

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

1. Одлука Наставно – научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука у Крагујевцу, одржаној дана 30.09.2015. године, одлуком бр. 01-9476/3-37 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „**Утицај L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца у условима акутне прекомерне физичке активности**“ кандидата мр **Марије Бурсаћ Митровић**, у следећем саставу:

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

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију мр сц. Марије Бурсаћ Митровић и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

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 аутоаоксидног система. Оксидативни стрес индукован физичком активношћу доводи до усходне регулације антиоксидантног система, обезбеђујући заштиту организма од слободних радикала током понављаних физичких активности, као и када организам мирује, а изложен је повећаној производњи и атаку ових једињења. На овај начин физиолошки капацитет тела ће се проширити или адаптирати, што ће на крају водити унапређењу здравља и/или позитивних биолошких исхода.

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 болести. Примарна производња слободних радикала, као одговор на прекомерну физичку активност, може се одиграти на неколико начина (митохондријска респирација, метаболизам еикосаноида, аутооксидација катехоламина и оксидазне ензимске активности). Секундарна продукција слободних радикала (у току акутне прекомерне физичке активности као и следствени одмор) последица је поремећаја хомеостазе калцијума и/или деструкције протеина који садрже гвожђе. Синтеза слободних радикала 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 синтеза ових молекула индукована физичком активношћу, са последичним оксидативним оштећењем, неопходан или штетан стимулус за физиолошке функције. Имајући у виду да прооксидантни и антиоксидантни систем функционишу на врло комплексан начин конкретни закључци како и зашто се слободни радикали 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 слободним радикалима и акутном физичком активношћу остају отворена за даља истраживања.

У неким досадашњим истраживањима на заморчићима који су излагани интензивном физичком оптерећењу методом пливања (*swimming* тест) 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.

Предмет ове студије је било истраживање утицаја L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца у условима акутне прекомерне физичке активности. Испитани су бројни параметари који указују на оксидантни систем експерименталних замораца (*guinea pigs*) пре и након излагања прекомерној физичкој активности. У оквиру овога, одређени су параметари оксидационог стреса као што су интензитет липидне пероксидације (LPx) и активност ензима ксантин-оксидазе (XOD) у серуму, јетри, скелетном мишићу и срцу.

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Прегледом литературе прикупљене детаљним и систематским претраживањем биомедицинских база података „*Pubmed*“, „*Scopus*“, „*SCIndeks*“ и „*Google Scholar*“ помоћу основних кључних речи „*L-ascorbic acid*“, „*alpha tocopherol*“, „*free radicals*“, „*reactive oxygen species*“, „*reactive nitrogen species*“, „*antioxidants*“, „*antioxidant enzymes*“, „*biomarkers of oxidative damage*“, „*oxidative stress biomarkers*“, „*lipid peroxidation*“, „*Guinea pigs*“, „*acute exercise*“, „*exercise-induced oxidative stress*“ као и помоћних „*antioxidant supplementation*“, „*skeletal muscle*“ и „*oxidative*“, не наилази се на студије сличног дизајна и методолошког приступа. Постоје ретке публиковане студије које су испитивале утицај других антиоксидантних супстанци (коензим Q10, аскорбинска киселина, токоферол) на оксидантни статус у индукованим стресним стањима на експерименталним моделима (пацовима) који синтетишу витамине.

У овако дизајнираним студијама резултати интерферирају са ендогеном синтезом те се не може одвојити ефекат апликованих витамина од ефекта ендогено синтетисаних витамина (који у стресу могу повећати активност у односу на базалне вредности). Имајући у виду чињеницу да заморци не синтетишу витамин С и витамин Е (што је случај и код људи) резултати добијени овом студијом представљају новину у овој сфери истраживања. На основу тога, Комисија константује да докторска дисертација кандидата мр сц. Марије Бурсаћ Митровић, „Утицај **L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца у условима акутне прекомерне физичке активности**“ представља резултат оригиналног научног рада које је имало за циљ да развије нов приступ изучавању поремећаја редокс равнотеже проузроковане прекомерном физичком активношћу.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

Мр сци. Марија Бурсаћ Митровић је рођена 23.03.1964. године 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.*)”, одбранила је на Универзитету у Новом Саду 10.07.1998. године, а магистарски рад под насловом “Биохемијска и фармаколошка истраживања екстракта першуна (*Petroselinum crispum L.*) и целера (*Apium graveolens L.*)” одбранила је на Универзитету у Новом Саду 14.10.2006. године. Дипломирани је биолог на Институту за фармакологију и токсикологију Медицинског факултета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици.

Б) Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

Мр сц. Марија Бурсаћ Митровић је сада објавила седам научних радова у целини у међународним часописима на СЦИ листи, од чега је у једном први аутор из теме докторске дисертације. Тиме је мр сц. Марија Бурсаћ Митровић испунила услов за одбрану докторске дисертације.

1. **Bursać-Mitrović M.**, Milovanović DR, Mitić R, Jovanović D, Sovrlić M, Vasiljević P, Tomović J, Manojlović N. Effects of l-ascorbic acid and alpha-tocopherol on biochemical parameters of swimming-induced oxidative stress in serum of guinea pigs. Afr J Tradit Complement Altern Med 2016; 13(4). **M23, 3 бода**
2. Popović M, Kaurinović B, Jakovljević V, Mimica-Dukić N, **Bursać M.** Effect of parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex AW Hill, Apiaceae) extracts on some biochemical parameters of oxidative stress in mice treated with CCl₄. Phytotherapy Research 2007; 21(8):717-723. **M23, 3 бода.**
3. Popović M, Kaurinović B, Trivić S, Mimica-Dukić N, **Bursać M.** Effect of celery (*Apium graveolens*) extracts on some biochemical parameters of oxidative stress in mice treated with carbon tetrachloride. Phytotherapy Research 2006; 20(7): 531-537. **M23, 3 бода.**
4. **Bursać M.**, Popović M, Mitić R, Jakovljević V, Kaurinović B. Antipyretic effect of celery (*Apium graveolens*) extracts in mice. Pharmaceutical Biology 2006; 44(8): 581-584. **M23, 3 бода.**

5. **Bursać M**, Popović M, Mitić R, Kaurinović B, Jakovljević V. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) and celery (*Apium graveolens*) extracts on induction and sleeping time at mice. *Pharmaceutical Biology* 2005; 43(9):780-783. **M23, 3 бода.**
6. Jakovljević V, Rašković A, Popović M, Sabo J, **Bursać M**. The effect methoxalene on hypnotic and subhypnotic doses of pentobarbital. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2002; 27(3): 149-151. **M23, 3 бода.**
7. Popović M, Jakovljević V, **Bursać M**, Mitić R, Rašković A, Kaurinović B. Biochemical investigation of yarrow extracts (*Achillea millefolium* L.). *Oxidation Communications* 2002; 25(3): 469-475. **M23, 3 бода.**

2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације и спроведеног истраживања се поклапају. Циљеви истраживања и методологија су идентични са одобреним у пријави тезе.

Докторска дисертација мр сц. Марије Бурсаћ Митровић, написана је на 182 странице и садржи следећа поглавља: увод, циљеве и хипотезе, материјал и методе, резултате, дискусију, закључке и литературу. Дисертација садржи 98 табеле и 98 графикана као 16 илустрација у уводном поглављу, а поглавље литература садржи 540 цитираних библиографских јединица.

У поглављу „Увод“, аутор јасно, прецизно и свеобухватно износи досадашња сазнања и указује на актуелну проблематику из предметне области. Основна подпоглавља су оксидативни стрес, стварање слободних кисеоничних радикала, антиоксидативна заштита (ензимски механизми антиоксидативне заштите [супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GSH-Px), глутатион-редуктаза (GR), глутатион S-трансферазе (GST)], неензимски механизми антиоксидативне заштите (глутатион, витамин Е, витамин С), физиологија физичке активности, физичка активност и оксидативни стрес, физичка активност и антиоксидантна заштита.

У поглавље „Циљеви и хипотезе“ дате су основне хипотезе студије према којима је претпостављено да прекомерна физичка активност (због повећане потребе за кисеоником) може да буде узрок оксидативног стреса са следственим механизмима оштећења биолошких мембрана, т.ј. активирања процеса липидне пероксидације, као и да повећање количине створених кисеоничних слободних радикала у току и након прекомерне физичке активности представља неопходан сигнал за усходну регулацију ендогеног антиоксидантног система (ензимског и неензимског). Такође, додатна хипотеза је била да се применом егзогених антиоксиданаса овај одговор може модификовати. Главни циљеви истраживања су били да се испита: прооксидантни систем експерименталних замораца (*guinea pigs*) пре и након излагања прекомерне физичке активности, ендогени антиоксидантни статус експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности, утицај L-аскорбинске киселине на статус прооксидантног и ендогеног антиоксидантног система експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности, утицај алфа-токоферола на статус прооксидантног и ендогеног антиоксидантног система експерименталних замораца пре и након излагања прекомерној физичкој активности, утицај комбинације L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола на понашање прооксидантног и ендогеног антиоксидантног система експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности и анализа сврсисходности адјувантне улоге L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола у њиховој примени у прекомерној физичкој активности.

Материјал и методе рада у докторској дисертацији су подударни са наведеним у пријави дисертације и приказани су на одговарајући начин и веома прецизно. Дисертација представља експерименталну студију која је спроведена на заморчићима (*guinea pigs*) ($n=40$), оба пола, просечне телесне масе $450 \text{ g} \pm 50 \text{ g}$, који раније нису били ничим третирани. Услови амбијента и исхране били су у складу са важећим етичким и научним принципима чувања и употребе експерименталних животиња.

Протокол истраживања је одобрен од стране Етичког одбора Медицинског факултета Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици. За изучавање акутног оксидативног стреса експерименталне животиње су методом случајног избора сврстане у 8 група од по 5 животиња: 1) контролна група, 2) група која је добила 20 mg/kg L-аскорбинске киселине (витамин С) интраперитонеално (i.p.), без излагања тесту физичког оптерећења, 3) група која је добила 25 mg/kg алфа-токоферола (витамина Е) интраперитонеално (i.p.), без излагања тесту физичког оптерећења, 4) група која је добила комбинацију 20 mg/kg L-аскорбинске киселине и 25 mg/kg алфа-токоферола i.p., без излагања тесту физичког оптерећења, 5) експериментална група која је била изложена тесту прекомерне физичке активности методом пливања до исцрпљености, 6) експериментална група која је била изложена тесту физичког оптерећења и суплементацији L-аскорбинском киселином, 7) седма експериментална група која је била изложена тесту физичког оптерећења и суплементацији алфа-токоферолом и 8) експериментална група која је била изложена тесту физичког оптерећења и суплементацији комбинације L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола. Тест оптерећења спровођен је методом пливања до исцрпљености. Одређивање оксидантних маркера извршено је у четири компартмана (крв, јетра, скелетни мишић и срчани мишић). У статистичкој обради резултата коришћене су дескриптивне статистичке варијабле и адекватни статистички тестови.

Резултати истраживања систематично су приказани и добро документовани укључујући и приказе путем значајног броја релевантних и прегледних табела и слика (графикона). Текст је систематизован у складу са постављеним циљевима истраживања на следећи начин: утицај прекомерне физичке активности на оксидантни и ендогени антиоксидантни систем замораца; утицај витамина С, витамина Е и комбинације витамина С и витамина Е на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца; утицај витамина С, витамина Е и комбинације витамина С и витамина Е на оксидантни и антиоксидантни систем у серуму, јетри, склетном мишићу и срцу експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности; упоредни ефекти L-аскорбинске киселине, алфа-токоферола и комбинације L-аскорбинске киселине, алфа-токоферола на оксидантни и антиоксидантни систем у серуму, јетри, склетном мишићу и срцу експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности, као и упоредни ефекти L-аскорбинске киселине, алфа-токоферола и комбинације L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола на промене биохемијских варијабли у серуму, јетри, склетном мишићу и срцу експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности). Табеле и графикони су концизни и јасно приказују измерене вредности које су неопходне за исправно описивање и тумачење добијених резултата.

У поглављу „Дискусија“ тумачени су сопствени добијени резултати у светлу досадашњих сазнања и нових чињеница изложених у самој докторској дисертацији. У сегментима где су постојала слична истраживања из ове области извршена је одговарајућа и детаљна компарација постигнутих дејстава примењених антиоксиданаса у индукованим стресним стањима на датим експерименталним моделима. Коментари добијених резултата су јасни, логично разматрани кроз аналитичко-синтетички приступ

што текст дискусије чини прегледним и разумљивим. Јасна критичка анализа презентованих чињеница је такође одлика овог поглавља докторске дисертације.

Литература је потпуно адекватна по обиму и садржини. Наведене су најзначајније студије у овој области, у међународним оквирима, како оригинални радови тако и прегледни чланци укључујући и најновије референце.

На основу претходно изнетих чињеница Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидата мр сц. Марије Бурсаћ Митровић под називом „**Утицај L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца у условима акутне прекомерне физичке активности**“ представља резултат оригиналног истраживања у области оксидационог стреса и система антиоксидационе заштите у току прекомерне физичке активности. По начину, обиму и квалитету израде студија у потпуности одговарао пријављеној и одобреној теми.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања су садржани у следећим закључцима:

1. Прекомерна физичка активност доводи до промене параметара оксидационог стреса [интензитет липидне пероксидације (LРх), активност ксантинооксидазе (XOD)] у серуму, јетри, скелетном мишићу и срцу експерименталних замораца.
2. Прекомерна физичка активност доводи до промене параметара ендогеног антиоксидантног система [активност целокупног антиоксидантног система (TAS), концентрација глутатиона (GSH) и активност каталазе (CAT)] у серуму, јетри, скелетном мишићу и срцу експерименталних замораца.
3. L-аскорбинска киселина доводи до промене параметара оксидационог система у крви, јетри, скелетним мишићима и срцу експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности.
4. L-аскорбинска киселина доводи до промене параметара антиоксидантног система у крви, јетри, скелетним мишићима и срцу експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности.
5. Алфа-токоферол доводи до промене параметара оксидационог система у крви, јетри, скелетним мишићима и срцу експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности.
6. Алфа-токоферол доводи до промене параметара антиоксидантног система у крви, јетри, скелетним мишићима и срцу експерименталних замораца пре и након излагања прекомерној физичкој активности.
7. Комбинација L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола доводи до промене параметара оксидационог система у крви, јетри, скелетним мишићима и срцу експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности.
8. Комбинација L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола доводи до промене параметара антиоксидантног система у крви, јетри, скелетним мишићима и срцу експерименталних замораца пре и након излагања прекомерне физичке активности.
9. L-аскорбинска киселина, алфа-токоферол и њихова комбинација имају протективну улогу у ублажавању последица изазваних прекомерном продукцијом слободних радикала (као што су повећан интензитет липидне пероксидације и повећана активност ксантин-оксидазе), при чему алфа-

токоферол има бољи ефекат у односу на L-аскорбинску киселину, а ефекат њихове комбинације је већи у односу на појединачни ефекат што указује на њихово синергистичко дејство.

10. L-аскорбинска киселина дата појединачно има изразит ефекат на целокупни антиоксидантни систем (TAS) у скелетним мишићима а у комбинацији са алфа-токоферолом најизраженији позитиван ефекат на TAS остварује се у срцу.
11. Постоји позитиван ефекат L-аскорбинске киселине на синтезу GSH у скелетном мишићу, алфа-токоферола на синтезу GSH у серуму и њихове комбинације на синтезу GSH у јетри и срцу.
12. Постоји позитиван ефекат L-аскорбинске киселине на синтезу CAT у скелетном мишићу и комбинације L-аскорбинске киселине и токоферола на синтезу CAT крви и срцу.
13. Најбоље дејство L-аскорбинске киселине испољава на време издржљивости у акутној прекомерној физичкој активности (пливању) експерименталних замораца.

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

Докторска дисертација кандидата мр сц. Марије Бурсаћ Митровић под називом „Утицај L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца у условима акутне прекомерне физичке активности“ је пружила детаљна сазнања о утицају L-аскорбинске киселине (витамина C) и алфа-токоферола (витамина E) на прооксидантни и антиоксидантни систем код свих експерименталних јединки који су имали били подвргнути прекомерној физичкој активности. Тиме је створена добра теоријска основа за планирање и извођење добро дизајнираних клиничких истраживања у овој области. Уколико би се у њима сазнања презентована у овој дисертацији и потврдила то би било од посебног значаја за професионалне спортисте, раднике који су изложени тешком физичком раду и свих других особа код који је физичка активност важан чинилац оптималног живљења. Поред тога, таква сазнања би била и од потенцијалне користи за болеснике оболеле од оних болести код којих дозирања физичка активност представља један од могућих коректива већ насталих морфо-функционалних оштећења.

Резултати ове докторске дисертације су, дакле, од великог научног и практичног значаја у спознаји стварне промене редокс равнотеже индукованих прекомерним физичким оптерећењем, као и потенцијалног протективног дејства егзогених антиоксиданата унутар организма сисара. Теоријски и практични приступ и дизајн истраживања поремећаја редокс равнотеже проузроковане прекомерном физичком активношћу је у овој дисертацији нов и представља основу за планирање даљих, циљаних истраживања у овој области.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Сви резултати добијени током израде докторске дисертације биће презентовани у форми оригиналних научних радова у часописима од међународног значаја.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске кандидата **мр сц. Марије Бурсаћ Митровић** под називом „Утицај L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца у условима акутне прекомерне физичке активности“ на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру тезе засновано на савременим сазнањима и прецизној методологији и да је спроведено на одговарајући, јасан и прецизан начин. Добијени резултати су прегледни, јасни, добро продискутивани и дају значајан допринос проучавању ефеката L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола на оксидантни и антиоксидантни систем биолошких система који се излажу прекомерној физичкој активности.

Комисија сматра да ова докторска дисертација, кандидата кандидата **мр сц. Марије Бурсаћ Митровић**, урађена под менторством **проф. др Недељка Манојловића**, представља оригинални научни допринос и од великог је научног и практичног значаја у бољем разумевању промена редокс равнотеже индукованих прекомерним физичким оптерећењем, као и потенцијалног протективног дејства егзогенних антиоксиданата.

На основу свега изложеног Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати завршену докторску дисертације кандидата **мр сц. Марије Бурсаћ Митровић** под називом „Утицај L-аскорбинске киселине и алфа-токоферола на прооксидантни и антиоксидантни систем замораца у условима акутне прекомерне физичке активности“ и одобри њену јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

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

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

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

У Крагујевцу, 13.04.2016. године