

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На I редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.10.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Тамаре Б. Поповић и др Предрага Вујовића о урађеној докторској дисертацији **Славице Г. Ранковић**, истраживача сарадника, Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, под насловом **„Утицај различитих врста хране на параметре оксидативног стреса и маснокиселински профил фосфолипида јетре пацова“**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Тамара Б. Поповић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања, др Предраг Вујовић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, др Јелена Лозо, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, др Марија Глибетић, научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања, др Јасмина Дебелјак Мартачић, научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Славице Ранковић под насловом **„Утицај различитих врста хране на параметре оксидативног стреса и маснокиселински профил фосфолипида јетре пацова“**, написана је на 112 страна куцаног текста и подељена је у уобичајена поглавља: Увод (26 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (11 страна), Резултати (18 страна), Дискусија (14 страна), Закључци (4 стране) и Литература (34 стране). Докторска дисертација садржи 12 слика, 6 табела и 11 графикона. У дисертацији је цитирано 226 библиографских јединица. Докторска дисертација садржи и податке о менторима и члановима комисије, сажетак на српском и енглеском језику, списак скраћеница, садржај, биографију аутора и потписане изјаве о ауторству, коришћењу и истоветности штампане и електронске верзије доктората.

Анализа докторске дисертације: Маснокиселински профил фосфолипида мембрана одражава липидни састав унете хране, па се и користи као биохемијски параметар праћења уноса масних киселина. Промене у метаболизму липида код различитих патофизиолошких стања такође утичу на заступљеност, тј. квантитативни и квалитативни однос масних киселина и липида. За нормално функционисање организма и ћелија важан је однос n-6 и n-3 полинезасићених масних киселина и сваки поремећај равнотежног n-6/n-3 односа може узроковати појаву различитих патолошких стања. Чињеница да су масне киселине n-3 и n-6 метаболичког пута заправо супстрати истих ензимских система елонгаза и десатураза представља основу за промене у њиховим активностима у експериментално измењеним условима.

У последњих десетак година испитивања ефеката различитих врста додатака храни у великој мери су замењена испитивањима утицаја , изокалоријског уноса хране различитог хемијског састава. На тај начин је омогућено поређење резултата добијених на различитим групама и повезивања у закључцима без преседана. Храна обогаћена млечним протеинима која је у високом

проценту богата и засићеним масним киселинама, као и храна обогаћена рибљим протеинима и n-3 полинезасићеним масним киселинама, аналитички су испитиване пре почетка експеримента.

Наша истраживања изведена су на, пацовима Вистар соја, оба пола. Јединке сваког пола биле су подељене у три групе, у зависности од испитиваног типа хране. Узимајући у обзир већ наведене литературне чињенице о директној зависности уноса хране и профила масних киселина фосфолипида, испитивана је јетра као орган у које се обавља биосинтеза и разградње масних киселина, као и бројни другиметаболички процеси везани како за липиде, тако и за угљене хидрате.

На основу већ постојећих литературних података о полној специфичности одговора на различите промене у исхрани, па смо укључили и тај аспект који је заједно са различитим врстама хране које смо давали паралелно уносио нове податке и омогућио нам објашњења неких промена у саставу масних киселина до којих је дошло на крају експеримента. Два фактора заједно различита исхрана и различити полови били су довољан истраживачки изазов као и посматрање параметара оксидативног стреса у датим околностима и њихових међусобних корелативних односа.

Поглавље **УВОД** подељено је у седам целина и садржи осам илустрација. У овом поглављу кандидат на прегледан и систематичан начин описује улоге липида и њихов утицај на здравље, са посебним освртом на улогу и структуру класе фосфолипида у оквиру ћелијских мембрана. Наглашен је и значај масних киселина фосфолипида мембрана као прекурсора еикозаноида. У наставку кандидат детаљно описује поделе масних киселина, њихову номенклатуру и конфигурацију као и синтезу и разградњу. Посебан осврт је дат на изворе засићених масних киселина из млека као и изворе n-3 полинезасићених масних киселина из рибе, њихов биолошки значај, као и на улогу десатураза и еленгаза код сисара. Такође је наглашена полна специфичност одговора јетре у односу на унос различитих масних киселина. У завршном делу уводног поглавља кандидат описује значај оксидативног стреса, улоге слободних радикала, оксидативних оштећења ткива као и улоге система антиоксидативне заштите. У уводном делу постављене су полазне основе на које ће се кандидат позивати у дискусији добијених резултата.

У поглављу **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** аутор на концизан начин излаже циљеве рада који обухватају: 1. детаљну анализу све три врсте коришћене хране, процентног садржаја масних киселина, као и садржаја макро- и микроелемента и витамина; 2. одређивање концентрације биохемијских параметара у плазми; 3. испитивање параметара оксидативног стреса у јетри 4. анализу профила масних киселина фосфолипида у јетри по завршетку експеримента уз уочавање полно-специфичних разлика у одговорима.

У следећем поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** приказан је експериментални и методолошки протокол који је кандидат Славица Г. Ранковић користила у својим истраживањима. Описам је дизајн експеримента, поступци руковања експерименталним животињама прилагођени Дирекцији Савета Европе 86/609. Описане су детаљно методе које су биле коришћене за анализу хране: гравиметрија за испитивање садржаја протеина, масти, угљених хидрата и целулозе, атомска апсорпциона спектрометрија за анализу минерала и гасно-течна хроматографија за анализу масних киселина из хране. Узорци хомогената јетре анализирани су спектрофотометријски у циљу одређивања активности ензима оксидативног стреса. Гасно-течном хроматографијом у истим хомогенатима одређиване су масне киселине фосфолипида јетре док су се из узорака плазме животиња спектрофотометријски одређивали биохемијски параметри. На крају поглавља су описане методе статистичке анализе: двофакторска анализа варијансе и Tukey post hoc тест, једнофакторска анализа варијансе, док је за испитивање дистрибуције података коришћен Šarigo-Vilkov тест.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** подељено је на 4 целине и документовано са 4 табеле, 3 слике и 10 графикона. Прва целина приказује резултате који описују ефекте хране различитог хемијског састава на телесну масу животиња. Узимана је у обзир недељна потрошња по животињи за сваку групу па су недељно и праћене промене телесне тежине. Телесна маса претстављена је као промена процента телесне масе на крају студије за сваку експерименталну групу. Добијени резултати приказују да се проценат телесне масе највише повећао код пацова храњених храном

обогаћеним млечним протеинима. Уочљива је разлика у промени телесне масе између полова независно од порекла хране.

Друга целина приказује анализу хемијског састава различите врсте коришћене хране. Резултати табеларно приказују проценте масти, протеина, шећера, целулозе, влаге, количину макро и микроелемента, као и процентуални састав масних киселина заступљених у различитим врстама хране. Хемијски је анализиран процентуални садржај влаге, протеина, масти, целулозе, скроба, пепела, шећера као и енергетска вредност хране коју су конзумирале све три групе животиња. Детаљно је одређен састав минерала, калцијума, фосфора, натријума, гвожђа и цинка као и садржај витамина А и Е у различитим врстама хране. Нарочита пажња посвећена је одређивању процентног садржаја масних киселина Засићене масне киселине (СФА) и линолна киселина (ЛА) доминирају у храни обогаћеној млечним протеинима док $n-3$ полинезасићене масне киселине (ПУФА) доминирају у храни обогаћеној риљљим протеинима. У храни обогаћеној риљљим брашном највиши је проценат витамина Е, најнижи проценат шећера и укупних масти у односу на остале две врсте хране.

Трећа целина приказује ефекте хране различитог порекла на резултате биохемијских параметара плазме животиња (аланин аминотрансфераза (АЛТ), аспартат аминотрансфераза (АСТ), укупни холестерол (ХОЛ), липопротеини велике густине (ХДЛ-холестерол), липопротеини ниске густине (ЛДЛ-холестерол), триглицериди (ТГ)). Храна обогаћена риљљим протеинима снижава концентрацију триглицерида код женки. Код мужјака обе врсте хране снижавају ЛДЛ и повећавају ХДЛ, док храна обогаћена млеком повећава и концентрацију ТГ код мужјака док код женки повећава плазма концентрацију ХДЛ холестерола. Такође, у овом делу резултата показан је и ефекат хране различитог порекла на маснокиселински профил фосфолипида у јетри пацова. Храна обогаћена млеком повећава проценат вакценске (ВА) и ЛА док снижава проценат стеаринске киселине. Код женки храна обогаћена риљљим брашном снижава проценат ВА и ЛА. Код женки обе врсте хране повећавају проценат ДГЛА, док храна обогаћена риљљим брашном снижава проценат АА, повећава ЕПА, ДПА, ДХА. Храна обогаћена млеком снижава укупне $n-3$ повећава укупне $n-6$ као и њихов однос код мужјака. Код женки храна обогаћена рибом повећава укупне $n-3$, снижава $n-6$ и њихов однос $n-6/n-3$.

Четврта целина приказује резултате параметара оксидативног стреса ензимске активности супероксид-дисмутазе (СОД), каталазе (КАТ), глутатион пероксидазе (ГП) као и степен липидне пероксидације (ТБАРС). Код женки третираних храном обогаћеном риљљим брашном дошло је до повећања активности КАТ и ГП у односу на контролну групу и групу пацова третирану млечним протеинима. Активности антиоксидативних ензима између група нису се значајно разликовале код животиња третираних храном обогаћеном млеком у праху. Осим параметара оксидативног стреса анализирани су корелације ових параметара по појединачним групама. Значајне корелације уочене су код животиња третираних млеком у праху. Наиме, ТБАРС је била у позитивној корелацији са активностима анализираних ензима КАТ и ГП. Значајна корелативна повезаност уочена је између ГП и КАТ која је такође присутна и у контролној групи.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидат студиозно и критички разматра добијене резултате имајући у виду своје и резултате других аутора. Дискусија је подељена на четири целине. У првој су дискутовани резултати биохемијских параметара плазме третираних животиња који су показали да код женки храна обогаћена млечним протеинима повећава концентрацију ХДЛ холестерола у плазми у односу на контролну вредност, док храна обогаћена риљљим протеинима снижава концентрацију триглицерида. Код мужјака оба типа хране снижавају концентрацију ЛДЛ холестерола, а повећавају концентрацију ХДЛ. Ефекти третмана храном обогаћеном риљљим протеинима у складу су са добијеним резултатима неколико аутора. Недовољно су испитани ефекти на концентрацију липида у крви наком третмана млеком у експерименталним моделима, док је у хуманим студијама потврђено да се концентрација ХДЛ холестерола повећава после конзумације више од 200 мл млека дневно.

У другој целини аутор коментарише ефекат третмана на профиле масних киселина фосфолипида јетре и констатује да сваки од примењених типова хране мења састав масних киселина фосфолипида и њихов однос, као и укупне засићене масне киселине (СФА), мононезасићене масне

киселине (МУФА) и ПУФА у јетри пацова. Истакнуто је запажање да ефекти нису били исти код оба пола, тј. да су појединачне врсте хране мењале и процентуални састав масних киселина на полно завистан начин. У овој студији је показано да храна обogaћена млеком у праху снижава СФА, повећава МУФА код мужјака и ПУФА код женки. С тим у вези женке имају нижи проценат палмитинске киселине (ПА) (16:0), али и повећан садржај стеаринске киселине (СА) (18:0) у односу на мужјаке. Резултати неколико аутора поклапају се са добијеним резултатима ове студије. Такође, процењена активност елонгазе 6 била је значајно већа код женки у односу на мужјаке, што је доследно литературним подацима. Примењене хране повећавају степен незасићености масних киселина у фосфолипидима мембрана јетре и тиме позитивно утичу на флуидност мембрана. Активност десатуразе 9 већа је код мужјака него женки што је у складу са резултатима који показују да женке пре дијетарне интервенције имају значајно нижи проценат ПА (16:1, n-7) и ОА као и укупних МУФА. Група аутора је такође показала да женке имају значајно ниже концентрације МУФА у фосфолипидима јетре и плазме што се може приписати разликама у концентрацији ОА, значајно нижој концентрацији палмитолеинске и вакценске (ВА) киселине у фосфолипидима јетре. Наши резултати потврђују да храна обogaћена амлеком у праху повећава концентрацију ОА код женки а код мужјака укупних МУФА. Литературни подаци указују да олеинска киселина доводи до снижења ЛДЛ холестерола, смањује оксидацију ЛДЛ честица делујући и антиоксидативно, а такође повећава флуидност и транспорт кроз мембрану. На основу резултата, обе врсте хране код женки повећавају садржај дихомо-гамалиноленске киселине (ДГЛА) у односу на стандардну храну. Женке храњене стандардном храном имају најнижу активност десатуразе 6, али је унос обе врсте хране повећао њену активност до вредности измерених код мужјака. Одређена количина ДГЛА се конвертује у арахидонску киселину (АА), што је литературно показано код глодара и људи јер имају ограничену активност делта 5 десатуразе, док остатак је производ елонгације из ГЛА. Повећање ДГЛА у односу на АА може да ублажи биосинтезу метаболита АА тј. простагландина (ПГ-2) серије, леукотријена (ЛТ-4) серије и фактора активације тромбоцита и има антиинфламаторно деловање код људи што је неколико аутора потврдило у својим студијама. Литературно је такође потврђено да су ДГЛА и АА супстрати циклооксигеназе (простагландин-ендопероксид синтазе), и да се низом слободно радикалских реакција АА метаболише до формирања простагландина 1 и 2 серије. Простагландини серије 2 сматрају се генерално инфламаторним, а простагландини серије 1 поседују антиинфламаторне активности. Литературни подаци недвосмислено показују да би већи процентуални удео ДГЛА у масним киселинама фосфолипида плазме могао имати корисне ефекте на здравље људи. Наши резултати који су показали да унос хране обogaћене рибљим брашном и млеком у праху повећањем активности десатуразе 6, повећавају заступљеност ДГЛА у фосфолипидима јетре представља позитиван ефекат на здравље животиња.

Наша студија је показала најјизраженији утицај различитих врста храна на ПУФА. Хране обogaћене млеком у праху и рибљим брашном углавном су изазвале опозитне ефекте на процентуалну заступљеност ПУФА. Код мужјака храна обogaћена млеком у праху снижава еикозапентанску киселину (ЕПА), докозахексаенску киселину (ДХА) и укупне n-3 масне киселине, повећава процентуалну заступљеност ЛА, укупне n-6 и однос n-6/n-3. Група аутора добила је сличне резултате у хуманој студији у којој је коришћена храна обogaћена млечним мастима. Они су констатовали смањење укупних n-3, ЕПА и ДХА у фосфолипидима еритроцита испитаника на крају студије. Храна обogaћена рибљим брашном код женки пацова довела је до повећања укупних n-3 масних киселина, снижења n-6 као и n-6/n-3 односа. Такође уочена је и повећана заступљеност ЕПА, ДПА, ДХА, снижење ЛА и АА док код мужјака повећање процентуалне заступљености ДХА. Група аутора је показала резултате сличне нашим после третмана рибљим уљем код мужјака, кад се и процентуална заступљеност ДХА повећала а садржај АА као и однос n-6/n-3 смањили. И ако је у нашем експерименту после коришћења хране богате рибљим брашном дошло до повећања заступљености ЕПА упркос смањеној активности делта 5 десатуразе мишљења смо да повећање потиче од високог процента заступљености ЕПА у самој храни што смо анализом и потврдили. Група аутора која је као модел имала старе пацове после суплементације рибљим уљем констатовала је повећање ЕПА, ДПА, ЛА а смањење укупних n-6, садржаја АА у фосфолипидима јетре.

У трећој целини аутор објашњава резултате канонијске анализе и констатује да је канонијска дискриминациона анализа издвојила масне киселине које су највише допринеле разликама у

одговорима на третман: ПА; ОА, ДГЛА, АА, ЕПА, ДТА, ДПА и ДХА. Ефекти две врсте хране нису значајно различити у погледу састава код мужјака, док се код женки значајно разликују. Резултати су показали да се почетне разлике у половима могу значајно модулисати храном. Храна обogaћена рибљим брашном испољава повољнији одговор у вези са саставом индивидуалних масних киселина, при чему је израженији ефекат запажен код женки, што се може узети у обзир за препоруке у исхрани људи.

У четвртој целини аутор узима у обзир и факторе параметара оксидативног стреса и коментарише веће активности ГП и КАТ у групи која је третирана рибљим брашном у односу на друге две. Храна обogaћена млеком у праху није утицала на мерене параметре у односу на контролну групу, али са наглашавањем неким корелативних односа. Резултати овог истраживања показали су да унос оба испитивана типа хране нема утицаја на липидну пероксидацију, што су потврдили и аутори студије на експерименталном моделу. Констатовано је да у поређењу са студијама других аутора кад је у питању оксидативни стрес фактори који се морају узети у обзир при тумачењу резултата су дужина трајања експеримента као и то да ли је реч о саплементацији или промени хране кад се узима у обзир експеримент на експерименталном моделу.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** на јасан начин су изведени закључци који произлазе из добијених резултата и дају одговор на постављене циљеве докторске дисертације. Истакнути су полно специфични одговори, како у биохемијским параметрима, појединачним масним киселинама фосфолипида јетре, параметара стреса у односу на измењене саставе хране. По први пут је за храну обogaћену млечним протеинима потврђено да повећава незасићеност масних киселина фосфолипида мембране и њену флуидност. што је за храну обogaћену рибљим протеинима било познато. Изведен је и општи закључак да почетне разлике у половима које евидентно постоје у саставу масних киселина, могу бити значајно модулисане врстом хране. С тим у вези палмитинска, олеинска ДГЛА, АА, ЕПА ДТА, ДХА сматрају се масним киселинама на које је измењена храна највише деловала. У нашој студији највеће промене су уочене у процентуалној заступљености ПУФА. Храна обogaћена рибљим брашном снизила је процентуалну заступљеност арахидонске киселине а у исто време повећала процентуалну заступљеност n-3 масних киселина, снизила укупне n-6 као и однос n-6/n-3. Ови резултати могу бити и препорука да у исхрани становништва свакако треба повећати унос рибе и производа од рибе.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** садржи списак од 226 цитираних библиографских јединица. Адекватно коришћење литературних навода одражава проблематику ове дисертације и указује на темељан приступ аутора теми.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

M22

1. **Slavica Ranković**, Tamara Popović, Jasmina Debeljak Martačić, Snje žana Petrović, Mirko Tomić, Đur đica Ignjatović, Gordana Tovilović-Kovačević and Maria Glibetić, Liver phospholipids fatty acids composition in response to different types of diets in rats of both sexes, *Lipids in Health and Disease* (2017) 16:94, pages2-11, DOI10.1186/s12944-017-0483-9

M23

2. Vidović Nevena, **Ranković Slavica**, Oreščanin-Dušić Zorana, Debeljak-Martačić Jasmina, Popović Tamara, Tomić M., Glibetić Marija, The effects of fish-based and milk-based diets on liver tissue antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female Wistar rats: A pilot study, *Vojnosanitetski preglad* 2018 OnLine-First Issue 00, Pages: 122-122 <https://doi.org/10.2298/VSP180326122V>

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

M34

1. **Ranković S**, Popović T, Debeljak Martačić J, Tomić M, Ignjatović Đ, Tovilović Kovačević G, Glibetić M. Food enriched with fish flour decrease n-6/n-3 ratio in liver phospholipids in male wistar rats. Serbian Society for Mitochondrial and Free Radical Physiology Third Congress Redox

medicine: reactive species signaling, analytical methods, phytopharmacy, molecular mechanisms of disease, Belgrade, Republic of Serbia, 25-26 september 2015, Book of abstracts p64.

2. **Ranković S**, Popović T, Debeljak Martačić J, Pokimica B, Petrović-Oggiano G, Tomić M, Ignjatović Đ, Tovilović Kovačević G, Glibetić M. Effects of different types of diet on liver fatty acids profiles in Wistar rats. 13th Congress of nutrition, Food and Nutrition - A Roadmap to Better Health, Belgrade, Serbia, 26th-28th October, 2016, p 277.

3. **Slavica Ranković**, Nevena Vidović, Jasmina Debeljak Martačić, Tamara Popović, Biljana Pokimica, Zorana Oreščanin-Dušić, Gordana Petrović Oggiano, Marija Glibetić. The effects of fish-based and milk-based diets on liver tissue antioxidant enzymes in female Wistar rats. Fourth International Congress of Serbian society for Mitochondrial and Free Radical Physiology: Challenges in redox biology, September 28-30 2018, Belgrade, Serbia. Book of abstracts p 83.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

M64

1. **Ranković S**, Popović T, Debeljak-Martačić J, Tomić M, Ignjatović Dj, Tovilović-Kovačević G, Glibetić M. Effects of folate supplementation in rats fed with fish flour enriched food. 3rd International Congress of Physiological Sciences of Serbia, Belgrade, Republic of Serbia, 29-31 october 2014, Book of abstracts, p 177.

2. **Ranković S**. Liver phospholipid fatty acids composition in response to different types of diets in rats of both sexes. Serbian Biochemical Society Sixth Conference “Biochemistry and Interdisciplinarity: Transcending the Limits of Field”, with international participation, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, 18 november 2016, Belgrade, Serbia. Proceedings, p 153.

Мишљење и предлог Комисије:

Комисија сматра да је докторска дисертација **Славице Г. Ранковић** написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме и да садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Резултати истраживања у оквиру ове дисертације пружају јаснију слику о томе колико промена хране код експерименталних животиња може довести до промена састава масних киселина фосфолида мембране јетре, па тиме и њене флуидности. У исто време пружа добар увид о полним разликама у саставу масних киселина и полно зависним модулаторним ефектима хране који су констатовани. Кандидат је у својој докторској дисертацији обрадио актуелну тему и добијени резултати представљају оригинални истраживачки допринос бољем разумевању полних разлика у ензимским системима десатураза и елонгаза и метаболизма липида. Треба истаћи да ови резултати могу имати потенцијално и терапеутски значај с обзиром на увид у промене у биохемијским параметрима, променама у саставу индивидуалних масних киселина после третмана храном обогаћеном млечним односно рибљим брашном као и могућим антиоксидативним ефектима. Имајући у виду све претходно наведено, као и да су резултати поменутих истраживања објављени у два научна рада комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Славици Г. Ранковић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Утицај различитих врста хране на параметре оксидативног стреса и маснокиселински профил фосфолипида јетре пацова**”.

КОМИСИЈА:

др Тамара Б. Поповић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду-
Институт за медицинска истраживања

др Предраг Вујовић, ванредни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Јелена Лозо, ванредни професор, Универзитет у
Београду-Биолошки факултет

др Марија Глибетић, научни саветник, Универзитет
у Београду- Институт за медицинска истраживања

др Јасмина Дебељак Мартачић, научни сарадник,
Универзитет у Београду- Институт за медицинска
истраживања

У Београду, 15.10.2018. године.