

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16-BP, imenovana je komisija za ocenu završne doktorske disertacije pod naslovom:

**“Uticaj utreniranosti i polimorfizama u genima za glukokortikoidni,
mineralokortikoidni i adrenokortikotropni receptor na fiziološku adaptaciju
hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne osovine na hronično ponavljani fizički stres”**

kandidatkinje dr Bojane Popović, zaposlene u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Mentor je Prof. dr Svetozar Damjanović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Milan Petakov, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Miloš Žarković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Milica Medić-Stojanoska, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske dokumentacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Bojane Popović napisana je na ukupno 130 strana i podeljena na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 35 tabela i 49 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** su date savremene definicije stresa, pregled terminologije korišćene u biomedicinskim istraživanjima različitih vrsta stresa, kao i podela načina adaptacije. Definisane su poznate specifičnosti fizičkog stresa vežbanja u odnosu na mnogo ispitivanja

psihosocijalne stresore. Dat je shematizovan prikaz načina aktivacije stresnog neuroendokrinog odgovora, sa fokusom na aktivaciju hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne osovine (HHN) i simpatičkog nervnog sistema. Prikazani su različiti modulatori funkcije HHN osovine u stresu, putevi međusobne komunikacije neurona centralnog nervnog sistema i HHN osovine, kao i specifični receptori preko kojih hormoni HHN osovine ostvaruju svoja dejstva. Napravljena je paralela između glukokortikoidnog (GR) i mineralokortikoidnog receptora (MR) kao efektornih receptora za glukokortikoide, a prvenstveno u smislu distribucije, afiniteta i uloge u stresnom odgovoru. Posebna pažnja je posvećena specifičnostima stresa tokom fizičkog vežbanja, tj. bavljenja sportom. Opisani su načini adaptacije HHN osovine na ponavljani stres, sa posebnim fokusom na dosadašnja znanja i shvatanja adaptacije na ponavljani fizički stres vežbanja. Pojedinačno su prikazani GR, MR i melanokortinski receptor tipa 2 – MC2R (efektni receptor adrenokortikotropnog hormona – ACTH), uz prikaz dosadašnjih znanja o uticajima specifičnih polimorfizama u ovim receptorima na modulaciju metabolizma i stresnog odgovora.

Ciljevi rada su precizno definisani i podrazumevaju ispitivanje razlike u načinu odgovora hormona HHN osovine na akutni fizički stres u zavisnosti od utreniranosti, kao i u zavisnosti od postojanja specifičnih polimorfizama u genima za GR, MR i MC2R. Takođe, analiziran je uticaj profesionalnog bavljenja sportom na fazna pomeranja normalnog cirkadijalnog ritma aktivnosti HHN osovine, kao i efekat na osetljivost HHN osovine na supresiju.

U poglavlju **metodologija** je navedeno da je studija sprovedena u Kliničkom centru Srbije, u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma i Klinici za kardiologiju. Svi ispitanici su dali pismeni pristanak za učestvovanje u studiji. Sve procedure su sprovedene u skladu sa etičkim preporukama sadržanim u Helsinškoj deklaraciji. Za sprovođenje studije su dobijena odobrenja Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Kolegijuma Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma i Kolegijuma Klinike za kardiologiju Kliničkog centra Srbije, kao i Antidoping agencije Republike Srbije (ADAS) uz prećenje testiranja od strane ove agencije, a s obzirom da je za potrebe studijskog protokola korišćen 1 mg deksametazona. Detaljno su opisane sve grupe ispitanika (studijska grupa 3 vrste profesionalnih sportista (vaterpolisti, odbojkaši i rvači) i dve kontrolne grupe (kontrolne neizložene stresu – KN i kontrolne aktuelno izložene psihičkom stresu – KS). Opisan je studijski protokol koji se sastoji iz 3 dela: 1) baznih analiza u jutarnjim časovima, 2) ergospirometrijskog testa, kao testa fizičkog opterećenja, sa uzorkovanjem hormona HHN osovine (kortizola i ACTH) u mirovanju (M), na početku testa (P), u trenutku maksimalnog

opterećenja (MAX) i u 3. minutu oporavka, 3) određivanja kortizola nakon prekonocne deksametazonske supresije sa 1 mg deksametazona. Opisana je metodologija analize vrednosti kortizola i ACTH, kao i metodologija genetičke analize polimorfizama u genima za GR, MR i MC2R. Detaljno su opisane metode korišćene u statističkoj obradi podataka.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i grafički jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 269 referenci.

B) Kratak opis dobijenih rezultata

Sportisti se međusobno nisu značajno razlikovali u pojedinačnim vrednostima kortizola tokom ergospirometrije osim u mirovanju, međutim nije bilo razlike u načinu promene kortizola tokom ergospirometrijskog testa. U poređenju sa kontrolama neizloženim stresu (KN), sportisti su imali značajno više vrednosti kortizola u mirovanju, što ukazuje na fazno pomeranje u normalnom dnevnom ritmu sekrecije kortizola s obzirom da je testiranje sprovedeno u periodu dana kada sportisti uobičajeno treniraju. Međutim, sportisti su u odnosu na KN imali atenuisani odgovor tokom testa, sa izraženijim padom vrednosti u oporavku, što je dovelo do gubitka razlike u pojedinačnim vrednostima kortizola tokom oporavka. Nasuprot KN, kontrole izložene psihičkom stresu (KS) su imale više vrednosti kortizola u odnosu na sportista i u mirovanju i na početku testa, ali su KS imale atenuisaniji odgovor od sportista tokom opterećenja.

Iako su odbojkaši u odnosu na druge dve grupe sportista imali značajno više vrednosti ACTH tokom mirovanja i na početku testa, nije bilo značajne razlike u načinu odgovora ACTH tokom testa kod ove tri grupe sportista. Nasuprot promene kortizola, vrednosti ACTH su u oporavku nastavile da rastu. Takođe, nasuprot razlikama u vrednostima kortizola, sportisti i KN se međusobno nisu razlikovali ni u pojedinačnim vrednostima ACTH, niti u načinu promene ACTH tokom testa. U grupi KS je razlika u vrednostima ACTH u odnosu na sportiste pratila razliku u vrednostima kortizola (više vrednosti ACTH u mirovanju i na početku testa, a atenuisan odgovor u opterećenju). Kontrole izložene psihičkom stresu su u

odnosu na sportiste imale i značajno više vrednosti jutarnjeg kortizola, pri čemu nije bilo značajne razlike u vrednostima ACTH, što govori u prilog razlike u osetljivosti HHN osovine. Međutim, nije bilo razlike u vrednostima kortizola nakon supresije sa 1 mg deksametazona.

Analizirana je i prikazana zastupljenost sledećih polimorfizama: 1) u genu za GR: *BclI*, N363S i A3669G, 2) u genu za MR: -2G/C i I180V, 3) u genu za MC2R: polimorfizam CTC→CCC u promotorskom regionu. Distribucije pojedinačnih alela svih analiziranih polimorfizama su bile u skladu sa Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

Postojanje *BclI* polimorfizma je kod sportista uticalo na atenuaciju odgovora kortizola, sa dostignutim značajno nižim vrednostima u maksimalnom opterećenju, pri čemu je ovakav atenuisani odgovor bio najizraženiji kod vaterpolista. Nasuprot sportistima, *BclI* polimorfizam nije uticao na odgovor kortizola u obe grupe kontrola (KN i KS). Nije bilo uticaja ni na odgovor ACTH, izuzev u grupi KS gde su nosioci polimorfizma, sa značajno višim vrednostima u mirovanju, imali značajno manji odgovor u opterećenju.

Sportisti nosioci N363S polimorfizma su imali značajan porast vrednosti kortizola tokom trominutnog oporavka, pri čemu je ova razlika ponovo bila najznačajnija kod vaterpolista. Kod ove grupe su vrednosti ACTH bile više u svim tačkama merenja, ali način odgovora ACTH se nije razlikovao. U grupi KN, N363S polimorfizam nije uticao na odgovor ni kortizola ni ACTH, a u grupi KS nije ni analiziran zbog malog broja ispitanika sa polimorfizmom.

Polimorfizmi A3669G, -2G/C i I180V su analizirani samo kod odbojkaša i KN. Postojanje A3669G polimorfizma nije imalo uticaja na hormone HHN osovine ni kod odbojkaša ni kod KN, mada su odbojkaši nosioci polimorfizma imali niže vrednosti kortizola, uz izraženiji pad vrednosti tokom oporavka, koji je bio na granici statističke značajnosti.

Odbojkaši heterozigotni nosioci -2G/C polimorfizma imali su značajno više vrednosti kortizola na početku testa, tj. naglašeniji skok vrednosti u anticipaciji stresa. Nije bilo uticaja na odgovor kortizola u grupi KS, kao ni na odgovor ACTH u obe grupe. Slično, ni I180V polimorfizam nije uticao na odgovor kortizola i ACTH u obe grupe, kao ni CTC→CCC polimorfizam u celokupnoj grupi sportista (nije analiziran u grupama KS i KN zbog malog broja ispitanika sa polimorfizmom).

Postojanje analiziranih polimorfizama nije uticalo na razliku u jutarnjim vrednostima kortizola i ACTH kada su analizirani odbojkaši i KS pojedinačno, ali su u grupama nosilaca

BclII, A3669G i -2G/C polimorfizama odbojkaši imali značajno niže vrednosti jutarnjeg kortizola u odnosu na KS; razlika nije uočena kada je analiziran ACTH. Takođe, nije bilo razlike u stepenu supresije kortizola u obe grupe, posmatrajući sve analizirane polimorfizme.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Naši rezultati su potvrdili prethodnu tezu da izloženost fizičkom stresu koji je dovoljno velikog intenziteta ili dovoljne dužine trajanja, uspešno aktivira HHN osovinu kod svih osoba, nezavisno od nivoa utreniranosti. Međutim, sportisti su se u odnosu na kontrolne ispitanike razlikovali i u baznim vrednostima hormona HHN osovine i načinu odgovora ovih hormona na akutni stres. Takođe, izloženost psihičkom stresu kod osoba koje su sedentarne, značajno je uticala na odgovor HHN osovine na fizički stres.

Pokazali smo da sportisti različitih sportskih disciplina slično odgovaraju a akutni fizički stres, pod uslovom da su testirani pod sličnim okolnostima (isti period u sportskoj sezoni i isto doba dana kada je sproveden test). U dostupnoj literaturi nismo pronašli studije koje su međusobno poredile odgovor HHN osovine kod različitih vrsta sportista, ali uvidom u dostupno, kao i u naše rezultate, mišljenja smo da je u svakoj studiji neophodno precizno definisati uslove pod kojima se sprovodi testiranje sportista, a zatim je potrebno rezultate tumačiti u kontekstu ovih uslova.

Registrovane više bazne vrednosti kortizola (pred test) kod sportista u odnosu na sedentarne ispitanike neizložene stresu su u skladu sa studijama koje su registrovale više vrednosti kod sportista u sezoni takmičenja (pred nastupe), kao i u svim periodima intenzivnih treninga koji predstavljaju stanja hroničnog energetskeg deficita. Nismo pronašli studije koje su poredile razliku u akutnom odgovoru na fizički stres između sportista i osoba izloženih psihičkom stresu.

Održavanje viših vrednosti kortizola tokom opterećenja kod sportista u odnosu na KN je u skladu sa prethodno pokazanim odgovorom dobro adaptiranih i pripremljenih profesionalnih sportista. Naglašeniji odgovor KN u odnosu na sportiste je u skladu sa pretpostavkom da potreban biološki efekat kortizola diktira reaktivnost HHN osovine na akutni stres. Takođe, ovakav odnos bi se mogao objasniti opservacijama o postojanju adaptacije odgovora HHN osovine na ponavljani stres, bilo da je on homotipski ili heterotipski. Time bi se mogao

objasniti i atenuisan odgovor kortizola u grupi KS u odnosu na sportiste, mada nismo pronašli studije koje su poredile razlike u odgovorima između ove dve grupe.

Registrovani pad kortizola u period oporavka kod sportista za razliku od KN bi mogao predstavljati još jedan nivo adaptacije i zaštite od prekomerne hiperkortizolemije, ali o ovome u literaturi još uvek nema dovoljno podataka.

Registrovan sličan odgovor ACTH nasuprot razlici u odgovorima kortizola između sportista se još uvek ne može objasniti na osnovu dostupnih literaturnih podataka. Potencijalni nivoi adaptacije se nalaze na nivou izmene osetljivosti osovine na negativnu povratnu spregu, izmene osetljivosti nadbubrega na stimulaciju od strane ACTH, ili na nivou uticaja simpatikusa na stresni odgovor kore nadbubrega.

Do sada nisu sprovedene studije koje su analizirale efekat polimorfizama u genima za receptore hormona HHN osovine. Naši rezultati uticaja *BcII* i N363S polimorfizma su u skladu sa rezultatima dobijenih analizom odgovora izazvanih psihosocijalnim stresom. Ograničenje u interpretaciji naših rezultata koji su vezani za polimorfizme A3669G, -2G/C, I180V i CTC→CCC potiče od malog broja ispitanika koji su analizirani.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Bojana Popovic, Dejana Popovic, Djuro Macut, Ivana Bozic antic, Tatjana Isailovic, Sanja Ognjanovic, Tamara Bogavac, Valentina Elezovic Kovacevic, Dusan Ilic, Mirjana Petrovic, Svetozar Damjanovic. Acute response to endurance exercise stress: focus on catabolic/anabolic interplay between cortisol, testosterone, and sex hormone binding globulin in professional athletes. *J Med Biochem* 2018;37:1–7

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Ova studija je dizajnirana tako da nudi opsežnu analizu velikog broja potencijalnih modulatora aktivnosti HHN osovine profesionalnih sportista, kako u nestimulisanim okolnostima, tako i tokom stresnog izazova. Pokazali smo da je u dizajnu ispitivanja a zatim i u analizi rezultata neophodno uzeti u obzir: period sportske sezone, doba dana tokom koga se ispitanici testiraju, potencijalni nivo deficita energetske rezerve, mogućnost postojanja pretreniranosti. Pokazali smo da je potreban biološki efekat kortizola osnovna determinanta

načina njegovog odgovora u akutnom stresu, ali da isti zavisi i od prethodne izloženosti stresoru, a naročito ako je stres psihosocijalni. Pokazali smo da fiksiranost treninga za određeno(a) doba dana može da dovede do faznog poremanja u normalnom cirkadijalnom ritmu sekrecije kortizola, ali da u analizi potencijalnih uticaja treba voditi računa i o energestkim rezervama organizma. Pokazli smo da postoji više načina adaptacije HHN osovine na ponavljani fizički stres, i da po svemu sudeći adaptiranost postoji na više od jednog nivoa HHN osovine. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja je uzela u obzir više modulatora stresnog odgovora i koja je istovremeno poredila razliku u akutnom neuroendokrinom odgovoru na fizički stres između profesionalnih sportista i osoba izloženih psihičkom stresu.

Ovo je prva studija koja je analizirala uticaj različitih polimorfizama u genima za receptore hormona HHN osovine na odgovor u akutnom fizičkom stresu kod profesionalnih sportista. Pokazali smo da u ovoj grupi ispitanika navedeni polimorfizmi imaju sličan odgovor uticaj kao i na odgovor u psihosocijalnom stresu. Odsustvo uticaja na načine odgovora u sedentarnim kontrolama može ukazivati na različiti stepen ekspresije ovih receptora kod osoba izloženih dugotrajnom, ponavljanom, fizičkom stresu u odnosu na osobe neizložene stresu, tj. u odnosu na osobe koje nisu pod hroničnim psihičkim stresom.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Bojane Popović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 26.06.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Milan Petakov

Prof. dr Miloš Žarković

Prof. dr Milica Medić-Stojanoska

Mentor:

Prof. dr Svetozar Damjanović
