

РЕЦЕНЗИЈА
НА ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА СО НАСЛОВ: „ЕФЕКТОТ НА
ЈОНИЗИРАНАТА ВОДА ЗБОГАТЕНА СО ГЛУТАТИОН И ВИТАМИН Ц
ВРЗ АНТИОКСИДАТИВНАТА ЕНЗИМСКА АКТИВНОСТ ПРИ АКУТЕН
ХИПЕРТЕРМИЧКИ СТРЕС КАЈ БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ СТАОРЕЦ“
ПРИЈАВЕНА НА ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ, УНИВЕРЗИТЕТ
„ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

Со Одлука број 0206-791/5 од 19.11.2019 година, донесена на 17. седница на Наставно-научниот совет на докторски студии на Кампус 3 – Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ во Штип, формирана е Комисија за оценка и одбрана на докторската дисертација со наслов: „Ефектот на јонизираната вода збогатена со глутатион и витамин Ц врз антиоксидативната ензимска активност при акутен хипертермички стрес кај белиот лабораториски стаорец“ пријавена и изработена од кандидатката м-р Мајлинда Адеми, во состав:

- проф. д-р Татјана Рушковска – претседател,
- проф. д-р Невенка Величкова – член,
- проф. д-р Емилија Јаневиќ Ивановска – член,
- проф. д-р Ицко Ѓоргоски - член, екстерен ментор,
- проф. д-р Дарко Бошнаковски - член, интерен ментор.

Комисијата во наведениот состав го разгледа доставениот материјал и го поднесува следниов:

ИЗВЕШТАЈ

Докторската дисертација со наслов: „Ефектот на јонизираната вода збогатена со глутатион и витамин Ц врз антиоксидативната ензимска активност при акутен хипертермички стрес кај белиот лабораториски стаорец“ од кандидатката м-р Мајлинда Адеми е презентирана на 177 страници, изработени со компјутерска техника со вообичаен проред. Во истата се вклучени 18 табели и 38 слики. Трудот ги содржи следниве поглавја: Резиме на македонски и англиски јазик, Вовед, Цел на истражувањата, Материјал и методи на работа, Резултати, Дискусија, Заклучоци и Литература.

Во ВОВЕДОТ кандидатката, врз основа на консултираната литература, укажува дека хомеостазата означува тенденција на спротиставување на промените со цел да се одржи стабилна, односно релативно константна внатрешна средина. Во услови на изложеност на стресогени фактори од надворешната средина хомеотермните организми, користејќи различни хомеостатски механизми, настојуваат да одржат постојаност на внатрешна средина на своето тело. Нормалната телесна температура (нормотермија) претставува важен хомеостатски параметар за нормално функционирање на организмите. Со покачување на телесната температура се зголемува брзината на ензимските реакции до одредена граница, но поради протеинската структура на ензимите на повисоки температури доаѓа до иреверзибилна денатурација и постепена инхибиција на ензимската активност. Топлотниот стрес претставува фактор на животната средина за стимулирање на производството на реактивни кислородни форми (ROS), поради сличноста во одговорите забележани по топлотниот стрес со оние кои се јавуваат во состојбата на оксидативен стрес. Молекуларниот кислород, во својата диатомска, неексцитирана форма ($^3\text{SgO}_2$ или вообичаено O_2), претставува најважниот оксидант кај аеробните организми. Иако, по дефиниција, се работи за форма на радикал (поседува неспарени електрони), молекуларниот кислород е многу слабо реактивен. Сите оксидативни чекори во катаболизмот на јаглехидратите, липидите и протеините конвергираат во процесот на оксидативна фосфорилација во митохондриите каде се синтетизира АТФ и се редуцира O_2 до краен продукт вода. Во физиолошки услови, приближно 2% од тоталниот флукс

на O_2 во митохондриите се трансформира во O_2^- поради нецелосна редукција на истиот. Овој мал дел на физиолошки продуцирани оксиданти се редуцира веднаш со помош на антиоксидативните механизми на самата клетка. Нарушување на редокс хомеостазата настанува во случај на дисбаланс во организмот помеѓу редуцирачките агенси (електрон донорите) и оксидантите (електрон акцепторите) резултирајќи со редукциски стрес или, пак, оксидативен стрес кој е почеста форма во биолошките системи.

За да можат клетките правилно да функционираат, мора да постои еквилибриум меѓу оксидирачките и редуцирачките агенси во организмот. Варијациите на нивото на оксиданти се регулираат постојано и во тесни граници од страна на антиоксидативната одбрана на организмот. Балансот се одржува од страна на клучни антиоксидативни ензими: супероксид дизмутаза, каталаза, селенопротеините глутатион пероксидаза и тиоредоксин редуктаза, како и од неензимските антиоксиданси како α -токоферол (витамин Е), аскорбат (витамин С), β -каротен и флавоноиди. Зголемување на температурата во амбиенталната средина во која престојуваат организмите, а која доведува до метаболна активација комбинирани со покачена консумпција на кислород, иницира состојба на оксидативен стрес. Оксидативниот стрес може да има сериозни разорни ефекти и да предизвика модификација на многу клеточни функции, а што може да заврши и со клеточна смрт. Како одговор на овие проблеми, клетките изложени на топлотен шок ја зголемуваат антиоксидативната одбрана, посебно активноста на антиоксидативните ензими.

Слободните радикали имаат бројни улоги во физиолошките процеси, па затоа нивното создавање е неопходно. Во однос на нивната потенцијална токсичност, за време на еволуцијата, е развиена потребата за воспоставување на антиоксидантната заштита. Супероксид дизмутазата, каталазата, глутатион пероксидазата, глутатион редуктазата, ја создаваат т.н. прва линија на антиоксидантна заштита, додека неензимските антиоксиданси, глутатион, витамин Ц и Е претставуваат секундарна линија на одбрана.

Јонизирана или редуцирана вода претставува електрохемиски активирана вода со рН вредност поголема од 7. Според релативно поновите трудови јонизираната вода (ERW) поседува алкална рН вредност во интервалот од 8 до 10, има негативен стандарден редокс потенцијал и е богата со редуцирани водородни форми од видот на молекуларен водород, водородни атоми и метални хидриди. Поради своите редуцирачки својства, електрохемиски редуцираната вода покажува значителна активност во елиминирањето на реактивните кислородни форми со кои доаѓа во контакт, како што се хидрокси радикалот, пероксидните радикали, па и некои супероксидни честички.

ЦЕЛИТЕ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО се добро дефинирани, со добро поставени задачи и тоа:

- Да се анализира клеточниот антиоксидативен потенцијал кај експерименталните стаорци преку определување на промените на активноста на ензимите супероксид дизмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза и глутатион редуктаза во функција на видот и времетраењето на третманот, како и во зависност од акутното хипертермичко експонирање на експерименталниот модел во серум, крвна плазма, црн дроб и бубрези.
- Да се испита ефектот на соодветниот третман кај секоја група во нормална и хипертермна средина врз вредностите на избрани биохемиски параметри: вкупни протеини, албумини, AST, ALT, холестерол, триглицериди, уреа, креатинин и глюкоза во серум.
- Да се определи временскиот интервал за кој стаорците ќе почнат да влегуваат во фаза на секундарна хипертермија при експозиција на висока амбиентална температура.

Во делот МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ се опишани експерименталните услови и методите кои се користени за определување предвидени параметри. Комисијата е на мислење дека се користени современи методи за реализација на испитувањата.

Како експериментален модел се користени бели лабораториски стаорци од сојот Wistar, од женски пол, со телесна тежина од 180-220g, поделени во три групи (по 15 животни, n=45) за аплицирање на соодветен третман. За време на експериментот животните престојувале на собна температура ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), при светлосен режим 12:12 часа. На сите животни вклучени во експериментот им е давана стандардна лабораториска храна и вода *ad libitum*.

Третираните стаорци се поделени во 3 различни групи. Првата група се стаорци кои пиеле комерцијална минерална вода. Втората група се стаорци кои пиеле електрохемиски редуцирана вода со pH=9.4 (мерено веднаш после активирањето на водата). Третата група се стаорци кои пиеле електрохемиски редуцирана вода (pH=9.4) во која после активирањето на водата се додадени водни раствори на аскорбинска киселина и глутатион со тоа што крајната концентрација на овие биомолекули во водата изнесува 10^{-5} mol/dm^3 ($c(\text{AA}) = 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$; $c(\text{GSH}) = 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$). Активирањето на водата се прави со алкализер од компанијата „Burbuliukas ir CO“ LTD.

Експерименталните групи од по 15 животни се организирани и обележани на следниот начин:

1. прва група животни (КПМ) - контролна група која прима само вода,
2. втора група животни (ТАД) - третирани со јонизирана вода,
3. трета група животни (ТАМ) - третирани со јонизирана вода збогатена со додатоци на глутатион и витамин Ц.

Притоа, исто така, се опишани постапките за земање крв за анализа од експерименталните животни и добивање на серум, а потоа и методите за определување на следните параметри:

- активност на SOD во крв, црн дроб и бубрези,
- активност на CAT во крв, црн дроб и бубрези,
- активност на GPx во крв, црн дроб и бубрези,
- активност на GR во крв, црн дроб и бубрези,
- концентрација на вкупни протеини во крвниот серум,
- концентрација на албумини во крвниот серум,
- активност на AST во крвниот серум,
- активност на ALT во крвниот серум,
- концентрација на уреа во крвниот серум,
- концентрација на креатинин во крвниот серум,
- концентрација на холестерол во серум,
- концентрација на триглицериди во серум и
- концентрација на глукоза во серум.

Исто така, е следена и промената на телесната температура во текот на акутната хипертермичка експозиција.

Во поглавјата РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА кандидатката прави систематизација на добиените резултати и истите ги дискутира во однос на добиените сознанија за влијанието на јонизираната вода врз антиоксидативната ензимска активност.

Во овој дел се укажува дека третманот аплициран соодветно на секоја група во периодот на отсуство на хипертермичка експозиција не влијае значајно во правец на покачување или намалување на SOD ензимската активност. За разлика од оваа состојба, изложеноста на животните на висока амбиентална температура предизвикува сигнификантна разлика кај сите три групи во активноста на SOD во однос на периодот во отсуство на истата. Акутното хипертермичко експонирање на 21-ви ден кај КПМ и ТАМ групата значајно ($p <$

0.001) ја намалува активноста на SOD во однос на резултатите добиени за истата ензимска активност на 14-ти и 7-ми ден од третманот. Акутното хипертермичко експонирање на 21-ви ден за активноста на SOD кај КПМ и ТАМ групата за црниот дроб има статистички значајна разлика ($p < 0.001$). Хипертермичката експозиција доведува до намалување на SOD активноста и во бубрези.

Акутното хипертермичко експонирање предизвикува значајно покачување ($p < 0.001$) во активноста на САТ кај сите три групи. Активноста на САТ во црниот дроб е зголемена кај трите групи. Третманот за време од 21 ден кај сите три групи доведува до намалување на активноста на САТ во крвна плазма и бубрези. Акутното хипертермичко експонирање на 21-ви ден кај КПМ и ТАД група за крвна плазма има статистички значајна разлика ($p < 0.01$).

Контролната група третирана со природна вода во текот на 14-от ден покажува зголемена активност на GPx, која при хипертермичка експозиција во истата група се намалува. Активноста на GPx се намалува и кај втората група третирана со јонизирана вода при хипертермичка експозиција. Кај третата група третирана со јонизирана вода со додатоци на глутатион и витамин С е регистрирана повисока активност на GPx. Акутното хипертермичко експонирање предизвикува значајно покачување ($p < 0.001$) во активноста на GPx кај третата група.

Сите три групи во функција на соодветниот третман што секоја група индивидуално го добила и времето на апликација на истиот, покажуваат статистички значајна разлика ($p < 0.001$) кај КПМ7 и КПМ21 во GR активноста, а, исто така, статистички значајна разлика ($p < 0.001$) во GR активноста покажуваат КПМ14 и КПМ21. Акутното хипертермичко експонирање на 21-ви ден кај КПМ и ТАМ групата за бубрег предизвика сигнификантна разлика ($p < 0.001$) во активноста на GR.

Акутната хипертермичка експозиција предизвикува значајна разлика во концентрацијата на вкупни протеини помеѓу 7-ми и 14-ти ден земени како појдовни точки и 21-от ден од третманот, односно денот на хипертермичко експонирање на стаорците. Од добиените резултати, кандидатот воочува дека третманот со јонизирана вода како и јонизирана вода збогатена со витамин Ц и глутатион не доведува до статистички значајна разлика во однос на концентрацијата на албумини во крвниот серум кај третирањаниот експериментален модел. Сите три групи стаорци, во функција на времето на третман, покажуваат индивидуален тренд на зголемување на активноста на AST во крвниот серум. Ензимската активност на ALT во периодот од 7-ми до 14-ти ден бележи растечки тренд со статистички значајна разлика кај сите три групи стаорци. Акутното експонирање на висока амбиентална температура предизвикува опаѓање на активноста на ALT повторно кај сите три групи, но разликата во оваа намалување е значајна ($p < 0.001$). Акутното хипертермичко експонирање на експерименталните животни во однос на третманот со јонизирана вода, со или без додатоци на истата, доведува до значајна разлика ($p < 0.001$) во концентрацијата на холестерол во однос на сите три групи. Акутното хипертермичко експонирање на експерименталните животни во однос на третманот со јонизирана вода, со или без додатоци на истата, доведува до значајна разлика ($p < 0.001$) во концентрацијата на триглицериди во однос на периодот без аплицирање на висока температура. Испитувајќи го ефектот на акутниот хипертермички стрес врз концентрацијата на глукоза во серумот, кандидатот констатира значајно зголемување ($p < 0.001$) во тек на 21-от ден кај трите третирањани групи.

Посебно место во оваа докторска дисертација имаат и промените на телесната температура (TT) кај соодветните групи на животни (КПМ, ТАМ, ТАД), во текот на акутната хипертермичка експозиција кои се прикажани на сликата 39. Во зависност од времетраењето на експозицијата, можат да се забележат три фази во динамиката на промените на температурата. Првата фаза се одликува со покачување на нормалното ниво кои се за 2-3°C повисоки; втората фаза, позната како температурно плато, вклучува мали

флукуации околу нововоставеното ниво, условени од активноста на механизмите за терморегулација; третата фаза, или секундарна хипертермија, доведува до понатамошното покачување на телесната температура и може да заврши летално.

Во поглавјето ЗАКЛУЧОЦИ кандидатката ги извлекува следните општи заклучоци:

- Акутната експозиција на висока температура предизвикува оксидативен стрес на сите нивоа на организмот.
- Акутната хипертермичка експозиција доведува до зголемена продукција на индикаторите на оксидативен стрес, како и до намалување на активноста на антиоксидативните ензими.
- Третманот со јонизирана вода, без додадени антиоксиданти или, пак, со нивна комбинација, не доведе до значајни промени во активноста на SOD и CAT во серумот за време на периодот на отсуство на висока амбиентална температура.
- Акутната хипертермичка експозиција доведува до намалување на активноста на GPx и GR, а, исто така, доведува и до намален ензимски антиоксидативен капацитет во црниот дроб и бубрези.
- Значајно повисоката ензимска AST и ALT активност во стрес периодот веројатно се должи на лиза на хепатоцитите.
- Се мерат значајно повисоки концентрации на холестерол, триглицериди и глукоза во серумот при хипертермички стрес.

Во поглавјето ЛИТЕРАТУРА, кандидатката наведува околу 230 референци кои се однесуваат на оваа проблематика. Овој податок, уште еднаш ја подврдува актуелноста на проблемот и потребата од понатамошни истражувања.

Исполнетост на законските услови за одбрана на докторатот

Кандидатката, пред одбраната на докторската дисертација ги објавила следните рецензирани научни трудови:

1. Majlinda Ademi, Icko Gjorgoski, Ilbert Ademi (2019). “ The impact of ionized water supplemented with glutation and vitamin C during acute hyperthermic exposure on the concentration of total proteins in the blood serum at white laboratory rats”. Knowledge – Interntional Journal, Vol.34.4 867-872 (Global Impact & Quality Factor 1,822).
2. Majlinda Ademi, Icko Gjorgoski, Ilbert Ademi. (2018) “The role of oxidative stress on cell metabolism”, Medicus Vol. 23 (3) 287-294.
3. Мајлинда Адеми, Ицко Ѓоргоски, Илберт Адеми (2019). „Ефектот на јонизираната вода збогатена со глутатион и витамин С врз концентрацијата на триглицериди и холестерол при акутен хипертермички стрес кај белиот лабораториски стаорец”, Medicus Vol.24 (1) 29-35.
4. Majlinda Ademi, Icko Gjorgoski, Ilbert Ademi. (2019) “The alterations of the enzymatic antioxidant activity by adding alkaline water on the white laboratory rats after hyperthermic stress”. Acta Medica Balkanica, Vol.4/No7-8 79-85.

ЗАКЛУЧОК И ПРЕДЛОГ

Врз основа на приложениот материјал и проверка на докторската дисертација од кандидатката м-р Мајлинда Адеми може да се заклучи дека поставените цели се темелно обработени во согласност со основните начела на научно-истражувачката дејност. Докторската дисертација е научен труд кој обработува актуелни проблеми со иновативен пристап, со оригинални сознанија и јасни заклучоци и препораки. Содржината, обемот и постигнатото ниво на квалитет ги задоволува и исполнува условите потребни за изработка на докторска дисертација.

Врз основа на тоа, Комисијата има чест да му предложи на Наставно-научен совет на докторски студии на Кампус 3 да ја прифати позитивната рецензија на Докторската дисертација со наслов: **„Ефектот на јонизираната вода збогатена со глутатион и витамин Ц врз антиоксидативната ензимска активност при акутен хипертермички стрес кај белиот лабораториски стаорец“** пријавена и изработена од кандидатката м-р Мајлинда Адеми и да и одобри јавна одбрана на истата.

РЕЦЕНЗЕНТСКА КОМИСИЈА

проф. д-р Татјана Рушковска - претседател, с.р.

проф. д-р Невенка Величкова - член, с.р.

проф. д-р Емилија Јаневиќ Ивановска - член, с.р.

проф. д-р Ицко Ѓоргоски - член, екстерен ментор, с.р.

проф. д-р Дарко Бошнаковски - член, интерен ментор, с.р.