

## **1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу**

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-720/28, од 13. 07. 2016. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Радице Драгојловић Ружичић, под називом:

### **„Морфолошки и функционални аспекти срчане адаптације на тренинг и детренинг код пацова различитог пола”**

Чланови комисије су:

- 1. Проф. др Владимир Јаковљевић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија,
- 2. Проф. др Дејан Јеремић**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Анатомија,
- 3. Проф. др Драган Радовановић**, члан, редовни професор Факултета физичке културе 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**

Радица Драгојловић Ружичић је рођена 19. 08. 1961. године у Чачку. Гимназију «Филип Филиповић» у Чачку је завршила 1980. године. Дипломирала је на Медицинском факултету у Београду 1986. године. Специјалистички испит из области Физикална медицине и рехабилитације положила је 2001. године на ВМА.

До сада је радила у КБЦ "Фируле" – Сплит, Гарнизонској амбуланти „Лора“, Дому здравља – Бусовача, Дому здравља – Пожега, ЦВМУ Мељине, РФЗЗО – филијала Београд, Специјалној болници за рехабилитацију кардиолошких болесника „Златар“ – Нова варош, ВМШСС „ Милутин Миланковић“ -Београд. Сада ради у ЦВМУ Београд.

Говори енглески језик. Удата, мајка двоје деце.

## 2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

**Наслов:** „Морфолошки и функционални аспекти срчане адаптације на тренинг и детренинг код пацова различитог пола”

**Предмет:** Утврђивање полних разлика у структури и кардиодинамским параметрима изолованог срца пацова након 8 недеља редовног аеробног тренинга, као и утврђивање постојање и брзине реверзибилности постигнутих срчаних адаптација након престанка тренинга.

**Хипотеза:** Редовно вежбање доводи до хипертрофије и побољшане контрактилности срца пацова оба пола, али да ће услед генетских и хормонских полних разлика срчана адаптација на тренинг и детренинг имати различит ток и обим.

## 2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио један рад у целини за штампу у рецензираном часопису категорије M52, у коме је први аутор, чиме је испуни услов за пријаву докторске тезе:

**Dragojlovic Ruzicic R, Jakovljevic V, Djordjevic D.** Oxidative stress in trainig, overtraining and detraining: from experimental to applied research. Ser J Exp Clin Res 2016; DOI: 10.1515/SJECR-2016-0002 (M52=1,5 бод)

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Редовна физичка активност носи са собом низ бенефита који се повезују са смањеним ризиком од кардиоваскуларних обољења. Редовно вежбање индукује хемодинамске промене и мења услове оптерећења срца, што доводи до низа позитивних промена у структури и функцији срца. Вежбање директно или индиректно позитивно утиче на физиологију срца, у смислу побољшања снабдевености кисеоником и контрактилности миокарда, како код опште популације, тако и код пацијената са кардиоваскуларним обољењима. Повећање кардиоваскуларног капацитета услед бављења спортом повезано је са нижом срчаном фреквенцијом у миру и при раду субмаксималног интензитета, повећањем масе и запремине комора, хипертрофијом миоцита, повећањем ударног волумена срца, итд.

С друге стране, детренинг представља парцијални или комплетни губитак тренингом изазваних анатомских и физиолошких адаптација, као последица редукације или престанка вежбања. Док су ефекти вежбања на функцију и димензије кардиомиоцита добро познати, ефекти детренинга на миокардијално ремоделовање још увек нису довољно истражени. Резултати малог броја постојећих студија нису једнолики, па се на основу њих не може направити ваљан закључак о обиму и динамици реверзибилних промена.

Одговор срца на физиолошки стимулус као што је вежбање пре свега зависи од фактора тренажног оптерећења у виду интензитета, трајања и учесталости вежбања. Обзиром на разлике у кардиофизиологији између полова у здрављу и болести, одговор срца на вежбање такође је зависан и од пола. Студије на глодарима су показале да су женке подложније већем хипертрофичном одговору на вежбање, као и да међу половима постоје разлике у сигналним путевима који доводе до хипертрофије срца. Свакако да су генетске и хормоналне разлике те које модификују срчану адаптацију и повећање кардиоваскуларног капацитета. На крају, иако знања о полним разликама у одговору кардиоваскуларног система на вежбање расту, ниједна студија се није бавила разликама у ефектима детренираности на промене у структури и функцији срца.

## **2.5. Значај и циљ истраживања**

### *Значај студије*

Молекуларни механизми за које се верује да су укључени у адаптацију срца на хроничну физичку активност укључују и смањену продукцију реактивних кисеоничних врста и повећање продукције азот монооксида. До сада, ниједна студија се није бавила анализом редокс статуса детренираних пацова. Стога је тема овог истраживања анализа морфолошких и функционалних аспеката срчане адаптације на тренинг и детренинг код пацова различитог пола, са посебним освртом на оксидативни стрес у коронарном ефлуенту изолованог срца пацова. Оксидативни стрес детектован у овом флуиду представља оксидативни стрес пореклом из ендокарда леве коморе, мада може потицати и из ендотела коронарних судова.

### *Циљ и хипотезе студије*

Главни циљ истраживања је да утврди полне разлике у структури и кардиодинамским параметрима изолованог срца пацова након 8 недеља редовног аеробног тренинга, као и да утврди постојање и брзину реверзибилности постигнутих срчаних адаптација након престанка тренинга. Од посебног интереса за ово истраживање је расветљавање улоге прооксидантних молекула у кардиодинамици тренираних и детренираних пацова оба пола.

Основна хипотеза студије је да ће редовно вежбање довести до хипертрофије и побољшане контрактилности срца пацова оба пола, али да ће услед генетских и хормонских полних разлика срчана адаптација на тренинг и детренинг имати различит ток и обим. Очекује се да промене кардиодинамских параметара буду у корелацији са параметрима оксидативног стреса у коронарном ефлуенту.

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Док су ефекти вежбања на структуру и функцију миокарда добро познати, анализи реверзибилности постигнутих срчаних адаптација након престанка тренинга није посвећена довољна научноистраживачка пажња. Такође, иако знања о механизмима срчане адаптације на повећани напор расту, још увек постоје значајне полне разлике које су недовољно објашњене. Стога је циљ истраживања је да утврди полне разлике у структури и кардиодинамским параметрима изолованог срца пацова након 8 недеља редовног аеробног тренинга, као и да утврди постојање и брзину реверзибилности постигнутих срчаних адаптација након престанка тренинга. Од посебног интереса за ово истраживање је расветљавање улоге прооксидантних молекула у кардиодинамици тренираних и детренираних пацова оба пола. Пацови оба пола биће подвргнути двомесечном тренингу пливања у специјално конструисаном базену за експерименталне животиње, а жртвовање ће се вршити након завршеног тренажног периода и две и четири недеље након престанка вежбања. Срце пацова биће изоловано и перфундовано методом ретроградне перфузије по Лангендорфу, а испитивање његове функције вршиће се праћењем кардиодинамских параметара леве коморе: максималне и минималне стопе промене притиска у левој комори, систолног и дијастолног притиска леве коморе, средње перфузионог притиска, фреквенције и коронарног протока. Такође ће бити праћени параметри оксидационог стреса (супероксид анјон радикал, водоник пероксид, нитрити, липидни пероксиди) који учествују у одржавању нормалне функције и структуре кардиоваскуларног система, а чији ниво продукције може бити знатно измењен услед акутног и хроничног вежбања. За сваки узорак, биће мерена дебљина зида леве коморе, као и попречна дебљина за десет појединачних кардиомиоцита, измерена на нивоу једра, из којих би се затим израчунавала просечна дебљина кардиомиоцита за сваки узорак. Такође, биће одређиван и степен експресије имунохистохемијских маркера у срчаном ткиву.

## 2.7. Методе истраживања

### 2.7.1. Врста студије

Студија је експерименталног карактера. Први део студије спроводи се на животињама *in vivo*, а други на материјалу анималног порекла *in vitro*.

### 2.7.2. Популација која се истражује

Планирано истраживање би обухватило 84 пацова (Вистар албино сој, мушки и женски пол, старости 8 недеља, телесне масе  $250 \pm 50$ g). Животиње се набављају из Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња (ВМА). Пацови ће бити смештени у кавезе у просторију у којој се температура одржава на 25 степени, са 12 сати

светлости дневно. Животиње ће конзумирати комерцијалну храну за пацове и воду *ad libitum*.

### 2.7.3. Узорковање

Пацови ће методом случајног избора, бити подељени у 4 групе: 1) контроле мушког пола, 2) контроле женског пола, 3) пливачи мушког пола, 4) пливачи жеског пола. Пливање представља доказано валидан начин апликације тренажног оптерећења ради изазивања физиолошке хипертрофије срца код пацова. Пацови из контролних група били би стављани у базен 5 пута недељно по 3 минута ради изазивања стреса који сама водена средина чини на пацове, док би пацови из експерименталних група током 8 недеља били подвргнути тренингу пливања (5 дана у недељи) у специјално конструисаном базену за експерименталне животиње. Прве недеље експеримента била би извршена адаптација на воду и тренинг, постепеним повећањем времена пливања од 5 до 15 минута. Потом би уследило 8 тренажних и 4 детренажне недеље.

**Табела 1.** Протокол по ком ће бити спроведено пливање у експерименталним групама.

Недеља експеримента	Фаза експеримента	Трајање тренинга	Тренажно оптерећење	Број тренинга дневно	Жртовање животиња
1	Адаптација	5-15min	-	1	Ж1
2	Тренинг 1	30min	2% ТМ	1	
3	Тренинг 2	45min	2% ТМ	1	
4	Тренинг 3	60min	2% ТМ	1	
5	Тренинг 4	60min	2% ТМ	1	
6	Тренинг 5	60min	2% ТМ	1	
7	Тренинг 6	60min	2% ТМ	1	
8	Тренинг 7	60min	2% ТМ	1	
9	Тренинг 8	60min	2% ТМ	1	Ж2
10	Детренинг 1	-		-	
11	Детренинг 2	-		-	Ж2
12	Детренинг 3	-		-	

13	Детренинг 4	-		-	Ж2
----	-------------	---	--	---	----

Жртвовање пацова (по 6 животиња из сваке групе) било би вршено у 4 фазе експеримента: на самом почетку, након 8 недеља тренинга, након 2 недеље без тренинга и након 4 недеље без тренинга. Ефекти тренинга и детренинга биће евалуирани праћењем кардиодинамских параметара изолованог срца, евалуације морфолошких карактеристика срца, као и параметара оксидативног стреса у коронарном венском ефлуенту.

#### 2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Срце жртвованих пацова биће измерено, а затим изоловано и перфундовано методом ретроградне перфузије по Лангендорфу (Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary), при растућем коронарном перфузионом притиску од 40 до 120 cmH<sub>2</sub>O.

Вредност коронарног протока биће одређивана флоуметријски. Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле омогућило би се убацивање сензора (transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary) у леву комору ради директног и континуираног праћења параметара функције леве коморе:

- а) dp/dt max - максимална стопа промене притиска у левој комори,
- б) dp/dt min - минимална стопа промене притиска у левој комори,
- в) SLVP - систолни притисак леве коморе,
- г) DLVP - дијастолни притисак леве коморе,
- ђ) MBP - средњи перфузиони притисак,
- е) HR - срчана фреквенца.

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента спектрофотометријски ће се одређивати следећи параметри оксидационог стреса, према претходно описаним методама (12): индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), супероксид анјон радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) и водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Потом ће срца пацова бити подвргнута хистолошкој анализи. У рутинској обради препарата, добијени узорци биће фиксирани у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина, у току 24h, на собној температури. По завршеној фиксацији, узорци ткива биће дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калуљени у парапласту. Попречни серијски пресеци,

дебљине 5  $\mu\text{m}$ , биће сечени микротомом *Leica SM 2000R*. Након депарафинисања у ксилолу и хидратације у опадајућем реду алкохола, исечци ће бити бојени *Haematoxylin*-ом по *Mayer*-у, просветљавани у 2% раствору еозина, затим дехидратисани, просветљивани и монтирани на плочице са *Canada* балзамом према стандардном протоколу (13). Узорци ће бити анализирани на светлосном микроскопу на великом увећању (имерзији). За сваки узорак, биће мерена дебљина зида леве коморе, као и попречна дебљина за десет појединачних кардиомиоцита, измерена на нивоу једра, из којих би се затим израчунавала просечна дебљина кардиомиоцита за сваки узорак (14).

За имунохистохемијско бојење ткива, резови дебљине 5  $\mu\text{m}$ , биће монтирани на посебне високо адхерентне плочице *SuperFrost* и сушени на температури од 56°C у току 1 сата. Након депарафинизације и рехидрације ткивних пресека вршиће се демаскирање антигена у микроталасној пећници у 0,1 М цитратном пуферу, рН 6,0 на 800W, у трајању 21 минут, а затим блокирање ендogene пероксидазе, 3 %-тним воденим раствором  $\text{H}_2\text{O}_2$  у трајању од 15 минута. Након блокирања ендogene пероксидазе, уследиће наношење примарног антитела и инкубација у трајању од 1h на собној температури у влажној комори. Примениће се 2 примарна антитела: МНС (engl. myosin heavy chain – МНС) за тип 1 контрактилних филамената и МНС за тип 2 контрактилних филамената (15). Степен експресије имунохистохемијских маркера одређиваће се семиквантитативно, методом двоструке контроле, под великим увећањем, на шест видних поља на сваком пресеку. Процент имунореактивних ћелија у популацији глатких мишићних ћелија биће означаван на следећи начин:

- 0 – изостанак имунореактивности
- + до 35% имунореактивних ћелија
- ++ до 70% имунореактивних ћелија
- +++ до 100% имунореактивних ћелија

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.

### **2.7.5. Снага студије и величина узорка**

Прорачун величине узорка је заснован на резултатима претходно публикованог релевантног истраживања, у ком су аутори испитивали вентрикуларно ремоделирање и ехокардиографске параметре након детренинга пацова. За прорачун је коришћен т-тест за две независне групе, уз претпоставку алфа грешке од 0.05 и снаге студије 0.8 (бета грешка 0.2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (*G\*Power 3*). Узимањем у обзир резултате ове студије укупан број експерименталних животиња је прорачунат на по 5 животиња у групи. Узимајући у обзир да ће у овој студији постојати 14 подгрупа које ће у различито време бити жртвоване, најмањи укупан број животиња требало би да буде 70

(14 x 5). Узимајући у обзир и могућност искључења појединих експерименталних животиња из завршне анализе, укупан број потребних животиња одређен је на најмање 84 пацова.

### **2.7.6. 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: *t*-тест или Mann Whitney тест, упарени *t*-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 тест линеарне корелације.

### **2.8. Очекивани резултати докторске дисертације**

Значај овог истраживања лежи у утврђивању полних разлика у срчаним адаптацијама не само на тренинг, већ и на детренинг. Од посебног значаја је и расветљавање улоге прооксидантних молекула у кардиодинамици тренираних и детренираних пацова, као и зависност ових параметара од полних карактеристика пацова. Очекивани резултати студије подразумевају вежбањем изазвану хипертрофију и побољшану контрактилност срца пацова оба пола, као и губитак ових пожељних адаптација након престанка редовног вежбања. Такође се очекује да промене кардиодинамских параметара буду у корелацији са параметрима оксидативног стреса у коронарном ефлуенту. На крају, очекује се да ће, услед генетских и хормонских полних разлика, срчана адаптација на тренинг и детренинг имати различит ток и обим код пацова женског и мушког пола.

### **2.9. Оквирни садржај дисертације**

Док су ефекти вежбања на структуру и функцију миокарда добро познати, анализи реверзибилности постигнутих срчаних адаптација након престанка тренинга није посвећена довољна научноистраживачка пажња. Такође, иако знања о механизмима срчане адаптације на повећани напор расту, још увек постоје значајне полне разлике које су недовољно објашњене. Стога је циљ истраживања је да утврди полне разлике у структури и кардиодинамским параметрима изолованог срца пацова након 8 недеља редовног аеробног тренинга, као и да утврди постојање и брзину реверзибилности постигнутих срчаних адаптација након престанка тренинга. Од посебног интереса за ово истраживање је расветљавање улоге прооксидантних молекула у кардиодинамици тренираних и детренираних пацова оба пола.

### 3. Предлог ментора

За ментора се предлаже **Доц. др Душица Ђорђевић**, доцент Факултета медицинских наука за ужу научну област Методологија антропологије. 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, Srejevic 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 Mar 14;65(1):81-90.
2. Stojanovic Tomic JT, Jakovljevic VLj, Zivkovic VV, Srejevic 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 Jul;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 Nov;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 Jun;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. **Проф. др Дејан Јеремић**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Анатомија,

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 Радице Драгојловић Ружичић, 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 утврди полне разлике у структури и кардиодинамским параметрима изолованог срца пацова након 8 недеља редовног аеробног тренинга, као и да утврди постојање и брзину реверзибилности постигнутих срчаних адаптација након престанка тренинга.

3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Радице Драгојловић Ружичић бити од великог научног и практичног значаја у смислу утицаја физичког вежбања на кардиоваскуларни систем.

4. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Радице Драгојловић Ружичић под називом „**Морфолошки и функционални аспекти срчане адаптације на тренинг и детренинг код пацова различитог пола**” и одобри њену израду.

### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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

---

**Проф. др Дејан Јеремић**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Анатомија

---

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

---

Крагујевац, 22. 08. 2016.