

1. Одлука Наставно-научног већа

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-7479/3-4, од 10.10.2012. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата мр сци. биохем. Марије Бурсаћ, под називом:

„Утицај L-аскорбинске киселине и alfa-токоферола на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца у условима акутне прекомерне физичке активности“

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, председник, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
2. **Проф. др Радослав Митић**, члан, редовни професор Медицинског факултета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
3. **Проф. др Драган Миловановић**, члан, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

2. Извештај комисије о подобности теме

2.1. Кратка биографија кандидата

Мр сци. биохем. Марија Бурсаћ рођена је 23.03.1964. у Липљану. Основне студије биологије завршила је на Природно-математичком факултету Универзитета у Приштини. Специјалистички рад под насловом: “Биохемијска и фармаколошка истраживања екстракта хајдучке траве (*Achillea Millefolium L.*)”, као и магистарски рад под насловом: “Биохемијска и фармаколошка истраживања екстракта першуна (*Petroselinum crispum L.*) и целера (*Arium graveolens L.*)” одбранила је на Универзитету у Приштини. Ради као дипломирани биолог на Институту за фармакологију и токсикологију Медицинског факултета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: „Утицај L-аскорбинске киселине и alfa-токоферола на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца у условима акутне прекомерне физичке активности“

Предмет: Праћење параметара оксидационог стреса и компоненти антиоксидационе заштите у току прекомерне физичке активности на експерименталном моделу код заморчића

Хипотеза: Основне хипотезе студије су да прекомерна физичка активност (због повећане потребе за кисеоником) може бити узрок оксидативног стреса са следственим механизмима оштећења биомембрана, т.ј. активирања процеса липидне пероксидације, као и да повећање количине створених кисеоничних слободних радикала (SR) у току и након прекомерне физичке активности представља неопходан сигнал за херметички повезану усходну регулацију ендогеног антиоксидантног система (ензимског и неензимског). Такође, додатна хипотеза је да се применом екзогенних антиоксиданаса овај одговор може модификовати.

2.3. Подобност кандидата

Кандидату је објављен један рад у целини за штампу у часопису са CC/SCI листе, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

M. Bursac, M. Popovic, R. Mitic, V. Jakovljevic and B. Kaurinovic. Antipyretic Effect of Celery (*Apium graveolens*) Extracts in Mice. *Pharmaceutical Biology* 2006; 44(8): 581–4. **M23=3 бода**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Прве назнаке да се прекомерна физичка активност доведе у везу са повећањем интензитета липидне пероксидације датирају још од 70-их година прошлог века. Међутим, новија истраживања указују да је упражњавање правилне физичке активности неопходан услов за брже и оптималније успостављање функције аутоакутног система. Оксидативни стрес индукован физичком активношћу доводи до усходне регулације антиоксидантног система, обезбеђујући заштиту организма од SR током понављаних физичких активности, као и када организм мирује, а изложен је повећаној производњи и атаку SR. На овај начин физиолошки капацитет тела ће се проширити или адаптирати, што ће на крају водити унапређењу здравља и/или позитивних људских способности. С тога физичка активност постаје важан чинилац у оптимизовању функционисања савременог човека, а врло често се користи и као један од поступака корекције већ насталих патофизиолошких стања.

Примарна производња SR као одговор на прекомерну физичку активност може се одиграти на неколико начина (митохондријска респирација, метаболизам простаноида, аутооксидација катехоламина и оксидазне ензимске активности). Секундарна продукција SR (у току акутне прекомерне физичке активности као и следствени одмор) последица је поремећаја хомеостазе калцијума и/или деструкције протеина који садрже гвожђе. Производња SR зависна је од врсте извођења физичке активности (аеробне или анаеробне), интензитета и дужине излагања физичком напору, затим животног доба, пола, примењене исхране током активности.

Иако је доста о овој теми разјашњено, дефинитивно је нејасно да ли је производња SR индукована физичком активношћу са последичним оксидативним оштећењем неопходан или штетан стимулус за физиолошке функције и да ли би тебало да их адекватно користимо или одбацимо. Може бити да је тренутно недефинисан оптималан ниво продукције SR и оксидативног оштећења неопходан за адаптације антиоксидантног система и других физиолошких функција које воде до унапређења здравља.

Прооксидантни и антиоксидантни систем функционишу на врло комплексан начин. С тога, конкретни закључци како и зашто се SR стварају током физичке активности, остају предмет будућих истраживања. За потпуно разумевање природе ових процеса у овом тренутку недостају многе чињенице о комплексности функционисања редокс система људског тела. Дакле, ово имплицира да досадашња сазнања повезана са SR и акутном физичком активношћу остају отворена за даља истраживања.

У неким досадашњим истраживањима на заморчићима који су излагани интензивном физичком оптерећењу методом пливања („swimming“ тестом) утврђена је статистички значајно већа вредност параметара оксидативног стреса (XOD, MDA) у односу на вредности измерене пре самог оптерећења, а такође, утврђена је статистички смањена вредност у активности антиоксидативних ензима (SOD, CAT, GST, GPX) у скелетним мишићима експерименталних пацова који су излагани интензивном физичком стресу методом пливања.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије

Имајући у виду чињеницу да заморци не синтетишу витамин Ц и витамин Е (што је случај и код људи) као и да су поменути витамини у досадашњим радовима спроведеним на експерименталним моделима (пацовима) који синтетишу витамине и тиме резултати интерферирају са ендеogenous синтезом, те се не може одвојити ефекат апликованих витамина од ефекта ендеogenous синтетисаних витамина (који у стресу могу повећати активност у односу на базалне вредности), резултати добијени овом студијом представљаће новину у овој сфери истраживања. Такође, овај рад има за циљ да да одговор на питање какве ће ефекте показати витамин Ц и витамин Е (прооксидантни или антиоксиданти) (примењених понаособ или у комбинацији) у условима акутне прекомерне физичке активности заморчића изазване „swimming“ тестом. У фармаколошком погледу утврдиће се дејство примењених витамина (понаособ или у комбинацији) на дужину издржљивости у условима акутне прекомерне физичке активности замораца изазване „swimming“ тестом. У нашој земљи није рађена слична студија, а, имајући у виду и све детаље дизајна, ни у свету.

Циљ и хипотезе студије

Главни циљеви истраживања су да се испита: прооксидантни систем експерименталних замораца (*Guinea pigs*) пре и након излагања прекомерне физичке активности, ендеogenous антиоксидантни статус експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности, утицај L-аскорбинске киселине на понашање прооксидантног и ендеogenous антиоксидантног система експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности, утицај alfa-токоферола на понашање прооксидантног и ендеogenous антиоксидантног система експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности, утицај комбинације L-аскорбинске киселине и alfa-токоферола на понашање прооксидантног и ендеogenous антиоксидантног система експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности, као и на основу свега горе наведеног донети исправне закључке о сврсисходности адјувантне улоге L-аскорбинске киселине и alfa-токоферола у њиховој примени у прекомерној физичкој активности.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

У неким досадашњим истраживањима на заморчићима који су излагани интензивном физичком оптерећењу методом пливања („swimming“ тестом) утврђена је статистички значајно већа вредност параметара оксидативног стреса (XOD, MDA) у односу на вредности измерене пре самог оптерећења, а такође, утврђена је и статистички смањена вредност у активности антиоксидативних ензима (SOD, CAT, GST, GPX) у скелетним мишићима експерименталних пацова који су излагани интензивном физичком стресу методом пливања.

С друге стране, истраживања на пацовима који су третирани комбинацијом витамина Ц и Е (20mg/kg+25mg/kg) пре излагања акутном физичком стресу методом пливања, показала су да је активност ензима антиоксидативне заштите (SOD, CAT, GSH) статистички значајно већа у односу на нетретирану групу, као и да протективни антиоксидантни ефекат комбинације витамина С и Е у крви и хомогенату ткива срца варира. Опоравак активности антиоксидантних ензима је слабо изражен, с обзиром на то да је измерена концентрација MDA у споменутих ткивима благо повећана. Овако контраверзни резултати досадашњих студија дају додатну специфичну тежину свим истраживањима која овај проблем покушавају додатно да разјасне.

2.7. Методе истраживања

Врста студије

Експериментална студија

Експериментална популација

Студија ће бити спроведена на заморчићима (*Guinea pigs*) (n=40), оба пола, просечне телесне масе 450g±50g, који раније нису били ничим третирани. Услови амбијента и исхране биће у складу са водећим принципима чувања и употребе експерименталних животиња (смештај у контролној просторији чија је температура 25°C ±2°C, влажност ваздуха око 60%, са 12/12 часова дана и ноћи, 10 дана пре почетка експеримента као и током самог експеримента).

Протокол истраживања је одобрен од стране Етичког одбора Медицинског факултета Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици.

Материјал и методе

За изучавање акутног оксидативног стреса користиће се експерименталне животиње које ће методом случајног избора бити сврстане у 8 група од по 5 животиња: 1) контролна група. Над овом групом не спроводи се никаква физичка активност, већ се код ње узима узорак 2 ml венске крви методом венепункције (из вене сафене) ради одређивања базалних вредности индикатора липидне пероксидације и антиоксиданата. Након 30 минута животиња се жртвује, при чему се понавља процедура узимања узорка крви венепункцијом из срца (5 ml) и узимају се узорци ткива јетре, срца и скелетног мишића. Разлог жртвовања експерименталних животиња је одређивање параметара антиоксидантног система (ензимског и неензимског) ткива јетре, као централног органа за синтезу истих. За доношење адекватног закључка, вредности измерене у јетри су много валидније у односу на вредности измерене у крвној плазми и другим компартманима. 2) Другој групи ће се администрирати 20 mg/kg, л-аскорбинске киселине (Витамин Ц) интраперитонеално (i.p.), без излагања тесту физичког оптерећења. Након пола сата (30 min.) од администације витамина Ц узеће се 2ml венске крви методом венепункције (из вене сафене). Након 30 минута животиња се жртвује, при чему се понавља процедура узимања узорка крви венепункцијом из срца (5 ml) и узимају се узорци ткива јетре, срца и скелетног мишића. 3) трећој групи ће се администрирати 25 mg/kg, алфа-токоферола (Витамина Е) интраперитонеално (i.p.), без излагања тесту физичког оптерећења. Након двадесет и четири сата (24h) од администације витамина Е узеће се 2ml венске крви методом венепункције (из вене сафене). Након 30 минута животиња се жртвује, при чему се понавља процедура узимања узорка крви венепункцијом из срца (5 ml) и узимају се узорци ткива јетре, срца и скелетног мишића. 4) четвртој групи ће се администрирати комбинација 20 mg/kg л-аскорбинске ки-

селине и 25mg/kg алфа-токоферола i.p., без излагања тесту физичког оптерећења. Двадесет и четири сата (24h) пре узимања 2ml венске крви из вене сафене животињама ће се администрирати једнократна доза (25 mg/kg, i.p.) алфа-токоферола, а 30 min. пре узимања крви једнократна доза (20 mg/kg, i.p.) л-аскорбинске киселине. Након жртвовања понавља се процедура узимања узорка крви венепункцијом из срца (5 ml) и узимају се узорци ткива јетре, срца и скелетног мишића. 5) Пета експериментална група биће изложена тесту прекомерне физичке активности који ће се одредити методом пливања до исцрпљености. Пре излагања тесту биће узет узорак 2ml венске крви из вене сафене ради одређивања базалних вредности индикатора липидне пероксидације и антиоксиданата. Након завршетка теста физичког оптерећења животиња се жртвује. Након жртвовања такође понавља се процедура узимања узорка крви венепункцијом из срца (5 ml) и узимају се узорци ткива јетре, срца и скелетног мишића. 6) Шеста експериментална група биће изложена тесту физичког оптерећења и суплементацији л-аскорбинском киселином. Пола сата (30 min.) пре излагања физичком стресу животињама ће бити администрирана једнократна доза (20 mg/kg, i.p.) л-аскорбинском киселином. Пре излагања тесту биће узет узорак 2ml венске крви. Након жртвовања такође се понавља се процедура узимања узорка крви венепункцијом из срца и узимају се узорци ткива јетре, срца и скелетног мишића. 7) Седма експериментална група биће изложена тесту физичког оптерећења и суплементацији алфа-токоферолом. Двадесет и четири сата (24h) пре излагања физичком стресу животиње ће бити инкубирани једнократном дозом (25 mg/kg, i.p.) алфа-токоферола. Пре излагања тесту биће узет узорак 2ml венске крви. Након жртвовања такође понавља се процедура узимања узорка крви венепункцијом из срца и узимају се узорци ткива јетре, срца и скелетног мишића. 8) Осма експериментална група биће изложена тесту физичког оптерећења и суплементацији комбинације л-аскорбинске киселине и алфа-токоферола. Двадесет и четири сата (24h) пре излагања физичком стресу животиње ће бити инкубирани једнократном дозом (25 mg/kg, i.p.) алфа-токоферола, као и 30 min. пре излагања физичком стресу животиње ће бити инкубирани једнократном дозом (20 mg/kg, i.p.) л-аскорбинском киселином. Пре излагања тесту биће узет узорак 2ml венске крви. Након жртвовања такође понавља се процедура узимања узорка крви венепункцијом из срца и узимају се узорци ткива јетре, срца и скелетног мишића

Тест оптерећења одређивати ће се методом пливања до исцрпљености. Експерименталне животиње ће пливати у воденом резервоару дубине 60 cm, са просечном количином воде 20000cm³, температуре 32°C. Животиње ће бити излагане тесту оптерећења до постизања исцрпљености, тј. тест ће бити прекинут када животиња по трећи пут потоне у воду. (5)

Испитиване супстанце (L-аскорбинска киселина и алфа-токоферол) се администрирају интраперитонеално у једном од квадраната доњег дела абдомена замораца латерално од средње линије, водећи рачуна да се избегне повреда мокраћне бешике, јетре или црева. Након убода иглом, пре убризгавања супстанце обавезно аспирирати садржај. Уколико се аспирира урин или цревни садржај, поступак администрације поновити новим сетом за давање лека.

Крв се узоркује венепункцијом вене сафене, вакутајнер системом, максимално један минут након обраде места узорковања, уз претходну брижљиву дезинфекцију места узорковања 95% етил алкохолом.

Кардијалном пункцијом на крају огледа, добија се узорак крви од заморчића. У стерилне шприцеве захвата се по 5,0 мл крви. Након коагулације крви и ретракције коагулума крв је центрифугирана на 3.000 обртаја, у току 15 минута. После центрифугирања деканти-

ра се серум у суве, стерилне епрувете. Узорци крви се похрањују на -20°C пре биохемијског испитивања.

Припрема хомогената јетре. Животиња се жртвује у етарској инхалационој анестезији. Након жртвовања животиње и искрварења, јетра се брзо извади и искрвари тако што се прислања на филтер папир затим измери на прецизној ваги. Одсече се око 1 грам ткива исецка маказицама и хомогенизује са 3 волумена (0.05 mol/L TRIS-HCl пуфера са сахарозом 0.25 mol/L , $\text{pH}=7.4$). Стаклена посуда хомогенизатора (по Potter-Elvehjem-у) мора бити урођен у иситњени лед, да би се зауставила активност ензима и да од повећане температуре услед трења, при хомогенизацији, не би дошло до денатурације протеина. Хомогенат се затим профилира кроз двослојну газу и спреми у епрувете и похрани на -20°C до одређивања биохемијских варијабли. (6)

Припрема хомогената срца. Узорак срчаног мишићног ткива хомогенизује се у 50 mM фосфатног пуфера (pH 7.4). Хомогенизовани раствор се центрифугира на $3200 \times g$ на 5°C у трајању од 20 минута. Супернатант се филтрира и користи за даљу биохемијску обраду. (7)

Припрема хомогената скелетног мишића. Након жртвовања животиње дисецира се мишић гастрокнемиус заморца и моментално замрзава у течном азоту на -80°C до извођења биохемијских анализа. У процесу препарације мишића за биохемијске анализе мишић се најпре исецка на ситне комадиће и хомогенизује под течним азотом. Један део мишићног узорка се помеша са 2 мл $0.01 \text{ mol}^{-1}\text{L}^{-1}$ фосфатног пуфера ($138 \text{ mmol}^{-1}\text{L}^{-1}$ NaCl, $2.7 \text{ mmol}^{-1}\text{L}^{-1}$ KCl, $\text{mmol}^{-1}\text{L}^{-1}$ EDTA; pH 7.4 и коктела протеинских инхибитора ($1 \text{ mmol}^{-1}\text{L}^{-1}$ aprotinin, $1 \text{ mg}^{-1}\text{mL}^{-1}$ leupeptin, $1 \text{ mmol}^{-1}\text{L}^{-1}$ phenylmethanesulfonyl fluorida) и хомогенизује. Хомогенат се центрифугира на $12000g$, 30 минута на 4°C . Супернатант се филтрира и користи за даљу биохемијску обраду. (8)

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да ће, после ових истраживања и анализа, моћи да се изведе закључке о томе да прекомерна физичка активност (због повећане потребе за кисеоником) може бити узрок оксидативног стреса са следственим механизмима оштећења биомембрана, т.ј. активирања процеса липидне пероксидације и да повећање количине створених кисеоничних слободних радикала у току и након прекомерне физичке активности представља неопходан сигнал за херметички повезану усходну регулацију ендогеног антиоксидантног система (ензимског и неензимског). Такође, очекује се да у присуству L-аскорбинске киселине и α -токоферола постоји модулација одговора (реактибилности) ендогеног антиоксидантног система у смиослу повећаног антиоксицидионог капацитета, као и да, генерално, прекомерна физичка активност представља погодан субјект за проучавање понашања прооксидантног и антиоксидантног система.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Оксидативни стрес је врло сложен механизам прооксидативне и антиоксидативне интеракције који резултира превагом прооксидантног система са следственим оштећењем и дисфункцијом биолошких структура. Производња слободних радикала као одговор на прекомерну физичку активност резултат је митохондријске респирације, аутооксидације катехоламина, оксидазне ензимске активности, поремећаја хомеостазе калцијума и/или деструкције протеина који садрже гвожђе.

Циљ ове студије је да се праћењем параметара оксидационог стреса и компоненти антиоксидационе заштите у току прекомерне физичке активности испита оксидантни и антиоксидантни статус експерименталних животиња, конкретно заморчића.

2.10. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Проф. др Драган Миловановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

2.11. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Фармакологија и токсикологија.

2.12. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, председник, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
2. **Проф. др Радослав Митић**, члан, редовни професор Медицинског факултета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
3. **Проф. др Драган Миловановић**, члан, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија.

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публиковане радове мр сци. биохем. Марије Бурсаћ 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 развије нов приступ изучавању поремећаја редокс равнотеже проузроковане прекомерном физичком активношћу.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза мр сци. биохем. Марије Бурсаћ бити од великог научног и практичног значаја у смислу тумачења промена редокс равнотеже индукованих прекомерним физичким оптерећењем, као и потенцијалног протективног дејства егзогених антиоксиданата.
4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата мр сци. биохем. Марије Бурсаћ под називом „**Утицај L-аскорбинске киселине и α -токоферола на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца у условима акутне прекомерне физичке активности**“ и одобри њену израду.

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

Проф. др Радослав Митић, члан, редовни професор Медицинског факултета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици за ужу научну област Фармакологија и токсикологија

Проф. др Драган Миловановић, члан, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија

У Крагујевцу, 07. 12. 2012.