović Djordjević A., **Pavković Ž.**, Brkić M., Ruždijić S., Kanazir S. (2015) Long-term dietary restriction differentially affects the expression of BDNF and its receptors in the cortex and hippocampus of middle-aged and aged male rats. *Biogerontology*. 16: 71-83.
5. **M21** Stojković S., Podolski-Renić A., Dinić J., **Pavković Ž.**, Ayuso JM., Fernández LJ., Ochoa I., Pérez-García VM., Pešić V., Pešić M. (2016) Resistance to DNA Damaging Agents Produced Invasive Phenotype of Rat Glioma Cells-Characterization of a New in Vivo Model. *Molecules*. 21: 843.

Мишљење и предлог Комисије:

Увидом у докторску дисертацију **Жељка З. Павковића**, Комисија са задовољством констатује да приказани резултати дају важан научни допринос разумевању последица примене пропофолске анестезије у педијатријској популацији. Гледано у целини, резултати ове студије су указали да боље разумевање биолошких последица примене пропофола у јувенилном/перипубертетском узрасту може допринети сагледавању старосно-зависних здравствених ризика третмана, који су до сада интензивно истраживани само у екстремима животне доби, тј. у раној постнаталној и касној животној фази. Кандидат је показао добро познавање литературе и проблематике релевантне научне области, као и висок степен истраживачке зрелости.

О резултатима добијеним у оквиру овог истраживања, интерпретацији и значају истих додатно говори податак да су објављени, кроз **две публикације**, у врхунском међународном часопису (M21) у области педијатрије.

Имајући у виду квалитет докторске дисертације Жељка З. Павковића, под насловом „**Ефекти анестезије индуковане пропофолом на синаптичку пластичност, активност допаминског система и понашање јувенилних пацова**“, као и број и квалитет научних радова који су објављени на основу добијених резултата дисертације, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену Комисије и одобри јавну усмену одбрану докторске дисертације кандидата Жељка З. Павковића.

КОМИСИЈА:

др Весна Пешић, научни саветник
Универзитет у Београду – Институт за
биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Сања Дацић, доцент
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Селма Каназир, научни саветник
Универзитет у Београду – Институт за
биолошка истраживања „Синиша Станковић“

У Београду, 15. 6. 2018. године.