

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
КРАГУЈЕВАЦ**

1. Одлука Наставно-научног већа:

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-1619/3 од 26. 02. 2014. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **мр Дејана Станојевића** под називом:

**„ПАРАМЕТРИ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА И ИНФЛАМАЦИЈЕ У КРВИ
ПАЦОВА ИЗЛОЖЕНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ
ПРЕТРЕНИРАНОСТИ“**

На основу одлуке Научно-наставног већа формирана је Комисија у саставу:

- 1) **проф. др Владимир Јаковљевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
- 2) **доц. др Дејан Чубрило**, доцент Факултета за спорт и туризам Универзитета Едуконс у Новом Саду за ужу научну област Физиологија, члан;
- 3) **доц. др Душица Ђорђевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Методологија антропометрије, члан.

На основу увида у приложену документацију, комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи:

Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Кандидат **мр Дејан Станојевић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат, мр Дејан Станојевић, је рођен 05.02.1962. године. Медицински факултет Универзитета у Београду завршио је 1988. године, а специјализацију из области Спортске медицине 1998. године на Медицинском факултету Универзитета у Нишу. Магистарске студије завршио је на Медицинском факултету

Универзитета у Крагујевцу 2007. године. У Специјалној болници „Меркур“ у Врњачкој Бањи радио је као лекар опште праксе (1988.-1998.), а потом и као лекар специјалиста медицине спорта (1998.-2002.). Од 2002. године је директор Специјалне болнице „Меркур“. Добитник је низа награда попут „Менаџер године“ (2005. и 2009.), „Личност године Југоисточне Европе у области здравственог туризма“ (2010.), итд.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе:

Предложени **наслов** докторске тезе је „Параметри оксидативног стреса и инфламације у крви пацова изложених експерименталном моделу претренираности“. Комисија прихвата предложени наслов.

Синдром претренираности веома је популарна тема у савременој спортској научној литератури, међутим патолошки механизми повезани са његовим настанком, маркери за детекцију и процену овог стања, као и смернице за превенцију и терапију, још увек нису дефинисани. Предложен је низ хипотетичких објашњења механизма који стоје иза овог синдрома, међутим, иако све те теорије имају потенцијал, док се не изведе већи број проспективних студија у којима би се вршило лонгитудинално праћење спортиста, оне су подложне спекулацијама. Обзиром да тренирање спортиста на такав начин да они развију синдром претренираности није етички, многи аутори сматрају да би недавно развијен анимални модел претренираности могао да реши овај проблем. Стога је **предмет** ове студије разјашњавање улоге цитокинске теорије и теорије оксидативног стреса у настанку овог синдрома код пацова.

Радне **хипотезе** студије су:

- Неадекватно дозирана физичка активност изазваће поремећај редокс равнотеже, а ове промене биће у узрочно-последичној вези са појавом појединих цитокина у крви претренираних пацова.
- Појава маркера оксидативног стреса и инфламације у крви пацова могла би да иницира промена нивоа низа физиолошких, биохемијских и хормонских параметара, што би све скупа довело до пада физичких способности пацова.

2.3. Подобност кандидата:

Кандидат мр Дејан Станојевић је као први аутор објавио један рад у целини у научном часопису националног значаја, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

1. **Stanojevic D**, Stojanovic Tomic J, Djordjevic D. Heart rate modulations in overtraining syndrome. Ser J Exp Clin Res 2013; 14(3): 125-133. (**M52 - 1,5 бод**)

Поред овог рада, кандидат је као коаутор објавио још 5 радова у националним часописима са рецензијом.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања:

Испитивање синдрома претренираности веома је популарна тема у савременој научној литератури, иако су испитивања овог феномена започета још пре више од 2 деценије. У једном од првих објављених прегледних чланака, поред пада спортских перформанси, предложено је још 80 потенцијалних симптома претренираности (40 физиолошких, 12 психолошких, 14 имунолошких и 18 биохемијских). Наредне године истраживања само су проширивале ову листу. Тренутно, изгледа да је синдром претренираности системски инфламаторни процес са дифузионим ефектима на неурохормоналну осовину, што утиче на имунитет и расположење спортисте. Већи број недавно објављених прегледних чланака фокусирао се на хипотетичка објашњења механизма који стоје иза претренираности (гликогенска, глутаминска, цитокинска, хипоталамичка хипотеза, хипотеза оксидативног стреса, централног замора, аутономног нервног система). Иако све предложене теорије о механизму настанка претренираности имају потенцијал да објасне синдром претренираности, ниједна од њих не објашњава све аспекте овог синдрома. За разлику од свих других теорија, цитокинска теорија предлаже одговор на питање зашто настаје синдром претренираности. Она указује на примарни стимулус који изазива активацију многих биохемијских путева и проналази корелацију између активације ових путева и симптома уочених у претренираности. Међутим, иако постоји теоретска корелација између цитокина и симптома претренираности, оскудни су литературни подаци који показују повећане нивое цитокина у крви претренираних спортиста. Такође, подаци везани за редокс статус претренираних особа су такође веома оскудни, али се сматра да и ова теорија игра значајну улогу у настанку претренираности, јер су реактивне кисеоничне врсте укључене у све фазе настанка инфламације, а њихово повећано стварање у условима исцрпљујућег вежбања је потврђено у стотинама објављених истраживања.

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

Испитивање синдрома претренираности веома је популарна тема у савременој научној литератури, међутим патолошки механизми повезани са његовим настанком, маркери за детекцију и процену овог стања, као и смернице за терапију, још увек нису дефинисани. Обзиром да тренирање спортиста на такав начин да они развију синдром претренираности није етички, извођење лонгитудиналних студија на људима није могуће, већ већина студија користи ретроспективно прикупљене податке, који су углавном непотпуни. Недавно развијен анимални модел претренираности, планиран за извођење у овој студији, могао би да реши овај проблем и расветли улогу предложених механизма настанка овог нежељеног синдрома. Циљ овог истраживања је да анализира промене параметара редокс статуса и инфламације код пацова изложених експерименталном моделу претренираности. Расветљавање улоге проинфламаторних медијатора у настанку претренираности има посебан значај, обзиром да цитокинска теорија настанка овог синдрома има највећи теоретски потенцијал. Такође, проналажење корелације између параметара инфламације и

оксидативног стреса је од изузетне научне и практичне важности, обзиром да реактивне кисеоничне врсте, као и азот моноксид, утичу на све фазе настанка инфламације, а њихово повећано стварање у условима исцрпљујућег вежбања је опште познато.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Мишићне контракције и понављајући покрети у зглобовима индукују микротрауме у ткивима, а адаптација, у виду зарастања и јачања ткива, одвија се путем активације локалног инфламаторног одговора и регрутације цитокина. Сваки тренажни процес базира се на понављајућем преоптерећењу, међутим, уколико оптерећење није праћено адекватним опоравком, инфламаторни одговор може постати појачан, хроничан и патолошки, што, између осталог, може довести до пада спортске форме и хроничног умора. Сматра се да цитокинска теорија настанка претренираности има највећи теоретски потенцијал да објасни овај феномен, јер указује на примарни стимулус који изазива активацију многих биохемијских путева и проналази корелацију између активације ових путева и симптома уочених у претренираности. На пример, смањене количине гликогена, често уочене у претренираних спортиста, могу бити одговорне за осећај тешких ногу и мишићни умор, а могу бити последица цитокинима посредованих ефеката на хипоталамус и транспорт глукозе. Промене у понашању и психолошком стању претренираних спортиста (депресија, смањен апетит, поремећај сна) такође могу бити последица ефеката цитокина, како на централне рецепторе у мозгу, тако и на активацију хипоталамусно-хипофизно-надбубрежне осовине и отпуштање хормона стреса са сличним ефектима на периферији. Цитокини такође могу деловати на хипоталамусно-хипофизно-гонадалну осовину, и између осталог вршити супресију тестостерона кроз централну инхибицију. Смањене количине глутамин код претренираних спортиста могу бити последица повећаног коришћења глутамин за различите цитокинима посредоване процесе, обзиром да је глутамин прекурсор за синтезу инфламаторних протеина. Претренираност изазива активацију цитокина који фаворизују ТН2 лимфоцитни профил, што доводи до чешће појаве инфекција горњег респираторног тракта. Међутим, иако постоји теоретска корелација између цитокина и симптома претренираности, оскудни су литературни подаци који показују повећане нивое цитокина у крви претренираних спортиста. Стога су истраживања која би се бавила цитокинском теоријом настанка претренираности, а посебно повезивањем са другим теоријама, неопходна ради расветљавања њене стварне вредности. Од посебног значаја је и расветљавање улоге оксидативног стреса у настанку претренираности. Реактивне кисеоничне врсте имају потенцијал да реагују са читавим низом хемијских врста, и имају многобројне функције у ћелијској сигнализацији и ензимологији, међутим уколико њихова продукција измакне контроли, што се може десити приликом интензивног акутног или хроничног вежбања, они постају веома штетни за ћелију јер могу оштетити бројне функционалне путеве у њој.

2.7. Методе истраживања

Студија је експерименталног карактера.

Пацови (n=42, Вистар албино сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе 250±50g) би током 12 недеља били подвргнути тренингу пливања (5 дана у недељи) у специјално конструисаном базену за експерименталне животиње. Прве недеље тренинга била би извршена адаптација на воду и тренинг, постепеним повећањем времена пливања од 5 до 15 минута. Током преосталих 11 недеља контролна група пацова би била стављана у базен дневно по 3 минута, ради изазивања стреса који сама водена средина чини на пацове. Експериментална група би плувала по протоколу приказаном у табели, док би тренажна контролна група пацова и након 9. недеље наставила са тренингом једном дневно по 60 минута (најучесталији протокол тренинга у литератури). Овакав протокол тренинга експерименталне групе заснован је на недавно развијеном експерименталном моделу претренираности код пацова, који се заснива на повећању учесталости тренинга и скраћењу времена за опоравак.

У току тромесечног тренажног процеса биће спроведено 6 тестова оптерећења са циљем евалуације ефеката тренажног програма на физичке перформансе пацова, обзиром да је погоршање спортског извођења једини сигуран знак претренираности. Тест ће се састојати од пливања до отказа са оптерећењем 10% телесне масе пацова.

Недеља тренинга	Трајање тренинга	Број тренинга дневно	Опоравак између тренинга	Тест оптерећења
1	5-15min	1	24h	T1
2	20min	1	24h	-
3	30min	1	24h	-
4	45min	1	24h	-
5	60min	1	24h	T2
6	60min	1	24h	-
7	60min	1	24h	-
8	60min	1	24h	-
9	60min	1	24h	T3
10	60min	2	4h	T4
11	60min	3	3h	T5
12	60min	4	2h	T6

Узимање узорака крви биће вршено након жртвовања животиња (декапитацијом), из вратне вене. Прва група животиња биће жртвована на самом почетку експеримента. Након 9. недеље, пре наглог повећања тренажног оптерећења, биће жртвована друга група пацова. Након 12. недеље биће жртвоване преостале животиње. Жртвовање животиња у 9. недељи омогућиће прецизнију евалуацију ефеката адекватно и неадекватно дозирањем тренажног оптерећења на испитиване параметре.

У узорцима венске крви били би одређивани следећи параметри: параметри оксидативног стреса (супероксид анион радикал (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2), азот моноксид (NO), индекс липидне пероксидације (TBARS)), активност ензима заштите од оксидационих оштећења (супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), редуковани глутатион (GSH), и нивои цитокина (IL-6 и TNF- α , IL-1 β)).

Узорци венске крви ће бити узимани у вакумске епрувете са цитратом, а основна обрада узорака састојаће се од одвајања еритроцита од плазме центрифугирањем (10 мин на 5000 rpm, 4°C). Исталожени еритроцити се ресуспендују и три пута исперу физиолошким раствором уз центрифугирање 10 минута на 5000 rpm, а затим замрзну на -20°C до анализе. Одређивање концентрације наведених биохемијских параметара вршиће се спектрофотометријски.

Међу испитиваним параметрима наћи ће се и телесна маса пацова, која ће бити мерена пре сваког теста оптерећења, не само због потребе за одређивањем тежине баласта са којим ће пацови пливати на тесту, већ због претпоставке да је пад телесне масе још један од симптома настанка претренираности.

Снага студије: Прорачун величине узорка је заснован на резултатима претходно публикованог релевантног истраживања, у ком су аутори испитивали ефекат протокола претренираности идентичном нашем на оксидативни стрес и апоптозу кардиомиоцита пацова. За прорачун је коришћена једнофакторска АНОВА, уз претпоставку алфа грешке од 0.05 и снаге студије 0.8 (бета грешка 0.2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма. Узимањем у обзир резултате ове студије укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 21. Узимајући у обзир да је у нашој студији планирано да одређени број животиња буде жртвован 3 недеље пре краја студије, као и могућност искључења појединих експерименталних животиња из завршне анализе, укупан број потребних животиња одређен је на најмање 42 пацова.

Статистичка обрада података: Статистичка обрада података биће обављена у статистичком пакету *SPSS 20.0*. За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, биће коришћене методе дескриптивне статистике, графичко и табеларно приказивање. У зависности од расподеле, за анализу података користиће се одговарајући параметријски или непараметријски тестови: т-тест или Mann Whitney тест, упарени т-тест или Wilcoxon тест, анализа варијансе или Kruskal Wallis тест, анализа варијансе са поновљеним мерењима или Friedman тест. Статистичка значајност разлике била би постављена на нивоу од $p < 0.05$. За мерење јачине линеарног односа између две варијабле користиће се Пирсонов или Спирманов тест линеарне корелације.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекивани резултати студије огледају се у потврди хипотеза: пад физичких перформанси и телесне масе пацова подвргнутих експерименталном протоколу физичког оптерећења биће у вези са поремећеним редокс статусом пацова, као и повећаним нивоима проинфламаторних медијатора у крви пацова.

2.9. Оквирни садржај дисертације

У овом истраживању пацови ће током три месеца бити подвргнути тренингу пливања у специјално конструисаном базену за експерименталне животиње. Пацови ће бити подељени у три групе: 1) контроле, 2) нормално тренирани, 3) претренирани пацови. Протокол тренинга експерименталне групе заснован је на недавно развијеном експерименталном моделу претренираности код пацова, који подразумева повећање учесталости тренинга и скраћење времена за опоравак у последње три недеље експеримента. Ефекти примењеног тренажног оптерећења на редокс статус и параметре инфламације у крви пацова биће анализирани одређивањем следећих параметара: 1) маркера оксидационог стреса (супероксид анјон радикал, водоник пероксид, нитрити, липидни пероксиди), 2) маркера антиоксидативне заштите (активност супероксид дисмутазе и каталазе, ниво редукованог глутатиона) и 3) маркера инфламације (интерлеукин 6, интерлеукин 1 бета и тумор некрозис фактор алфа). Узорци крви биће узети три пута у току тромесечног тренажног процеса (у првој, деветој и дванаестој недељи експеримента). На тај начин ће бити прецизније евалуиран ефекат претренираности, јер ће се статистичка значајност разлике у испитиваним параметрима вршити не само између између три групе на крају студије, већ и упоређивањем резултата добијених пре почетка и на крају тронедељног протокола који би у експерименталној групи требало да доведе до претренираности. Постојање претренираности у експерименталној групи пацова биће доказивано тестом оптерећења и мерењем телесне масе, чији пад се за сада сматра јединим сигурним знаковима претренираности.

2.10. Предлог ментора

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже **доц. др Душицу Ђорђевић**, доцента Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Методологија антропометрије. Доц. др Душица Ђорђевић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и планираном методологијом.

2.11. Научна област дисертације

Медицина, изборно подручје: Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином

2.12. Научна област чланова комисије

- 1) проф. др Владимир Јаковљевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија.
- 2) доц. др Дејан Чубрило, доцент Факултета за спорт и туризам Универзитета Едуконс у Новом Саду за ужу научну област Физиологија.
- 3) доц. др Душица Ђорђевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Методологија антропометрије.

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег научног рада и публикованих радова **мр Дејан Станојевић** испуњава све услове прописане Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу као и Законом о Универзитету за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу где се на експерименталном моделу синдрома претренираности испитују ефекти неадекватно дозирањег тренажног оптерећења на редокс статус и параметре инфламације у крви пацова.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза бити од научног и практичног значаја за разјашњавање механизма који учествују у настанку синдрома претренираност, што ће допринети разумевању овог феномена, као и превенцији нежељених догађаја.
4. Комисија предлаже Наставно научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **мр Дејана Станојевића** под називом: „**параметри оксидативног стреса и инфламације у крви пацова изложених експерименталном моделу претренираности**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

- 1) проф. др Владимир Јаковљевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
- 2) доц. др Дејан Чубрило, доцент Факултета за спорт и туризам Универзитета Едуконс у Новом Саду за ужу научну област Физиологија, члан;
- 3) доц. др Душица Ђорђевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Методологија антропометрије, члан.

У Крагујевцу, _____ 2014. године