

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-268/60, од 13. 04. 2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Др Ирене Пушице, под називом:

„Утицај састојака енергетских напитака на функцију миокарда и оксидативни стрес у изолованом срцу и крви пацова”

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
2. **Доц. др Владимир Живковић**, члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
3. **Проф. др Драган Радовановић**, члан, редовни професор Факултета спорта и физичког васпитања Универзитета у Нишу за ужу научну област Физиологија.

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

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Ирена Пушица (рођена Петровић) рођена је у Ужицу 29.07.1983. године. Завршила је Основну школу „Стеван Чоловић” у Ариљу, а потом Шесту београдску гимназију (природно-математички смер), при чему је у обе наведене школе била носилац дипломе „Вук Караџић”. Медицински факултет Универзитета у Београду уписала је 2002. године и завршила 2010. године са просечном оценом 9,11 (девет једанаест), чиме је стекла звање доктора медицине. Након обављеног приправничког стажа у Клиничком центру Србије положила је стручни испит 2010. године у Београду. Специјалистичке академске студије на Медицинском факултету Универзитета у Београду, смер Клиничка фармакологија и терапија, уписала је 2011. године и завршила 2013. године са просечном оценом 9,27 (девет двадесет седам), при чему је одбранила рад на тему „Нове фармакотерапијске могућности примене окситоцина: значај генетских мутација и

полиморфизма рецептора за окситоцин у контроли патолошких облика понашања и реаговања”. Другу годину Докторских академских студија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, смер Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином уписала је 2012. године. Усмени докторски испит положила је у јуну 2013. године са оценом 9 (девет).

Др Ирена Пушица била је ангажована од 2011. године до 2015. године као истраживач сарадник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја, под називом „Анализа полиморфизама ЦИП изоензима у становништву Србије” (ОИ 175093), чији је институционални носилац Медицински факултет Универзитета у Београду.

Од 2015. године ради као лекар опште медицине у Дому здравља „Нови Београд”.

2.2.Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Утицај састојака енергетских напитака на функцију миокарда и оксидативни стрес у изолованом срцу и крви пацова”

Предмет: Испитивање ефеката акутне и хроничне конзумације *Red Bull*-а (енергетско пиће, ЕП) на кардиодинамске параметре и редокс параметре у срцу и крви пацова, као и поређење ових ефеката на наведене параметре код седентарних пацова и пацова који су након конзумације ЕП физички активни. Осим акутне конзумације ЕП (администрација ЕП интрагастричном гаважом), биће испитивани и ефекти директне администрације ЕП у изоловано срце пацова.

Хипотеза: Директна администрација ЕП у срце, као и интрагастрична конзумација ЕП, ће позитивно утицати на инотропска својства срца, односно довести до побољшања контрактилности срца и повећања коронарног протока. Иако повећано оптерећење срца у миру услед ефеката ЕП, као и физичка активност, може довести до повећање нивоа оксидативних параметара у коронарном ефлуенту и крви пацова, услед антиоксидативних својстава супстанци у ЕП, неће доћи до оксидативног стреса.

2.3.Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидаткиња је објавила један рад у целини за штампу у рецензираном часопису категорије М52, у коме је први аутор, чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе:

Pusica I, Valdevit Z, Todorovic S, Jakovljevic V, Cubrilo D, Djuric D, Stefanovic Dj, Zivkovic V, Barudzic N, Djordjevic D. The redox state of young female handball players following acute exercise and a one-month precompetitive training period. *Ser J Exp Clin Res* 2013; 14(4): 161-68 (**М52=1.5 бод**)

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Енергетска пића представљају један од најпопуларнијих дијететских суплемената међу младима, посебно спортистима, јер садрже низ нутријената за које се сматра да побољшавају менталне и физичке способности, односно смањују перцепцију менталног и физичког замора. Предмет су многобројних истраживања која се спроводе како у лабораторијским условима, на културама ћелија и експерименталним животињама, тако и у клиничким условима на здравим добровољцима. Поред многобројних истраживања, још увек су неистражени и недовољно познати њихови ефекти на кардиоваскуларни систем, што се нарочито односи на хроничне ефекте.

Комерцијална ЕП садрже различите количине различитих супстанци (угљени хидрати, таурин, Б витамини, Гуарана, Гинсенг, итд.), али се сматра да је за термогена, ергогена и когнитивна својства ових пића, односно за њихова физиолошка и бихејвиорална дејства, најзаслужнији кофеин. Стимулативна својства кофеина добро су проучена и позната, али синергистички ефекти које он има са осталим састојцима ЕП недовољно су истражени. Хемодинамска истраживања су показала да конзумација ЕП доводи до повећаног оптерећења срца у миру, што може имати клинички значај код особа са постојећим срчаним обољењима, или код хроничних конзумента ових пића. Од посебног значаја је хронична конзумација ових пића у седентарној популацији, обзиром да у тој популацији конзумација кофеина у комбинацији са простим угљеним хидратима може довести до инсулинске резистенције. Резултати студија које су се бавиле ефектима ЕП на ендотелну функцију су различити, те је испитивање ефеката хроничне конзумације ових пића на кардиодинамику и оксидативни стрес у срцу и крви од великог значаја за превенцију различитих хроничних болести код седентарних конзумента ових пића.

Обзиром да пречеста и претерана конзумација ЕП представља глобални јавни здравствени проблем, све већи број истраживања се бави негативним ефектима ових пића на кардиоваскуларни и нервни систем младих. Број студија које су доказале и разјасниле ергогена својства ЕП је мали, а њихова снага није велика, те је ово научно-истраживачко поље физиологије тренутно веома актуелно.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Обзиром на чињеницу да поред мултивитаминских препарата, ЕП припадају категорији најпопуларнијих дијететских суплемената, постоји велика заинтересованост како стручне јавности, тако и опште популације, везана за њихов утицај на здравље људи. Неадекватна употреба ових пића довела је до пораста броја пацијената збринутих због кардиоваскуларних компликација, као и броја научних радова који се баве овом темом. Упркос томе, број студија које се баве ергогеним дејствима ових пића није велики, посебно број добро контролисаних инвазивних студија спроведених на животињама и

животињском материјалу. Стога ће анализа утицаја директне, акутне, а посебно хроничне администрације ЕП код пацова значајно допринети разјашњавању ефеката ових пића на функцију миокарда, као и ендотелну функцију. Посебан значај студије огледа се у анализи редокс статуса конзумента ЕП, нарочито у условима постојања или непостојања физичке активности након конзумације ЕП. Резултати ове студије значајно ће допринети процени ризика и превенцији различитих акутних нежељених ефеката конзумације ЕП, као и хроничних болести код седентарних конзумента ових пића.

Циљ и хипотезе студије

Главни циљ истраживања је да испита утицај ЕП на кардиодинамске параметре и оксидативне параметре у срцу пацова, и то: ефекте директне администрације ЕП у изоловано срце пацова, ефекте акутне интрагастричне администрације ЕП, као и ефекте хроничне конзумације ЕП, а све то у зависности од редовности конзумације ЕП (повремени и хронични конзументи ЕП), као и од физичке активности након конзумације ЕП (седентарни и физички активни субјекти). Такође, биће испитиван и редокс статус у крви акутних/хроничних, седентарних/физички активних пацова.

Главна хипотеза студије је да ће ЕП довести до побољшања контрактилности срца, повећања коронарног протока, али не и до повећања нивоа прооксидативних врста односно поремећаја редокс статуса пацова.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Хемодинамска мерења након конзумације ЕП ретко су вршена у претходним истраживањима, али је недавно показано да конзумација *Red Bull*-а доводи до повећања крвног притиска и двоструког производа (срчана фреквенца × систолни притисак), односно повећаног оптерећења срца у миру, без утицаја на периферни васкуларни отпор. У другом, недавно објављеном истраживању показано је да је конзумација ЕП допринела повећању ударног волумена, фреквенце срца, минутног волумена, крвног притиска, контрактилности, као и двоструког производа, а утицала је и на смањење периферног васкуларног отпора, за разлику од ЕП без шећера, као и кофеина који су допринели повећању периферног васкуларног отпора. Треће истраживање је показало да кофеин сам није утицао на пик систолног *strain*-а (контрактилности леве коморе), док ЕП јесте. Обзиром на мали број студија и разнолике резултате претходно спроведених студија, истраживање ефеката директне, акутне и хроничне администрације ЕП на контрактилност срца значајно ће проширити базу знања из ове области и омогућити извлачење сигурнијих закључака о синергистичким ефектима супстанци које чине ова пића на функцију миокарда. Ово је посебно значајно обзиром на чињеницу да су претходна истраживања указала на могућност развоја хипертензивне болести срца, болести коронарних артерија, цереброваскуларних болести, као и периферне артеријске болести услед хроничне конзумације ЕП. У свим наведеним кардиоваскуларним компликацијама ендотелна

дисфункција игра значајну улогу, а претходне студије су долазиле до различитих резултата испитујући ефекте ЕП на ендотелну функцију. Стога испитивање оксидативног стреса односно параметара редокс статуса у крви и коронарном ефлуенту може значајно допринети разјашњавању ефеката ЕП на кардиоваскуларни систем.

2.7. Методе истраживања

У питању је експериментална студија на животињама и анималном материјалу, у оквиру које се део изводи *in vivo*, а део *in vitro*. Студија је одобрена од стране Етичког одбора Факултета медицинских наука, као и Управе за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине.

На основу претходно објављених студија извршен је прорачун снаге студије и величине узорка, на основу ког је планирано да истраживање обухвати 120 пацова (Вистар албино сој, мушки пол, старости 8 недеља, телесне масе 250 ± 50 г). Експерименталне животиње ће бити чуване у строго контролисаним условима (температура 25°C , циклус светлост:тама 12:12 часова), док ће вода и храна бити доступна у довољној количини да би могле да их узимају према потреби (*ad libitum*).

Обзиром да се један месец живота Албино пацова може поредити са три године живота човека, испитивање ефеката хроничне употребе енергетских пића ће трајати 4 недеље. Пацови ће бити подељени у 2 групе (у зависности од конзумације ЕП), а свака група имаће по 2 подгрупе (у зависности од физичке активности):

1. контроле које не конзумирају ЕП (n=60):

- а) нетренирани (седентарни) пацови (n=30);
- б) тренирани пацови: пацови који пливају 1 час дневно (n=30).

2. пацови који током 4 недеље свакодневно интрагастричном гаважом конзумирају умерену дозу (3.75ml) ЕП (n=60):

- а) нетренирани пацови: пацови који након конзумације ЕП остају у кавезу (n=30);
- б) тренирани пацови: пацови који 30 минута након конзумације ЕП пливају 1 час (n=30).

У студији ће бити коришћен *Red Bull*, ЕП за које сматра да је најчешће конзумира. Наведена количина ЕП од 3.75ml одабрана је на основу претходно објављених студија у којима је вршена суплементација кофеином и ЕП. У њој се налази 1,2 mg кофеина (доза кофеина блиска максималној препорученој - око 6 mg/kg телесне масе), 15 mg таурина, 322,5 mg сахарозе и 78,75 mg глукозе, 9 mg глукуронолактона, витамини Б групе (0,3 mg ниацинамида, 0,075 mg калцијум-пантотената, 0,075 mg пиридоксинхлорида, 0,75 mg инозитола, 0,075 μg цијанокобаламина), 1,5 mg натријум цитрата.

У оквиру испитивања ефеката ЕП на кардиодинамске параметре и параметре оксидативног стреса у коронарном ефлуенту вршиће се следеће серије експеримената:

1. ефекти хроничне конзумације ЕП: пацови (n=10 из сваке подгрупе) који 24ч пре жртвовања не конзумирају ЕП, а кроз изоловано срце на Лангендорфу перфундује се Krebs-Hensenleit-ов физиолошки раствор;

2. ефекти акутне конзумације ЕП: пацови (n=10 из сваке подгрупе) који 30 минута пре жртвовања конзумирају 3.75ml ЕП, а кроз изоловано срце на Лангендорфу перфундује се Krebs-Hensenleit-ов физиолошки раствор;

3. ефекти директне администрације ЕП у срце: пацови (n=10 из сваке подгрупе) који 24ч пре жртвовања не конзумирају ЕП, а кроз изоловано срце на Лангендорфу перфундује се Krebs-Hensenleit-ов физиолошки раствор у ком је растворено 150 μ mol ЕП.

При експерименталном раду биће поштовани прописи о добробити лабораторијских животиња и правилник за рад са експерименталним животињама Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, који су усклађени са европском директивом у овој области.

Након жртвовања (декапитацијом), свим животињама биће узет узорак венске крви (из југуларне вене), а потом ће срце бити изоловано и перфундовано методом ретроградне перфузије по Лангендорфу при промени перфузионог притиска у опсегу од 40 до 120 cmH₂O. Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле омогућило би се убацивање сензора у леву комору ради директног и континуираног праћења параметара функције леве коморе. Током сваке вредности перфузионог притиска биће регистровани следећи параметри функције леве коморе: dp/dt max - максимална стопа промене притиска у левој комори, dp/dt min - минимална стопа промене притиска у левој комори, SLVP - систолни притисак леве коморе, DLVP - дијастолни притисак леве коморе, HR - срчана фреквенца. Вредност коронарног протока (CF) би се одређивала флоуметријски.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, за сваку вредност перфузионог притиска, спектрофотометријски ће се одређивати следећи биомаркери оксидативног стреса: супероксид анион радикал (O₂⁻), водоник пероксид (H₂O₂), азот моноксид у форми нитрита (NO₂⁻), индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS. У узорцима венске крви, осим изнад наведених прооксидативних параметара, била би одређивана и активност ензима заштите од оксидационих оштећења: активност супероксид дисмутазе (SOD), активност каталазе (CAT), ниво редуованог глутатиона (GSH).

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), упарени т-тест (или Wilcoxon), анализа варијансе (или Kruskal Wallis), анализа варијансе са поновљеним мерењима (или Friedman). За мерење јачине линеарног односа између две варијабле користиће се Пирсонов или Спирманов тест

линеарне корелације. Статистичка значајност разлике била би постављена на нивоу од $p < 0.05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Обзиром на антиоксидативна својства кофеина и таурина, као главних састојака ЕП, очекује се да акутна конзумација ЕП позитивно делује на редокс статус пацова, посебно пацова који су физички активни, и тиме подложнији настанку оксидативног стреса. Такође се очекује побољшање функције леве коморе након акутне администрације ЕП, односно позитивни инотропски ефекти ЕП. Коначно, очекује се да хронична употреба ЕП доведе до промена у редокс статусу и функцији срца, као и одговору на акутну конзумацију ЕП. Оваква очекивања заснована су на сазнањима везаним за ефекте суплементације кофеином и таурином, међутим, могући су супротни резултати, обзиром на синергистичко дејство свих супстанци које се налазе у ЕП. Обзиром на актуелност теме, као и на чињеницу постојања контрадикторних резултата спроведених истраживања, добијени резултати ће послужити бољем схватању бенефита и евентуалних ризика које употреба ЕП има на кардиоваскуларни систем.

2.9. Оквирни садржај дисертације

У овом истраживању, које ће трајати 4 недеље, пацови ће бити подељени у 4 групе: 1) пацови редовни конзументи ЕП који нису физички активни, 2) пацови редовни конзументи ЕП који јесу физички активни, 3) пацови који не конзумирају ЕП и нису физички активни, 4) пацови који не конзумирају ЕП, а јесу физички активни. Ефекти ЕП на кардиоваскуларни систем пацова биће испитивани кеоз три серије експеримената: 1) директна администрација ЕП у изоловано срце, 2) акутна конзумација ЕП 30 мин пре жртвовања и 3) хронична, свакодневна конзумација ЕП. Свим пацовима ће након жртвовања бити узет узорак венске крви, ради одређивања редокс статуса у плазми (супероксид анјон радикал, водоник пероксид, азот моноксид, тиобарбитурне реактивне супстанце, редуковани глутатион) и еритроцитима (супероксид дисмутаза, каталаза), а срца изолована и перфундована према модификованој техници по Langendorff-у. Ефекти ЕП на кардиодинамске параметре (срчана фреквенца, максимална и минимална стопа стопа промене притиска у левој комори, систолни и дијастолни притисак леве коморе, коронарни проток) и оксидативни стрес у коронарном ефлуенту (супероксид анјон радикал, водоник пероксид, азот моноксид, тиобарбитурне реактивне супстанце) биће испитивани током коронарне ауторегулације (коронарни перфузиони притисак 40-120 cm H₂O). Добијени резултати ће послужити бољем схватању бенефита и евентуалних ризика које употреба ЕП има на кардиоваскуларни систем.

3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Доц. др Душица Ђорђевић**, доцент Факултета медицинских наука за ужу научну област Методологија антропометрије. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Радови у вези са темом докторске дисертације:

1. Stanojevic D, Jakovljevic V, Barudzic N, Zivkovic V, Srejovic I, Parezanovic Ilic K, Cubrilo D, Ahmetovic Z, Peric D, Rosic M, Radovanovic D, **Djordjevic D**. Overtraining does not induce oxidative stress and inflammation in blood and heart of rats. *Physiol Res*. 2016;65(1):81-90.
2. Stojanovic Tomic JT, Jakovljevic VLj, Zivkovic VV, Srejovic IM, Valdevit ZJ, Radovanovic DS, Djuric DM, Ahmetovic ZK, Peric DB, Cankovic MB, Jovanovic MS, Djordjevic DZ. Biphasic response of cardiodynamic adaptations to swimming exercise in rats. *Gen Physiol Biophys*. 2015;34(3):301-10.
3. Djordjevic DZ, Cubrilo DG, Puzovic VS, Vuletic MS, Zivkovic VI, Barudzic NS, Radovanovic DS, Djuric DM, Jakovljevic VLj. Changes in athlete's redox state induced by habitual and unaccustomed exercise. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:805850.
4. Zivkovic V, Jakovljevic V, **Djordjevic D**, Vuletic M, Barudzic N, Djuric D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem*. 2012;370(1-2):59-67.
5. Djordjevic DZ, Cubrilo DG, Barudzic NS, Vuletic MS, Zivkovic VI, Nesic M, Radovanovic D, Djuric DM, Jakovljevic VLj. Comparison of blood pro/antioxidant levels before and after acute exercise in athletes and non-athletes. *Gen Physiol Biophys*. 2012;31(2):211-9.

4. Научна област дисертације

Научна област: Медицина. Ужа научна област: Експериментална физиологија.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
2. **Доц. др Владимир Живковић**, члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
3. **Проф. др Драган Радовановић**, члан, редовни професор Факултета спорта и физичког васпитања Универзитета у Нишу за ужу научну област Физиологија.

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове Др Ирене Пушице, комисија закључује да кандидат поседује одговарајуће компетенције и да испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.

2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита акутне и хроничне ефекте конзумације ЕП на кардиодинамске параметре и редокс параметре у срцу и крви пацова, као и да испита ефекте директне администрације ЕП у изоловано срце пацова који редовно конзумирају и не конзумирају ЕП, а затим да упореди ове ефекте на наведене параметре код седентарних пацова и пацова који свакодневно пливају.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза Др Ирене Пушице бити од великог научног и практичног значаја у смислу утицаја ЕП на кардиоваскуларни систем.

4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Др Ирене Пушице под називом „**Утицај састојака енергетских напитака на функцију миокарда и оксидативни стрес у изолованом срцу и крви пацова**” и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. др Владимир Јаковљевић, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија

Доц. др Владимир Живковић, члан, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија

Проф. др Драган Радовановић, члан, редовни професор Факултета спорта и физичког васпитања Универзитета у Нишу за ужу научну област Физиологија

Крагујевац, 20. 04. 2016.