

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

ВЕЋУ МЕНТОРА

ПРЕДМЕТ: ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ НАУЧНЕ ЗАСНОВАНОСТИ ТЕМЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Комисија за оцену научне заснованости докторске дисертације кандидата Мр.сци. мед Дејана Чубрила формирана на седници Научно-наставног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу од 19.11. 2008. у саставу:

1. Проф. др Михајло Б. Спасић, председник
2. Доц. др Владимир Љ. Јаковљевић, потенцијални ментор
3. Проф. др Драган М. Ђурић, члан
4. Проф. др Душица Павловић, члан
5. НС др сц Душко П. Благојевић, члан

разматрала је предлог теме докторске дисертације под називом **"Системски ефекти поремећаја редокс равнотеже изазваног интензивним тренингом младих фудбалера"**. На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Научно-наставном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

I. Биографски подаци

Кандидат Мр.сци. мед Дејан Чубрило, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању (члан 30) и Статутом Медицинског факултета (члан151) за израду докторске дисертације.

a) Лични подаци

Кандидат Мр.сци. мед Дејан Чубрило рођен је 01.03.1975. године у Карловцу. Основну школу завршио је у Карловцу, а гимназију у Београду. Медицински факултет у Београду уписао је школске 1993/94, који је завршио фебруара 2001. године са просечном оценом 8.80 и тиме стекао звање доктора медицине. Обавезан лекарски стаж је обавио на Војномедицинској академији у периоду март 2001 – март 2002. године. Школске 2001/2002. радио је као асистент приправник на предмету Анатомија на Медицинском факултету у Београду. Од јуна до септембра 2002. године волонтирао је на "Институту за мајку и дете" на одељењу дечије хирургије, а од јула до септембра 2003. године радио у амбуланти "Влашко Поље" Дома здравља "Младеновац".

Последипломске студије, смер СПОРТСКА МЕДИЦИНА уписао је школске 2003/2004. године на Медицинском факултету у Београду. Исте године почиње да ради у Републичком заводу за спорт, прво као лекар опште праксе, а затим као лекар на специјализацији из спортске медицине (од фебруара 2005. године). Од септембра 2005 до октобра 2006 године вршио је дужности помоћника директора Републичког завода за спорт за сектор медицине спорта. Септембра 2005. године прелази на последипломске студије, смер СПОРТСКА МЕДИЦИНА на Медицинском факултету у Крагујевцу.

15.12.2006. године одбранио је магистарску тезу под називом «Процена функције L-Arginin:NO система и параметара оксидационог стреса код врхунских спортиста» на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу чиме је стекао звање магистра медицинских наука. 19.12.2006. године уписао је трећу годину докторских студија на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу, где је у току израде докторске тезе.

Специјалистички испит положио је 18.07.2008. године пред испитном комисијом на Медицинском факултету Универзитета у Београду чиме је стекао звање специјалисте медицине спорта. Од августа 2007 до јула 2008 (сезона 2007/2008) радио је као главни лекар КК "Партизан" из Београда.

Од априла 2008 стално је запослен у Високој здравствено-санитарној школи струковних студија "ВИСАН" у Београду.

Др Чубрило говори енглески и немачки језик.

II. Подаци о предложеној теми

Предложена тема је из области истраживања физиологије напора, са посебним освртом на потенцијалне системске ефекте поремећене редокс равнотеже, индуковане активним вишегодишњим тренажним процесом.

а) Предмет рада

Планираним истраживањима у оквиру предложене теме докторске дисертације "**Системски ефекти поремећаја редокс равнотеже изазване интензивним тренингом младих фудбалера**". кандидат Мр.сци. мед. Дејан Чубрило би студијом пресека обухватио 80 активних спортиста (фудбалери) различитог узраста (пионири, кадети и јуниори), чланова омладинске школе ФК Црвена Звезда. По завршетку петогодишњег праћења испитиване групе узети су узорци крви за анализу нивоа експресије антиоксидационих ензима, као и анализу одговора ендотелног L-arginin:NO система на физички стрес (праћењем концентрације нитрита (NO₂) у плазми), као и прооксидационог ефекта физичког оптерећења, праћењем индекса липидне пероксидације и супероксид анион радикала. Анализа евентуалних адаптивних (морфолошких и функционалних) промена на нивоу миокарда била би спроведена кроз анализу специфичних електрокардиографских параметара током редовних спортскомедицинских прегледа, као и успостављање корелација између добијених вредности антиоксидационих ензима и адаптивних промена на нивоу срчаног мишића спортиста..

б) Научни циљ и основне хипотезе рада

Оксидациони стрес је стање поремећене равнотеже између реактивних врста кисеоника (РОС) и реактивних врста азота (РНС) са једне стране и антиоксидационе заштите са друге стране (АОС). При том долази до иреверзибилних промена у функцији ћелије, које доводе до патолошких промена у ткиву, развоја великог броја болести и убрзаног процеса старења. Физичко оптерећење индукује оксидациони стрес, као и смањен антиоксидациони капацитет организма. Када продукција РОС надвлада капацитет АОС, може доћи и до иреверзибилне оксидације органских компоненти: липида, протеина и осталих ћелијских компоненти. У току физичког оптерећења, повећана продукција РОС је највероватније последица повећане потрошње кисеоника, али такође и неких алтернативних механизма: појачане функције неутрофила или аутоксидације катехоламина.

Интензивни мишићни рад адолесцената, као најчешћу негативну последицу има развој морфолошких промена које укључују повећање волумена и масе леве коморе, увећање волумена леве преткоморе, као и структурне промене на нивоу десне коморе. У недавним истраживањима је показано да су поједине фазе контрактилног процеса осетљиве на редокс промене. На првом месту, могућност отварања калцијумских канала изолованог саркоплазматског ретикулума (SR) може бити увећана под утицајем оксидације доступних протеина, као и вратити у првобитно стање редукцијом dithiothreitol (DTT). Са друге стране, преузимање јона калцијума у цистерне саркоплазматичног ретикулума може бити инхибирано високим концентрацијама водоник пероксида (H₂O₂), при чему је процес реверзибилан утицајем DTT. Коначно, оксиданти имају способност промене сензитивности миофибрила на нивоу концентрације јона калцијума и на нивоу временског одржавања у интерфибриларним просторима.

У смислу свега горе изнетог, кандидат у свом истраживању има за циљ утврђивање постојања адаптивних промена на нивоу електрокардиографских студија функције срца и стандардних биохемијских анализа везаних за интензиван тренинг, одређивање активност ензима заштите од оксидационих оштећења у еритроцитима испитаника, на основу чега би успоставио корелационе односе између вредности за испитиване ензиме и промена у функцији срца.

У свом истраживању кандидат очекује да РОС могу учествовати у развоју оштећења која могу обухватити феномене везане за промене на срчаним мишићима, као и да интензивним радом индуковани генерализовани оксидациони стрес има за последицу индукцију хипертрофије и пролиферације миоцита. Такође очекује да би праћење промена на нивоу антиоксидационог система могло послужити као добар основ за спровођење неопходних превентивних мера у склопу клиничке евалуације спортиста (screening-a).

ц) Пацијенти, и методе рада:

Еспериментална група је добро одабрана, узорак је коректно формиран, а планирана методологија је савремена и адекватна

ц1) Пацијенти.

Истраживање би обухватило 80 спортиста (фудбалери) различитог узраста (пионири, кадети и јуниори), чланова омладинске школе ФК Црвена Звезда. Сви спортисти налазе се у распону од 14-17 година са спортским стажом од минимално 5 година, са нормалним индексом телесне масе, апсолутно здрави без обољења у анамнези, без посебних навика у исхрани, без употребе било каквих лекова и суплемената. Млади спортисти су били укључени у редовне спортске тренинге фудбала, 12 часова недељно. Сви спортисти су праћени 5 година (од марта 2002 до марта 2007 године) у склопу редовних спортских систематских прегледа, при чему би за потребе истраживања лонгитудинално пратили ЕКГ, функционалне и морфолошке параметре у тачно дефинисаним временским интервалима (2002 год, 2004 год, 2005 год, 2007 год). Контролну групу чини 30 здраве деце у узрасту који одговара групи испитиваних спортиста, која ће преглед и узорковање крви проћи у склопу редовних систематских прегледа и рутинских биохемијских контролних анализа. Основни критеријум за укључивање испитаника који ће представљати контролу су: 1) апсолутно здрава деца без обољења у анамнези 2) да не узимају витамине као додаток исхрани, 3) да се не баве редовном физичком активношћу у смислу свакодневних тренинга, и за старију децу-3) да су непушачи.

ц2) Методологија.

Студија је дизајнирана као студија пресека. Наиме, у једном тренутку праћења испитиване групе, узети су узорци крви за анализу нивоа експресије антиоксидационих ензима, који су, заправо примарна варијабла овог истраживања. Млади спортисти су били укључени у редовне спортске тренинге фудбала, 12 часова недељно. Сви спортисти су праћени 5 година (од марта 2002 до марта 2007 године) у склопу редовних спортских систематских прегледа, при чему би за потребе истраживања лонгитудинално пратили ЕКГ, функционалне и морфолошке параметре у тачно дефинисаним временским интервалима (2002 год, 2004 год, 2005 год, 2007 год). Сви прегледи обављени су на Факултету спорта и физичког васпитања у Београду у склопу методолошко-истраживачке лабораторије. У циљу испитивања функционалних способности фудбалера кориштен је Astrand-ов тест субмаксималног оптерећења на бицикл-ергометру. Стандардни 12-то канални ЕКГ снимак урађен је током мирне респирације у миру у лежећем положају.

Активност ензима ендogene антиоксидационе заштите организма одређивана је према следећим експерименталним методама:

1. Одређивање активности SOD вршено је адреналинском методом. Ова метода припада групи метода "негативног" типа, јер се прати смањење брзине аутооксидације адреналина у алкалној средини, која је зависна од O_2^- . Присутна SOD уклања O_2^- и при томе инхибира реакцију аутооксидације адреналина. Брзина аутооксидације адреналина прати се спектрофотометријски преко промене апсорбанце на 480 nm. Пораст апсорбанце на 480 nm потиче од акумулације адренохрома. Брзина аутооксидације адреналина једнака је нагибу линеарног дела пораста апсорпције. Процент инхибиције користи се као мера каталитичке активности ензима. Брзина аутооксидације адреналина у одсуству ензима узима се као референтна (контролна), а брзина аутооксидације у присуству SOD, односно протеина у цитосолу представља део референтне вредности.
2. Активност каталазе у сонификату одређивана спектрофотометријским праћењем брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на 230 nm. На тој таласној дужини водоник пероксид апсорбује светлост. Тачна концентрација водоник-пероксида одређивана је на следећи начин: у

односу на апсорпцију разблаженог раствора пуфера (1:10), као нула, читавана је апсорпција раствора састављеног од 0.9 ml разблаженог пуфера и 0.1 ml разблаженог 30% раствора H₂O₂ (1:100).

3. Активност глутатион-пероксидазе одређивана је праћењем потрошње NADPH, односно оксидација NADPH уз глутатион редуктазу на 340 nm. Ова индиректна метода која мери промену производа реакције показала се веома репродуктивном у поређењу са другим методама одређивања GSH-Px активности.
4. Одређивање активности глутатион-редуктазе заснива се на праћењу оксидације NADPH на 340 nm, у реакцији у којој ензим катализује редукцију оксидованог у редуковани глутатион. Активност је изражена у nmol NADPH/мин/mg протеина.

За опис параметара од значаја, а у зависности од њихове природе, коришћене су фреквенције, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења (95% CI). За испитивање нормалности расподеле параметара коришћени су тестови: Kolmogorov-Smirnov тест и Shapiro-Wilk тест, графици: Хистограм и Normal Q-Q Plot. За тестирање разлика између параметара, а у зависности од њихове природе коришћени су: Friedman rank sum test, Kruskal Wallis test, Wilcoxon signed rank test, Mann Whitney U test (тј. Wilcoxon rank sum test) и Mann Whitney Exact test (Exact Wilcoxon rank sum test). Приликом тестирања разлика између параметара, а у случају постојања више подгрупа, коришћена је тзв. Bonferroni-eva корекција уобичајене границе статистичке значајности $\alpha=0.05$ ($\alpha_{\text{korigovano}}=0.05/(\text{укупан број тестова})$).

д) Очекивани резултати

Поновљена, интензивна контрактилна активност повећава продукцију ендогених ROS и може резултовати у општем оксидационом стресу. Под таквим условима долази до померања редокс баланса са оптималног ка вредностима које могу утицати на функцију миоцита. Постоје резултати који показују да је контрактилна функција интактног јединичног мишићног влакна скелетних мишића осетљива на концентрацију пероксида у апроксимативно физиолошким границама. Очекују се резултати који ће показати постојање промена у активности антиоксидационих ензима у крви младих спортиста током интензивних тренинга. Те промене корелиране са променама на ЕКГ-у могу представљати прве доказе о механизму развоја спортског срца код активних спортиста. То је основа за успостављање мерења вредности активности антиоксидационих ензима у превенцији услова за развој ових промена преко дозирања оптерећења и/или суплементацију антиоксидансима и микроелементима.

III Закључак и предлог Комисије

На основу података презентираних у тачкама I и II овог извештаја, Комисија доноси следећи

ЗАКЉУЧАК

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих резултата кандидат Мр.сци. мед Дејан Чубрило, испуњава све услове за добијање теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је оригинална и научно оправдана са циљем испитивања физиологије физичког оптерећења, са посебним освртом на системске ефекте поремећаја редокс равнотеже код активних спортиста млађих селекција. У прилог актуелности ове теме говоре контраверзни подаци у литератури о овим проблемима, посебно са аспекта модулације кардиоваскуларне функције и могућности превенције дозирањем оптерећења и/или применом адекватне суплементације, као и проблема диференцијалне дијагностике искључивања дилатативне кардиомиопатије као узрока који се може иницијално презентовати као увећање димензија леве коморе пре појаве симптома и хемодинамске детериорације.
3. Комисија са задовољством предлаже Научно-наставном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **Мр.сци. мед Дејана Чубрила** под насловом

"Системски ефекти поремећаја редокс равнотеже изазваног интензивним тренингом младих фудбалера". и да одобри кандидату израду докторске дисертације.

Предлог ментора

За ментора рада Комисија предлаже Доц. др Владимира Љ. Јаковљевића, доцента Медицинског факултета у Крагујевцу.

У Крагујевцу
28. 11. 2008.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Михајло Б. Спасић – председник
Ред. проф. Хемијског факултета у Београду
(Научна област: Физиологија)

Доц. др Владимир Љ. Јаковљевић - ментор
Доцент Медицинског факултета у Крагујевцу
(Научна област: Физиологија)

Проф. др Драган М. Ђурић - члан
Ред. проф. Медицинског факултета у Београду
(Научна област: Физиологија)

Др. Сц Душко П. Благојевић - члан
Научни саветник Института за биолошка
истраживања "Синиша Станковић" у Београду
(Научна област: Физиологија)

Проф. др Душица Павловић - члан
Ред. проф. Медицинског факултета у Нишу
(Научна област: Биохемија)
