

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КРАГУЈЕВАЦ

1. Одлука Изборног већа

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу, број 01-6270/3-10 од 21.9.2011. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Христос Г. Алексопоулоса, под називом:

„ НЕУРОПЕПТИД „У” И ПОСТТРАУМАТСКО СТРЕСНО РЕАГОВАЊЕ”

Чланови комисије су:

1. Проф. др Славица Ђукић Дејановић, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија.
2. Проф. др Драган Раванић, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија.
3. Проф. др Ласло Пушкаш, члан Редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Анатомија.

2.1 Кратка биографија кандидата

Др Христос Г. Алексопоулос је рођен 21.05.1975. у Грчкој. Основну и средњу школу је завршио са одличним успехом у Солуну, Грчка. Основне студије на Медицинском факултету у Нишу започео је октобра 1994. године и завршио у јуну 2000. на Медицинском факултету у Београду. Од 17. октобра 2002. године ради у Високој струковној медицинској школи у Ћуприји, као наставник вештине на предмету анатомија. Члан је Српског анатомског друштва од 2011. године. Студент је постдипломских докторских академских студија на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје неоронауке. Учествовао је на симпозијумима и конкурсним посвећеним разноврсној тематици у области анатомије. Користи енглески, српски и грчки језик, а поседује напредно знање из различитих области рада на персоналним рачунарима. Др Христос Алексопоулос је ожењен и отац је троје деце.

2.2 Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: „НЕУРОПЕПТИД „У” И ПОСТТРАУМАТСКО СТРЕСНО РЕАГОВАЊЕ”

Предмет: У истраживању ће се утврдити релација између посттравматског стресног реаговања и анатомског супстрата појединих типова личности који су реаговали на овај начин.

Хипотезе:

1. Постоје везе између начина реаговања испитаника изложених дејству ратног стресора и структуре личности испитаника односно структурних корелата личности
2. Постоје значајне промене у анатомском и цитохистолошком супстрату (хипокампуса и амигдале) јединки изложених стресору.

2.3 Подобност кандидата

Кандидат је објавио један рад у целини у домаћем часопису са рецензијом, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

1. Hristos G. Aleksopoulos, Laslo Puškaš, Milena B. Ilić, Žika Ć. Jović, Marina M. Milenković, Zorica V. Stojanović. Histochemijska studija o holecistokininu i morfologiji imunopozitivnih neurona u korteksu humanog inferiornog parijetalnog lobula / Histochemical study on cholecystokinin and morphology of immunopositive neurons in the cortex of human inferior parietal lobule. PONS Мед Ć 2009 / PONS Med J 2009 ; 6(20): 1-5.

2.4 Преглед стања у подручју истраживања

Посттрауматско стресно реаговање (ПТСР) је облик психолошких последица излагања стресним доживљајима, који укључују смртну опасност, озбиљне физичке повреде или претњу физичком интегритету особе, које та особа доживљава крајње трауматично. Клиничка слика ПТСР почиње полако и подмукло, најчешће у виду промене расположења депресивног карактера, повлачења у себе, избегавања контакта са особама из околине, поновног преживљавања трауматичног догађаја у смислу наметнутих сећања („flash backs“), сниженог прага фрустрационе толеранције, избегавајућим понашањем, поремећајем у виду снижења воље и нагона, пре свега нагона за продужењем врсте, поремећаја апетита у смисли хипо и хиперапетиције, промена сна у виду иницијалне, терминалне и транзисторн хипосомније, са кошмарним сновима са садржајем везаним за психичку трауму у корену ПТСР. Нису ретки ни поремећаји нагона за животом, па и извршени суициди. Критеријуми за дијагнозу ПТСР налазе се у 10. ревизији Међународне класификације болести (МКБ 10) под шифром Ф 43.1.

Неуропептид У је неуротрансмитер, налази се у мозгу и у аутономном нервном систему. Повезан је са бројним физиолошким процесима у мозгу, укључујући и регулисање енергетског биланса, памћења и учења. NPY се лучи у хипоталамусу, а поред повећања уноса хране, повећава удео енергије, ускладиштење масти као и да блокира ноцицептиве сигнале до мозга.

Неуропептид У (NPY) је један од најраспрострањенијих неуропептида у централном нервном систему. Изолован је из свињског мозга и његова структура је одређена 1982.год. Састоји се из 36 аминокиселина. До данас су позната четири подтипа рецептора овог неуропептида: Y1, Y2, Y4 и Y5. NPY и његови рецептори у АК, укључени су у процес спавања, учења, меморисања, гастроинтерстиналне регулације (нпр. значајни су за настанак гојазности), али и у нека патолошка стања као што су: анксиозност, епилепсија, алкохолизам и депресија. Антистресогено деловање NPY проузроковано је дејством Y1 – рецепторских агониста и блокадом Y1 антагониста.

NPY изазива анксиолитичке ефекте у ЦНС – у. (6-9) NPY који се продукује у АК учествује у овом процесу. Утиче и на процесе меморисања, односно побољшања умаћивања, конгницију, као и у моторне функције, а укључен је и у алкохолну зависност. Наиме, запажено је да услед дејства алкохола долази до смањења концентрације NPY у централном једру АК и запажено је повећање NPY имунореактивности у АК. .

Ns. Amygdaloideus corticalis је највеће једро кортикомедијалног дела амигдалоидног кортекса (АК), који представља важну компоненту олфактивног система. Лоцирано је на дорзалној површини ункуса темпоралног режња, дуж каудалне

две трећине АК, непосредно испод gyrus semilunaris – a. Лежи површно у односу на nc. Amygdaloideus basolateralis, a вентрално у односу на nc. Amygdaloideus medialis.

2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

Значај. Значај ове студије је у томе што се очекује да донесе нова сазнања о фундаменталним чињеницама у вези функционисања неуротрансмитерских система који су повезани са нерулепидом ипсилон у ПТПС. Додатно, утврдиће нове чињенице о повезаности одређених типова личности и начина стресног реаговања. Имајући у виду учесталост овог обољења и медицинске, социјалне и економске последице, резултати студије ће проширити досадашња знања и базу за даља истраживања у овој области.

Циљеви. Циљеви ове студије су следећи:

1. Испитивање морфологије и топографије неурона који садрже НПУ код ПТСП – а у кори хипокампуса и амогдалоидног комплекса
2. Одређивање облика и типа неурона
3. Мерење пречника њихових перикариона као и дужине њихових дендритских грана

2.6 Веза са досадашњим истраживањима

Досадашња сазнања о улози неуропептида ипсилон у ПТПС су веома ретка. С друге стране, већи број студија је испитивао утицај корелата личности на одређена стресна испољавања, али у другојачијим друштвено-економским и социо-културолошким срединама. Такође, јасна веза између ових клиничких корелата и неуропептида испилоон су за сада недовољно позната. У целини, ово истраживање полази од постојећих сазнања са циљем повезивања експерименталних сазнања и клиничких испољавља, што представља даљи, оригинални корак у овој области.

2.7 Методе истраживања

Истраживање ће имати два дела: клинички и експериментални (лабораторијски) део.

Део А. Клиничка студија

Клиничко истраживање биће спроведено у Психијатријској клиници Клиничког центра Крагујевац и Дому здравља Ћуприја. Истраживања ће бити изведена у групи од 80 испитаника, психотрауматизованих стресовима рата, који су се обратили за психијатријску помоћ. Психијатријској служби Клиника за Психијатрију КБЦ Крагујевац, у периоду после ратних дешавања 1999. године и то од марта до јуна исте године.

Групу психотрауматизованих сачињавало је 42 испитаника из подручја Поморавља, а групу 38 испитаника из Шумадије. Узорак ће имати следеће карактеристике: доб испитаника кретаће се у распону од 19 до 55 година; заступљен ће бити и мушки и женски пол; испитаници потичу из руралне и урбане средине; у популацији испитаника школаритет ће бити заступљен кроз нижу, средњу и високу стручну спрему; маритални статус испитаника биће заступљен кроз сва три вида: ожењен, разведен и неожењен; манифестна психопатологија налази се у оквиру посттрауматске депресије изазване стресовима рата.

Дијагноза поремећаја је након спроведеног психијатријског интервјуа а базирала се на ДМЦ ИВ критеријумима. На основу постављене дијагнозе, сви испитаници у истраживању подељени су на пет група. Прву групу сачињавали су испитаници који су депресивно реаговали; другу групу испитаници који су анксиозно реаговали; трећу групу, испитаници који су дисоцијативно реаговали; четврту групу, испитаници који су реаговали посттрауматском депресијом, а пету групу испитаници који су реаговали злоупотребом. (алкохол, лекови). У првој групи, у којој су испитаници депресивно реаговали, појављују се два субентитета : великидепресивни поремећај и дистимија. У другој групи су праћена такође два субентитета: анксиозно реаговање са паником и анксиозно реаговање без панике. У групи дисоцијативног реаговања није вршена посебна субтизација. У четвртој групи, посттрауматска депресија праћена је као акутни и одложени облик. У групи са алкохолном злоупотребом нису издвајани посебни облици реаговања.

Инструменти за процену који су коришћени у истраживању сачињавали су две групе. Прву групу сачињавали су инструменти за процену профила личности испитаника и то: ММПИ и TRQ. Другу групу сачињавали су инструменти за процену: нивоа депресивности испитаника: ХАМД скала, нивоа анксиозности испитаника: ХАМА скала, стања акутне панике испитаника: АПИ. Сви инструменти за процену коришћени су у првој недељи истраживања.

Статистичка анализа ће бити учињена кроз дефинисане варијабле истраживања, методе анализе прикупљених података и прорачун узорка студије. Користиће се т – тест, ф – тест, линеарна корелација, тест Смирнов-Колмогоров. За прорачун узорка узети су подаци оригиналног, пилот истраживања сличног дизајна где је 20 особа са ПТСР идентификован ХАМ-Д скор у зависности од начина типа реаговања, с обзиром да у доступној литератури нема прецизних података о тачним, апсолутним вредностима скорова ХАМ-Д у односу на типове реаговања према инструментима процене предвиђеним у овом истраживању. Параметри за калкулацију су били: промена т-теста за два независна узорка, са вредношћу алфа грешке од 0,05 и бета грешке од 0,2 (последично, снага студије 80%) при чему је коришћен програм G*POWER Ver 3.0.10. Примарни фокус истраживања је предвиђен на доказивање разлика између типа 2 и 4 у односу на тип 3 личности. Зато је, са теоријског и практичног аспекта, предвиђено да се у свакој групи укључи по 20 испитаника, те је укупни студијски утврђена на 80 особа.

Истраживање ће се спроводити према принципима добре клиничке праксе, Хелсиншке декларације и регулаторних прописа. Пре укључивања болесника у студију, обезбедиће се одобрење Етичког одбора Дома здравља Њуприја и Клиничког центра Крагујевац.

Део Б. Експериментално (лабораторијско) истраживање

Експериментална истраживања биће спроведена у центру за патолошку анатомску дијагностику у клиничком центру у Крагујевацу. Истраживања ће бити спроведена на две групе од укупно 24 мозга, 12 контролна и 12 изложена стресу. Мозгови који ће бити узети са кадавера, и експерименталне и контролне групе, биће мечовани према полу, старости и соматских болести, са студијским узорком у клиничком делу студије. Сав анатомски материјал који буде узиман са кадавера биће узет са кадавера који је егзитирао до 2010. године. Укључујући критеријуми ће бити да су кадавери заживотно били: мушког или женског пола, старости од 19-55 година и да нису имали инфаркт мозга, туморе мозга, мултиплу склерозу и друга тешка соматска обољења, што критеријуми за укључивање и студијске клиничке групе.

Исечци АК човека биће узимани 3-5 сати након смрти и фиксирани у Замбони фиксативу. Затим ће исти бити потапани 14 сати у 30% раствор сахарозе (растворене у физиолошком раствору) смрзавани течним азотом и сећиће се на резове дебљине 50um

на криотому (Фригомбил, Реихерт). Имунолошке реакције биће обављене на слободно плутајућим резovima имунохистохемијском авидин-биотин техником (једноструко имунобојење). Из исечка фиксатив ће бити испиран 0,1 моларним фосфатним пуфером 5 пута за 2 сата. После испирања у фосфатном пуферу исечци ће бити потапани у 0,5% раствор тритона у 0,1 моларном фосфатном пуферу у трајању од 12 сати. Пре имунолошке реакције биће потребно блокирати активност ендogene пероксидазе са 3% H_2O_2 (15 минута). Исечци ће затим бити инкубирани 1 сат у нормалном козјем (гоат) серуму (НГС), који препокривају неспецифична места на мембрани неурона, а после тога ће 48 сати бити инкубирани на $+4^{\circ}C$ у растворима моноклонарних антитела на неуропид Y (примарни серум, разблажење 1: 16000).

После испирања са 01 моларним фосфатним пуфером резovi ће се инкубирати у секундарним серумима (анти-раббит ИГГ) у трајању од 1,5 сат на собној температури, а затим авидин-биотин (АБ) комплексу 2 сата (такође на собној температури). Реакција развијена код једноструког имуног бојења биће изведена са 3,3 диаминобензидином развијена код једноструког имуног бојења биће изведена са 3,3 диаминобензидином (ДАБ) у 0,05 моларном ТРИС – HCl пуферу (pH 7,6) и 0,01% H_2O_2 . Резови ће затим бити стављани на предметна стакла, сушени, дехидритисани и монтирани са ДПХ-ом. Обојени неурони ће се посматрати на светлосном микроскопу, мерити окуларним микрометром и прецртавати помоћу светле коморе (camera lucida) (Carl Zeiss, Jena). Карактеристични неурони биће фотографисани на светлосном микроскопу (Olimpus). Исечци ће да се развију у Трис-ХЦЛ пуферу, који ће садржати 0,02% 3,3 диаминобензидина (ДАБ), 0,6% никл-амонијум-сулфата и 0,02% H_2O_2 током 10 минута и покривен ће бити ДПХ-ом и покровним стаклом. ИР неурони и влакна биће исцртани коришћењем додатка Camera lucida и фотографисани светлосном микроскопу (Olimpus). Мерења ће бити извршена окуларним микрометром са окуларном мрежом. За дефиницију неуронског типа користићемо опште прихваћену класификацију неурона по Јонес-у и Петерс-у.

Истраживање ће се спроводити према принципима добре клиничке и лабораторијске праксе, сходно препорукама Правилника за рад у центар за паталoшку анатомију клиничког центра у Крагујевцу уз предходно прибављену сагласност надлежног Етичког комитета.

За обраду хистохемијских препарата ће бити коришћен дескриптивни метод, уз описну категоризацију неурона и наставака, густине присуства неурона позитивних на неуропетид ипсилон као и уобичајена мерења (дужина, ширина, волумен, друго). Испитивани морфометријски параметри NPY- имунореактивних неурона пс. amygdaloideus corticalis-а АК ће бити уношени у базу података, из које ће се комерцијалним софтвером вршити статистичка обрада података. Од предвиђених анализа ће се радити стандардне методе дескриптивне статистике и мере централне тенденције низова (средња вредност, стандардна девијација, варијанса, медијана односно мод за непарметријске вредности). Различитости ће бити тестиране студентовим t тестом за независне узорке за прамаријске и x квадрат тестом за корелације а генералне повезаности параметара биће утврђене мултифакторском анализом. Сва тестирања ће бити рађена на нивоу вероватноће од 95%.

2.8 Очекивани резултати докторске дисертације

У узорку од 80 испитаника, код којих је под утицајем ратних стресора дошло до менталне дисфункционалности, очекује се да се појаве пет начина реаговања а психолошка тестирања (ММПИ) предвиђају да се у овом узорку појављује десет типова личности.

Очекујемо да су у NPY ћелије присутне у свим областима хиполампалног региона. Већина NPY ћелија се налазе у хилусу у свим областима, распона у величини

од малих (пречника преко сома 10-15 μm) до великих (око 20 μm). Већина од њих су полиморфне ћелије, али су присутне и ћелије других морфологија. Требало би да постоји и густа мрежа у целом хипокампаљном региону. Највећи број ћелија биће уочен у медијалном једру, латералном једру амигдалоидног комплекса, а и исто тако и у стрија терминалис. Ћелије су углавном фузиформне. Присуство ових ћелија у стрија терминалис указује на то да се оне можда пројектују у хипоталамусу.

2.9 Оквирни садржај дисертације

Студија ће се спровести у два дела, од којих је један клиничко истраживање а други се састоји од експерименталног рада у патолошкој лабораторији. Клиничко истраживање ће укључити особе које болују од ПТПС у условима реалне клиничке праксе. На основу укључујућих и искључујућих критеријума биће селектована студијска популација. Сваком испитанику ће се уз помоћ одговарајућих психометријских инструмената, скала, одредити тип личности, начин ПТПС реаковања и степен депресивности и анксиозности. Одговарајућом статистичком анализом ће бити утврђена повезаност примарне варијабле, ХАМ-Д скорa и одговарајућих психолошких корелата.

Други део истраживања ће се спровести као експериментална, патоанатомска студија на материјалу хуманих мозга узетих од кадавера, који су, заживотно а према историји болести боловали од ПТС док ће у другој, контролној групи ти подаци бити одсутни. Одговарајућим имунохистохемијски бојењима ће се утврдити присуство и дистрибуција маркера за неуропептид ипсилон у одговарајућим деловима мозга. Морфометријском анализом, присуство и дистрибуција маркера ће се квантификовати а даљом обрадом података утврдиће се одговарајуће разлике између испитиваних подгрупа.

2.10 Предлог ментора

За ментора се предлаже проф. др Драган Раванић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу област психијатрије

2.11 Научна област дисертације

Медицина, Неуронауке.

2.12 Научна област чланова комисије

1. Проф. др Славица Ђукић Дејановић, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија.
2. Проф. др Драган Раванић, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија.
3. Проф. др Ласло Пушкаш, члан Редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Анатомија.

Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег успеха на докторским студијама и публикованих радова, др Христос Г. Алексопоулос испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Христос Г. Алексопоулос бити од великог научног и практичног значаја.
4. Комисија предлаже Изборном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата **др Христос Г. Алексопоулос** под називом **„ НЕУРОПЕПТИД „У” И ПОСТТРАУМАТСКО СТРЕСНО РЕАГОВАЊЕ”** и одобри њену израду.

КОМИСИЈА

1. Проф. др Славица Ђукић Дејановић, председник, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија.

2. Проф. др Драган Раванић, члан, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Психијатрија.

3. Проф. др Ласло Пушкаш, члан Редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Анатомија.

У Крагујевцу, 10.02.2012.

3. Захтев за давање сагласности на извештај о предлогу теме докторске дисертације

Шифра за идентификацију дисертације _____

Шифра УДК₁ (бројчано) _____

Веб адреса на којој се налази извештај Комисије о урађеној докторској дисертацији:

www.medf.kg.ac.rs

СТРУЧНОМ ВЕЋУ ЗА МЕДИЦИНСКЕ НАУКЕ УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ

Молим да у складу са чл. _____ Закона о високом образовању и чл. _____ Статута

Универзитета дате сагласност на извештај комисије о оцени теме докторске дисертације:

Назив дисертације: **НЕУРОПЕПТИД „У” И ПОСТТРАУМАТСКО СТРЕСНО РЕАГОВАЊЕ**

Научна област УДК (текст): **НЕУРОНАУКА** _____

Ментор (име и презиме, звање) _____

(Навести пет потпуних референци за радове ментора из уже научне или уметничке области из које је тема дисертације _____)

Кратко образложење теме (до 100 речи) _____ Карактеристике овог истраживања могу се свести на то да ће се, са једне стране утврдити психолошки начин реаговања односно посттравматско стресно реаговање, а са друге типа личности која ће се добити на основу психометријског мерења. Критеријуми за дијагнозу посттравматског стресног поремећаја су дефинисани на основу МКБ-10. Када је реч о експерименталном делу истраживања може се рећи да је неуропептид У неуротрансмитер, који се налази у мозгу и у аутономном НЦС. NPY и његови рецептори су повезани са бројним физиолошким процесима и изазивају акциолитичке ефекте у ЦНС-у. Оваква улога NPY сугерише и његов значај у посттравматском стресном реаговању.

У клиничком делу студија у узорку личности очекују се пет начина реаговања а путем психолошког тестирања предвиђа се појава десет различитих типова личности.

У експерименталном делу очекујемо да су у NPY ћелије присутне у свим областима хипокампалног региона, уз значајне промене у морфологији и дистрибуцији на амигдалама и хипокампуса.

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Презиме и име кандидата: _____ Христос Г. Алексопоулос _____

Назив завршеног факултета: _____ Медицински факултет у Београду _____

Одсек, група, смер: _____ доктор медицине _____

Година дипломирања: _____ 2000 _____

Назив магистарског рада, односно докторског студијског програма: _____ Докторске академске студије

Научно подручје: _____ Неуронаука _____

Година одбране: _____

Факултет и место: _____ Медицински факултет у Крагујевцу _____

Број публикованих радова: (навести референце за три најважнија рада кандидата из уже научне области из које је тема дисертације) _____ 2 рада

Hristos G. Aleksopoulos, Laslo Puškaš, Milena B. Ilić, Žika Č. Jović, Marina M. Milenković, Zorica V. Stojanović,

Histohemijska studija o holecistokininu i morfologiji imunopozitivnih neurona u korteksu humanog inferiornog parijetalnog lobula / Histochemical study on cholecystokinin and morphology of immunopositive neurons in the cortex of human inferior parietal lobule, PONS Med J 2009 ; 6(20): 1-5 , ISSN 1820-2411, COBISS.SR/ID 11571380

Урошевић Ј., Давидовић М., Одовић Г. , Алехопоулос С., Митровић Љ. (2010) Учесталост депресије код старих особа, Медицински часопис `Понс;

Назив и седиште организације у којој је кандидат запослен: Висока струковна медицинска школа Ћуприја

Радно место: наставник вештине

**ПОТВРЂУЈЕМО ДА КАНДИДАТ ИСПУЊАВА УСЛОВЕ УТВРЂЕНЕ ЧЛ. _____
ЗАКОНА О ВИСОКОМ ОБРАЗОВАЊУ И ЧЛ. _____ СТАТУТА УНИВЕРЗИТЕТА
У КРАГУЈЕВЦУ**

У прилогу вам достављамо: - Извештај Комисије о оцени теме;

- Одлуку научно-наставног већа факултета о одобравању теме за израду докторске дисертације.

(место и датум) М.П. ДЕКАН _____ ФАКУЛТЕТ