

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРЕДМЕТ:
ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, одржаној дана 03. 06. 2015. године, одлуком бр. 01-5586/3-42 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом "Параметри оксидационог стреса у периферној крви особа са акутним исхемијским можданим ударом" кандидата Др Далибора Паспаља, у следећем саставу:

1. Проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник,
2. Проф. др Тихомир Илић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан,
3. Доц. др Владимир Живковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију Др Далибора Паспаља и подноси Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

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

Докторска дисертација кандидата Др Далибора Паспаља у наслову "Параметри оксидационог стреса у периферној крви особа са акутним исхемијским можданим ударом" представља актуелну студију која се бавила новим приступом изучавању интеракције тромбоцита и васкуларног ендотела код болесника са акутним исхемијским можданим ударом, са посебним акцентом на улогу оксидационог стреса у овом феномену.

Акутни мождани удар (инфаркт мозга, инсулт, шлог, мождана кап) (АМУ) се дефинише као фокални или глобални поремећај мождане функције, који нагло настаје, траје дуже од 60 минута, а последица је поремећаја мождане циркулације или стања у коме проток крви није довољан да задовољи метаболичке потребе неурона за кисеоником и глукозом. Најчешће настаје услед запушења крвног суда (акутни исхемијски мождани удар - 75-80% болесника) или прскања крвног суда и изливања крви у мозак или око мозга (акутни хеморагијски мождани удар - 20-25% болесника). АМУ представља ургентно медицинско стање може изазвати трајно неуролошких оштећења, компликације, и смрт. Фактори ризика за мождани удар укључују старост, висок крвни притисак, транзиторни исхемијски напад (ТИА), дијабетес, повишене вредности холестерола, пушење и фибрилација преткомора.

АМУ је трећи узрок смрти у развијеним земљама света, после болести срца и рака, а други узрок смрти у целом свету. У нашој земљи АМУ је први узрок смрти код жена, док је код мушкараца на другом месту, уз процену да сваких 20 минута неко доживи, а сваких 60 минута неко умре од можданог удара. Највећа стопа смртности је присутна у првих месец дана болести и износи чак до 23%. Осим што се ради о болести са веома високом смртношћу, подједнако је озбиљна и чињеница да је ово неуролошка болест са највећим степеном инвалидитета. Рачуна се да се тек око половине свих преживелих врати некој врсти запослења, а да око 20-30% није способно за преживљавање без помоћи другог лица. Ово је, такође, болест са високим процентом понављања, тако да ће сваки трећи болесник, у периоду од 5 година, поново доживети мождани удар.

Акутни исхемијски мождани удар (АИМУ), као доминантни тип можданог удара настаје услед престанка снабдевања одређеног дела мозга кисеоником, чиме се иницира покретање каскаде исхемијских процена. Као најважнији узроци прекида мождане

циркулације се наводе формирање тромба на терену нестабилног атеросклеротског плака и емболија крвних судова мозга. Управо због тога се интеракција тромбоцита и оштећеног васкуларног ендотела, који продукујући von Willebrand фактор (vWF) омогућавају адхезију и агрегацију тромбоцита, сматра кључном у настанку ризичних поремећаја моздане циркулације које воде прекиду перфузије мозга. Повезаност АИМУ са стањима повећане активности vWF, као важног параметра функције коагулационог система, је мало проучавана, али довољно да се истакне све већа улога овог гликопротеина у патогенези мозданог удара.

Моздано ткиво је посебно осетљиво на исхемију, јер поседује малу респираторну резерву и потпуно је зависно од аеробног метаболизма, за разлику од већине других органа. Услед одсуства оксидативног метаболизма, зауставља се производња високо енергетских једињења, као што је аденозин трифосфат (АТФ), што онемогућава одвијање енергетски зависних процеса (рад јонских пумпи) неопходних за опстанак ћелија. На овај начин се покреће читав низ међусобно повезаних догађаја који у крајњем воде у оштећења и смрт ћелије.

Исхемија такође подстиче производњу слободних радикала и других реактивних врста кисеоника, потенцирајући развој оксидационог стреса и последична оштећења ћелија. Слободни радикали путем редокс сигнализације директно иницирају апоптозу неурона. Улога оксидативног стреса у оштећењу мозданог ткива након АИМУ, последњих година постаје све значајнија захваљујући студијама у којима је показано да многобројни маркери оксидационог оштећења могу корелирати са степеном некрозе и прогресијом болести. Захваљујући томе се све већа пажња посвећује примени агенаса који могу смањити дејство реактивних кисеоничних врста (везују их и инхибирају) на неуроне. У недавно спроведеним студијама је показано да антиоксидативни агенси, могу редуковати оштећења изазвана АИМУ, делујући на нивоу ендотела крвних судова мозга (10-12). Узевши у обзир етиологију настанка АИМУ-а као и круцијалну улогу L-аргинин/NO система у контроли васкуларног тонуса намеће се питање да ли овај систем може бити значајан и у механизму настанка овог стања и/или бити потенцијално ново терапијско поље. Литературни подаци који проучавају поменути проблематику су међутим оскудни и неусаглашени.

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 "Medline" и "Cochrane database of systematic reviews" помоћу

следећих кључних речи: "oxidative stress", "stroke", "blood coagulation" утврђено је да до сада није спроведена студија у којој је процењиван значај интеракције тромбоцита и васкуларног ендотела код болесника са АИМУ, са посебним акцентом на улогу оксидационог стреса у овом феномену. На основу тога, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Др Далибора Паспаља у наслову "Параметри оксидационог стреса у периферној крви особа са акутним исхемијским možданим ударом", представља резултат оригиналног научног рада на пољу истраживања у области истраживања патофизиологије možданог удара.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Др Далибор Паспаљ, специјалиста физикалне медицине и рехабилитације, аутор је или коаутор више научних радова из области неуро-физиологије и физикалне медицине са рехабилитацијом.

У студији, чији су резултати практично део докторске дисертације, а која чији је циљ био да се испита улогу појединих параметара редокс равнотеже у акутном исхемијском možданом удару показано је да је динамика ослобођеног азот монооксида потенцијално најзначајнији параметер који се може довести у везу са клиничким епилогом акутног исхемијског možданог удара. Ова студија објављена је у часопису категорије **M23** (Mol Cell Biochem. 2015 Apr 28. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s11010-015-2425-z).

Студија која је за циљ имала да утврди клиничке карактеристике и исход код пацијената са тзв. "locked-in" синдромом, који је настао као последица акутне исхемијске лезије možданог стабла је изнела закључак да су пацијенти који су развили овај синдром као последица исхемијске лезије имали статистички значајнији степен смртности у прва три дана након настанка лезије, него у каснијој фази опоравка. Ова студија је објављена у часопису категорије **M23** (Eur Neurol. 2013;69(4):207-12).

У трећој студији, циљ је био да одреди утицај хиперабричне оксигенације (ХБО) на опоравак болесника са једностраном ампултацијом доњег екстремитета. За процену функционалних способности пацијената са ампултацијом на пријему и отпусту из болнице су коришћени уобичајени тестови за процену функционалне способности: Наранг скала, локомоторни индекс и тест хода на 2 минута. Резултати ове студије су показали да је хипербарична оксигенација убрзала протетичку рехабилитацију болесника са ампултацијом доњих екстремитета. ХБО лечени пацијенти били отпуштени из болнице брже од контроле, да су побољшали сатурацију хемоглобина кисеоником, палпабилност пулса, имали мање компликација на ампултационом патрљку, већи обим бутине здраве ноге, јачи ампултациони патрљак и боље функционалне способности измерене Наранг скалом, локомоторним

индексом и тестом хода на 2 минута. Ови налази указују на све већу важност овог поступка након ампутације екстремитета, који би требало да буде потврђено у даљим истраживањима мултицентричних студија које укључују већи број испитаника. Ова студија је прихваћена за штампу у часопису категорије **M23** (Undersea Hyperb Med 2013; 40(3): 131-9).

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

- **Dalibor Paspalj**, Petar Nikic, Milan Savic, Dragan Djuric, Igor Simanic, Vladimir Zivkovic, Nevena Jeremic, Ivan Srejovic, Vladimir Jakovljevic. Redox status in acute ischemic stroke: correlation with clinical outcome. Mol Cell Biochem. 2015 Apr 28. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s11010-015-2425-z **M23**
- Nikić PM, Jovanović D, **Paspalj D**, Georgievski-Brkić B, Savić M. Clinical characteristics and outcome in the acute phase of ischemic locked-in syndrome: case series of twenty patients with ischemic LIS. Eur Neurol. 2013; 69(4): 207-12 **M23**
- Simanic I, Teofilovski M, **Paspalj D**, Radotic M, Djordjevic D, Zivkovic V, Jakovljevic V. Hyperbaric oxygenation accelerates prosthetic rehabilitation of lower limb amputees. Undersea Hyperb Med 2013 May-Jun; 40(3): 289-97. **M23**

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

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

Докторска дисертација Др Далибора Паспаља написана је на 140 страница и садржи следећа поглавља: Увод, Циљеве истраживања и хипотезе, Испитаници и методе, Резултате, Дискусију, Закључке и Литературу. Рад садржи 13 табела и 7 графикона, док је у поглављу "Литература" цитирано 410 библиографских јединица из домаћих и иностраних стручних публикација.

Испитивањем је обухваћено укупно 120 испитаника (оба пола, од 60 до 80 година старости) са исхемијском лезијом у сливу *a. cerebrii media-e*. У студију су укључени само пацијенти: 1. са клинички манифестним АИМУ у сливу *a. cerebrii media-e*, (подручје М1 и М2), 2. налаз неуроимицинга који показује знаке акутне исхемије у подручју *a. cerebrii media-e*, који је конзистентан са клиничком дијагнозом, 3. функционалним дефицитом базираним на NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) скору (323): 7-25, 4. код којих се исхемијски инфаркт мозга јавља први пут, 5. код којих не постоје друге неуролошке болести, 6. са информационам пристанаком за укључивање у истраживање. Из студије су

искључени испитаници: 1. са знацима интракранијалног крварења или хеморагијске трансформације исхемичког možданог удара, 2. са исхемичним možданим ударом у подручју слива *a. cerebrii media-e*, који захвата мање од 2/3 територије поменуте артерије, 3. са исхемичним možданим ударом у подручју постериорне циркулације (подручје иригације вертебралне, базиларне, или постериорне церебралне артерије), 4. са епилептичким нападом на почетку болести, 5. који користе било који облик антиагрегационе терапије и/или кортикостероидне лекове, 6. са системском инфекцијом 7. са клинички нестабилним медицинским стањем на основу клиничке презентације, историје болести и обављених дијагностичких процедура, као што су акутни инфаркт миокарда, плућна емболија, тешка хронична ренална инсуфицијенција и малигна обољења, 8. код којих услед *exitus-a* у акутној фази није могуће наставити испитивање.

Истраживање је одобрио Етички одбор Специјалне болнице за цереброваскуларне болести "Свети Сава", Београд.

У уводном делу кандидат је веома опсежно, јасно и прецизно, користећи најсавременије литературне податке изложио савремена сазнања о комплексности проблема патофизиологије možданог удара, са посебним акцентом на улогу оксидационог стреса у овом феномену.

У другом поглављу јасно су изложени циљеви истраживања као и конкретни задаци који су у складу са постављеним циљевима: испитати учешће различитих параметара оксидативног стреса (нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикала (O_2^-), липидних пероксида (TBARS) и водоник пероксида (H_2O_2)) и антиоксидационог система (супероксид дисмутаза – SOD и каталаза – CAT) на опоравак болесника са АИМУ и њихову повезаност са клиничком сликом, као и испитати потенцијалну корелацију ендотелне дисфункције и степена оксидативног стреса у етиопатофизиологији АИМУ.

Основна хипотеза истраживања је била да постоји висок степен корелације агрегабилности тромбоцита са биохемијским променама на нивоу ендотела и адекватну релацију са клиничком сликом акутног исхемијског možданог удара

Материјал и методологија рада, подударни са наведеним у пријави дисертације, презентовани су на одговарајући начин и врло прецизно. Студијски узорак је чинило 120 испитаника (оба пола, од 60 до 80 година старости) са исхемијском лезијом у сливу *a. cerebrii media-e*. У студију су укључени само пацијенти: 1. са клинички манифестним АИМУ у сливу *a. cerebrii media-e*, (подручје М1 и М2), 2. налаз неуроимицинга који показује знаке акутне исхемије у подручју *a. cerebrii media-e*, који је конзистентан са клиничком дијагнозом, 3. функционалним дефицитом базираним на NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) скору: 7-25, 4. код којих се исхемијски инфаркт мозга јавља први пут, 5. код

којих не постоје друге неуролошке болести, 6. са информационам пристанакм за укључивање у истраживање. Из студије су искључени испитаници: 1. са знацима интракранијалног крварења или хеморагијске трансформације исхемичког можданог удара, 2. са исхемичним можданим ударом у подручју слива *a. cerebrii media-e*, који захвата мање од 2/3 територије поменуте артерије, 3. са исхемичним можданим ударом у подручју постериорне циркулације (подручје иригације вертебралне, базиларне, или постериорне церебралне артерије), 4. са епилептичким нападом на почетку болести, 5. који користе било који облик антиагрегационе терапије и/или кортикостероидне лекове, 6. са системском инфекцијом 7. са клинички нестабилним медицинским стањем на основу клиничке презентације, историје болести и обављених дијагностичких процедура, као што су акутни инфаркт миокарда, плућна емболија, тешка хронична ренална инсуфицијенција и малигна обољења, 8. код којих услед *exitus-a* у акутној фази није могуће наставити испитивање. Испитаници би били подељени у две групе: експерименталну (болесници са АИМУ, хоспитализовани у Специјалној болници за цереброваскуларне болести "Свети Сава") и контролну групу, који би чинили испитаници исте старосне доби који у својој историји болести немају нежељени акутни цереброваскуларни догађај и који нису користили било који облик антиагрегационе терапије.

Након клиничке верификације АИМУ, узорци крви за одређивање индекса агрегације тромбоцита на: АДП, колаген и аспирин, као и на активност (vWAct) и антиген (vWAg) за *von Willebrandov* фактор – vWf ће су узимани: 1. унутар 24 сата од пријема, 2. седмог дана хоспитализације, док су узорци крви за одређивање параметара оксидационог стреса (ниво индекса липидне пероксидације (TBARS), азотни моноксид (NO) у форми нитрита, супероксид анион радикала (O_2^-) и водоник пероксида (H_2O_2)), као и ензима прве линије ендogene антиоксидационе заштите у еритроцитима (супероксид дисмутаза – SOD и каталаза – CAT) узимани у исто време као и узорци за рутинске биохемијске анализе у АИМУ (глукоза, уреа, креатинин, тропонин, CRP, холестерол, триглицериди): 1. на пријему у хоспитализацију, 2. унутар 24 сата након АИМУ, 3. унутар 72 сата након АИМУ и 4. седмог дана након АИМУ. Узорци крви у свим претходно поменутим временским интервалима (осим првог узорка - на пријему у хоспитализацију) су узимани између 8 и 9 часова ујутру, с обзиром да је за прецизно одређивање биохемијских параметара функције тромбоцита неопходно да узорак крви буде свеж, тј. да се анализе ураде без претходног или накнадног замрзавања.

Биохемијски параметри функције тромбоцита (антиген (vWFAg) и активност (vWFAct) фон Вилебрандов-ог фактора, и индекса агрегације тромбоцита (TRAP)) су одређивани коришћењем латекс имуноесеја за квантитативно одређивање сваког од

параметара у хуманој плазми. Про- и анти-оксидациони маркери су мерени спектрофотометријском методом.

Као примарна варијабла истраживања коришћен је укупни скор за сваку групу, који је одсликавао дисфункцију ендотела и тромбоцита. Овај скор је израчунат на основу процента промене сваког појединачног мереног параметра у односу на горњу, односно доњу нормалну вредност (Укупно 7 параметара у 3 категорије – дисфункција ендотела, дисфункција тромбоцита и оксидациони стрес).

Тестирање значајности статистичке разлике између група је обављено на основу коришћена Т-теста за два независна узорка. У случају непараметријске дистрибуције коришћен је *Willcoxon – Mann Whitney* тест.

Резултати истраживања систематично су приказани и добро документовани са 13 табела и 7 графикана. Показано је да: прва седмица након АИМУ представља временски интервал у оквиру кога постоји највећа опасност од смртног исхода. Овај податак може бити важан у временској контроли терапијских поступака и праћења ових болесника; повишене вредности свих рутинских биохемијских параметара одређиваних у групи пацијената са АИМУ показују да у патогенези исхемије централног нервног система контрибуира читав низ метаболичких поремећаја о којима се мора водити рачуна током превенције и терапије овако сложених пацијената; снижење вредности већине биохемијских маркера након АИМУ указује да они могу бити изузетно корисни у праћењу тока и прогнози овог нежељеног цереброваскуларног догађаја; резултати који се тичу динамике вредности CRP-а показују постојање и инфламацијског патофизиолошког супстрата у АИМУ, као и да овај маркер може да буде веома осетљив у предикцији акутног прекида перфузије мозга и успешности лечења истог; ова студија је потврдила да вон Вилебрандов фактор (von Willebrand factor, vWf) може да представља такође важан показатељ дисфункције церебралне циркулације, односно тока и исхода АИМУ; пстали испитивани биохемијски параметри коагулације (TRAP, INR, aPTT) су показали да такође могу да буду значајни индикатори тежине клиничке слике и ефикасности терапије АИМУ; NO и O₂⁻ могу послужити као најрелевантнији адјувантни биомаркери за праћење напредовања болести и евалуације терапије; параметри антиоксидативног ензимског система заштите нису показали да имају предиктиван значај код ових пацијената.

У поглављу дискусија анализирани су добијени резултати и поређени са литературним подацима из ове области. Коментари добијених резултата су језгровити, а начин приказивања података чини их прегледним и разумљивим. У последњем пасусу поглавља кандидат износи предлоге у смислу даљих истраживања у овој области.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација у наслову "Параметри оксидационог стреса у периферној крви особа са акутним исхемијским можданим ударом" по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. Прва седмица након АИМУ представља временски интервал у оквиру кога постоји највећа опасност од смртог исхода. Овај податак може бити важан у временској контроли терапијских поступака и праћења ових болесника.
2. Повишене вредности свих рутинских биохемијских параметара одређиваних у групи пацијената са АИМУ показују да у патогенези исхемије централног нервног система контрибуира читав низ метаболичких поремећаја о којима се мора водити рачуна током превенције и терапије овако сложених пацијената.
3. Снижење вредности већине биохемијских маркера након АИМУ указује да они могу бити изузетно корисни у праћењу тока и прогнози овог нежељеног цереброваскуларног догађаја.
4. Резултати који се тичу динамике вредности CRP-а показују постојање и инфламацијског патофизиолошког супстрата у АИМУ, као и да овај маркер може да буде веома осетљив у предикцији акутног прекида перфузије мозга и успешности лечења истог.
5. Ова студија је потврдила да вон Вилебрандов фактор (von Willebrand factor, vWf) може да представља такође важан показатељ дисфункције церебралне циркулације, односно тока и исхода АИМУ.
6. Остали испитивани биохемијски параметри коагулације (TRAP, INR, aPTT) су показали да такође могу да буду значајни индикатори тежине клиничке слике и ефикасности терапије АИМУ.
7. NO и O₂⁻ могу послужити као најрелевантнији адјувантни биомаркери за праћење напредовања болести и евалуације терапије.
8. Параметри антиоксидативног ензимског система заштите нису показали да имају предиктиван значај код ових пацијената.

2.6. Примењивост и корисност резултата у теорији и пракси

На основу резултата ове студије планира се даље изучавање значаја редокс равнотеже и функције тромбоцита у акутном исхемијском možданом удару.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Преелиминарни резултати истраживања су публиковани до сада у часопису категорије M23, а планирано је и објављивање интегралне верзије резултата докторске дисертације у часописима међународног значаја.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Др Далибора Паспаља под насловом "Параметри оксидационог стреса у периферној крви особа са акутним исхемијским можданим ударом" на основу свега наведеног, сматра да је истраживање у оквиру тезе засновано на савременим сазнањима и прецизно замишљеној методологији, и да је адекватно и прецизно спроведено. Добијени резултати су прегледни, јасни, добро продискутовани и дају значајан допринос у решавању актуелне и недовољно проучаване и третиране проблематике.

Комисија сматра да ова докторска дисертација кандидата Др Далибора Паспаља, урађена под менторством Проф. др Владимир Јаковљевића, представља оригинални научни допринос и од великог је научног и практичног значаја изучавање редокс равнотеже и функције тромбоцита у акутном исхемијском можданом удару

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом "Параметри оксидационог стреса у периферној крви особа са акутним исхемијским можданим ударом" кандидата Др Далибора Паспаља буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. Проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник,

-
2. Проф. др Тихомир Илић, редовни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Неурологија, члан,

-
3. Доц. др Владимир Живковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан

Крагујевац, 09. 06. 2015.