

Извештај о оцени докторске

дисертације, доставља,-

НАСТАВНО-НАУЧНО ВЕЋЕ

МФ ВМА УО

Одлуком бр. 64/90 са 90. седнице Наставно-научног већа Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране (МФ ВМА УО) у Београду, одржане 30.09.2021. године, именована је комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом:

"Значај одређивања параметара оксидативног стреса и витамина Д у крви код оболелих од релапсно-ремитентне мултипле склерозе"

кандидата дипл. фарм.-мед. биохемичара **Тамаре Анђелић**, студента докторских академских студија биомедицине- модул молекулска медицина МФ ВМА УО и запослене у Институту за медицинску биохемију Војномедицинске академије у Београду.

Ментор у изради тезе била је вс проф. Драгана Обрадовић (одлука УО 149-138 од 24.10.20) са МФ ВМА УО, а одлуком УО бр. 19-240 од 02.08.2021. за **коментора** је именована вс проф. др Весна Мартић, са МФ ВМА УО у Београду.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације у саставу:

1. вс проф. др Милица Никовић, редовни професор, МФ ВМА УО у Београду - председник;
2. вс др Ивана Стевановић, научни саветник, МФ ВМА УО у Београду - члан;
3. проф. др Јелена Котур-Стевуљевић, редовни професор, Фармацеутски факултет Универзитета у Београду - члан

прочитала је достављену докторску дисертацију и након темељне анализе подноси Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду овај извештај.

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација "Значај одређивања параметара оксидативног стреса и витамина Д у крви код оболелих од релапсно-ремитентне мултипле склерозе" написана је на 83 стране стандардног формата. Стилски уједначено написан и прегледан текст је издељен на поглавља која су структурно прилагођена форми докторске тезе: увод, радне хипотезе, циљеви истраживања, материјал и методе, резултати, дискусија, закључак и литература. Насловна страна, као и структурисани сажетак тезе наведени су на српском и на енглеском језику. Текст тезе такође садржи и податке о ментору, коментору, члановима комисије, захвалнице, посвете, листу скраћеница и садржај.

Увод тезе садржи три целине који садржајно објашњавају и образлажу чињенице које су од значаја за постављање хипотезе и циљева истраживања. У потпоглављу Мултипла склероза су дати дефиниција и основне карактеристике мултипле склерозе (МС) уз концизно објашњене клиничких форми МС и са посебним освртом на најзаступљенији, релапсно-ремитентни облик болести. Поред епидемиолошких и етиолошких фактора МС, наглашене су и надаље актуелне непознанице о патогенези ове болести. Друго потпоглавље је посвећено метаболичким, неуропротективним, имуномодулаторним и антиинфламаторним функцијама витамина Д које га кроз бројна истраживања препоручују у терапији МС. Трећа целина увода дефинише настанак и елиминацију оксидативног стреса (ОС), као и механизме антиоксидативне заштите који му се супротстављају. Кроз увод је пружен сажет преглед научних сазнања о терапијским стратегијама у третману МС и о разлозима промтне и индивидуално оријентисане терапијске шеме лечења ове комплексне болести.

На основу наведених сазнања о значају ОС и витамина Д код оболелих од МС, формиране су **радне хипотезе** у оквиру којих је претпостављено да су у периферној крви оболелих од релапсно-ремитентне форме МС:

- вредности параметара ОС веће у поређењу са здравом контролном групом, веће су у фази релапса у поређењу са фазом ремисије и да корелирају са клиничким одликама болести;
- вредности параметара ОС и концентрације витамина Д су у обрнутој корелацији.

У циљу провере наведених претпоставки јасно су дефинисани **циљеви истраживања**:

1. Испитати и упоредити вредности параметара ОС у узорцима крви пацијената оболелих од релапсно-ремитентне МС и у групи здравих испитаника;

2. Испитати и упоредити вредности параметара ОС код пацијената у фази релапса болести и фази ремисије МС;
3. Испитати и упоредити вредности витамина Д у серуму оболелих од МС и здравих испитаника;
4. Испитати и упоредити вредности витамина Д у серуму пацијената у зависности од фазе МС (ремисија или релапс);
5. Испитати повезаност параметара ОС и вредности витамина Д оболелих од МС у различитим фазама болести;
6. Испитати повезаност вредности параметара ОС, вредности витамина Д и клиничких карактеристика болести.

Поглавље **Материјал и методе** је подељено у шест потпоглавља у којима се наводе подаци од значаја за истраживање: испитаници, узорци, одређивање концентрације основних биохемијских параметара, одређивање концентрације витамина Д, одређивање параметара ОС и подаци о врсти истраживања, величини узорка и статистичкој обради података.

У истраживању су добровољно учествовали пацијенти Клинике за неурологију ВМА који су оболели од релапсно-ремитентног облика МС. Истраживање је одобрено одлуком Етичког одбора ВМА од 08.03.2017. и спроведено према етичким принципима Хелсиншке декларације. У тексту је детаљно образложен избор испитаника са наводом дефинисаних критеријумима за укључење, односно искључење из студије. Истовремено је дефинисан и избор здравих испитаника (контролне групе) који су селектовани током систематског прегледа запослених на ВМА.

Истраживање је дизајнирано као студија пресека. Објашњен је начин прикупљања узорака који су даље анализирани у Институту за медицинску биохемију ВМА, Институту за медицинска истраживања ВМА и Катедри за медицинску биохемију Фармацеутског факултета Универзитета у Београду. Приказане су методе за одређивање показатеља ОС у крви: узнапредовалих производа оксидације протеина, прооксидативно-антиоксидативног баланса, малондиалдехида, нитрата и нитрита, супероксид-дизмутазе, каталазе, параоксоназе 1, тоталног антиоксидативног статуса, сулфхидрилних група, укупног билирубина, мокраћне киселине, феритина и трансферина, као и методе одређивања витамина Д.

За сваки тип података у студији дефинисан је и приказан начин статистичке обраде. Резултати истраживања су обрађени у статистичком програму *GraphPad 5 Prisma*. Нормалност дистрибуције параметара је испитивана Шапиро-Вилк тестом. Категорички подаци су приказани као апсолутне фреквенце и тестирани Хи квадрат тестом. У случају нормалне расподеле

података, континуирани подаци су представљени као аритметичке средње вредности и стандардне девијације, у случајевима када је расподела нормална тек након логаритамске трансформације, подаци су представљени као геометријске средње вредности и 95 % интервали поузданости, а ако подаци нису нормално дистрибуирани ни након логаритамске трансформације, приказивани су као медијана и интерквартилни распони. Код нормалне расподеле података, континуирани подаци поређени су Студентовим т-тестом, код података који нису нормално дистрибуирани Ман Витни тестом, а категоријски подаци су анализирани Хи квадрат тестом. За утврђивање корелације између испитиваних варијабли коришћене су Сперманова непараметарска и Пирсонова параметарска корелација. Униваријантна и мултиваријантна мултипла регресиона анализа је коришћена за идентификовање независних предиктора појединих параметара. У циљу процене дијагностичне тачности параметара коришћене су енг. *Receiver Operating Characteristics (ROC)* криве. Резултати су приказани табеларно, а код *ROC* криве и табеларно и графички.

У поглављу **Резултати** су прегледно и детаљно приказани обрађени подаци добијени истраживањем. Ови резултати су систематизовани у 24 табеле и једну слику и приказани кроз осам целина: поређење пацијената са МС и здравих испитаника, поређење клиничких и биохемијских параметара пацијената оболелих од МС у зависности од фазе болести (у ремисији или релапсу), утицај витамина Д код оболелих од МС, повезаност параметара ОС, витамина Д и клиничких карактеристика болести, основне карактеристике, параметри ОС и антиоксидативне заштите и витамина Д код оболелих од МС у зависности од пола, основне карактеристике, параметри ОС статуса и витамина Д код оболелих од МС у зависности од година (старости), основне карактеристике, параметри ОС статуса и витамина Д код оболелих од МС у зависности од пушачког статуса и анализа енг. *Receiver Operating Characteristics* криве за параметре ОС статуса и витамина Д.

У поглављу **Дискусија** се прегледно пореде добијени резултати са резултатима студија других истраживача и анализира значење и значај добијених резултата. Дискусија великог броја испитиваних параметара ОС, као и постојање три групе пацијената (оболели од МС, пацијенти у фази релапса и пацијенти у фази ремисије болести), олакшано је издвајањем у шест целина: оксидативни стрес код оболелих од МС, витамин Д у МС, ОС статус и витамин Д током ремисије и релапса, повезаност параметара ОС статуса и витамина Д у МС, ОС и витамин Д у МС у зависности од пола, ОС и витамин Д у МС у зависности од старости и ОС и витамин Д у МС у зависности од пушачког статуса.

На основу анализе и дискусије добијених резултата, кроз 14 закључака представљени су **Закључци** тезе.

У поглављу **Литература** је наведено 349 референци цитираних у оквиру докторске дисертације.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

Резултати докторске дисертације, у складу са постављеним циљевима истраживања, довели су до сазнања о томе да оболели од МС имају повећан ниво прооксиданаса (прооксидативно-антиоксидативног баланса, малондиалдехида, нитрата и нитрита) у крви у односу на здраве испитанике, као и да им је концентрација прооксиданса-узнапредовалих производа оксидације протеина нижа, вероватно услед смањене концентрације супстрата за ове супстанце-албумина.

Резултати су показали и да оболели од МС имају повећане вредности интрацелуларних антиоксиданаса: супероксид-дизмутазе, каталазе и феритина у крви, док су вредности екстрацелуларних антиоксиданаса (параоксоназе 1, тоталног антиоксидативног статуса, укупних SH група, укупног билирубина, мокраћне киселине и трансферина) ниже у односу на здраве особе. Показано је такође да нема разлика у концентрацији параметара ОС статуса оболелих од МС који су у фази релапса и у фази ремисије.

Применом методе прилагођавања (енг. *adjustment*) за резултате концентрације витамина Д код оболелих од МС након суплементације витамином Д утврђено је да ови пацијенти имају ниже концентрације витамина Д у односу на контролну групу, док се у серуму оболелих у фази ремисије и релапса не региструје разлика у концентрацији витамина Д. Такође, код оболелих од МС који су у фази ремисије и нису на суплементацији витамином Д показано је да витамин Д смањује концентрацију малондиалдехида и повећава концентрацију нитрата и нитрита, док код пацијената оболелих од МС који су у релапсу и који нису на суплементацији витамином Д нема утицаја на концентрацију малондиалдехида и нитрита и нитрата. Код оболелих од МС који су добијали витамин Д, резултати су показали повезаност витамина Д са супримирањем оксидације протеина, али је утврђено и да суплементација витамина Д не утиче на параметре ОС ни у ремисији нити током релапса болести.

Резултати показују да се са трајањем болести смањује концентрација мокраћне киселине док се са повећањем учесталости релапса повећава концентрација малондиалдехида и смањује концентрација укупног билирубина. Код пацијената у фази ремисије, утврђена је негативна корелација између дужине трајања болести и концентрације мокраћне киселине, као и позитивна корелација учесталости релапса и концентрације малондиалдехида. Код пацијената са МС у фази релапса утврђена је већа учесталост релапса са смањењем концентрације укупног билирубина.

Резултати показују да на вредност Проширене скале статуса онеспособљености и на дужину трајања болести не утиче ни један од испитиваних параметара ОС статуса, као ни витамин Д.

У ROC анализи дијагностичке тачности параметара, резултати показују да изванредан потенцијал раздвајања пацијената са МС од контролне групе имају вредности прооксидативно-антиоксидативног баланса, супероксид-дизмутазе и укупних SH-група, док се са одличном

дијагностичком тачношћу одликују концентрације нитрата и нитрита и прооксидативно-антиоксидативног баланса.

В) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе

Утицај антиоксидативне терапије и суплементације витамином Д на број и тежину релапса, као и на прогресију МС предмет је бројних истраживачких студија. Теоријске основе усмеравају ка испитивању патофизиолошког утицаја ОС и утицаја витамина Д у настанку болести и током развоја болести. Различити методолошки приступи током испитивања утицаја суплементације витамина Д код оболелих од МС дају често контраверзне резултате. Резултати ове тезе поткрепљују познате податке о континуитету инфламације, демјелинизације и неуродегенерације током МС без обзира на клиничку презентацију болести. Добијени резултати о непромењеном ОС статусу током ремисије и релапса болести такође су у складу са подацима из литературе. Мањкавост података о променама витамина Д у крви пацијената током релапса и ремисије болести допуњава се резултатима спроведених у овој студији. Значај и комплексност ове докторске дисертације се огледа у упоредној анализи витамина Д и насталог ОС код оболелих од МС како у ремисији, тако и у релапсу. У складу са резултатима ове дисертације су и студије у којима суплементација витамином Д не утиче на ток и прогресију већ установљене МС, премда се очекује протективни ефекат витамина Д на очуваност крвно-мождане баријере, супримирање дегенерације аксона, подстицај за ремјелинизацију, као и његов имуномодулаторни и антиинфламаторни ефекат. У дисертацији показано антиоксидативно дејство управо је облик испољавања антиинфламаторног и имуномодуларног деловања витамина Д.

Спроведено истраживање у оквиру дисертације допуњава празнину у сазнањима о повезаности суплементације витамина Д и биохемијских параметара појединих елемената ОС и антиоксидативне заштите у различитим фазама МС, посебно са аспекта значаја ОС у подстицају настанка и развоја инфламације и неуродегенерације и сходно томе, потреби да се антиоксидативни потенцијал оболелих што пре ојача и одржава избалансирано како би и степен оштећења током развоја болести био мањи.

Г) Објављени радови из ове докторске тезе

Obradovic D, **Andjelic T**, Ninkovic M, Dejanovic B, Kotur-Stevuljevic J. Superoxide dismutase (SOD), advanced oxidation protein products (AOPP), and disease-modifying treatment are related to better relapse recovery after corticosteroid treatment in multiple sclerosis. *Neurological Sciences* 2021; 42(8): 3241-3247.

M22; IF=3,307.

Д) Закључак и предлог

Докторска дисертација под називом "Значај одређивања параметара оксидативног стреса и витамина Д у крви код оболелих од релапсно-ремитентне мултипле склерозе" представља оригинално и актуелно научноистраживачко дело из области молекулске медицине које је реализовано према добрим принципима методологије и начелима етике у научноистраживачком раду. Теза је написана систематично и јасно, анализирајући притом актуелне ставове и добијене резултате у процени значаја оксидативног стреса и примене витамина Д код оболелих од мултипле склерозе. Резултати истраживања спроведених и приказаних у тези доприносе разјашњењу механизма деловања и значаја оксидативног стреса у различитим фазама развоја мултипле склерозе и повезаност суплементације витамином Д са компонентама антиоксидативне одбране и прооксидативним показатељима.

Комисија закључује да докторска дисертација дипл. фарм.-мед. биохем. Тамаре Анђелић испуњава услове дефинисане чланом 7. Правилника о пријави, изради и одбрани докторске дисертације и промоцији доктора наука ("Службени војни лист", бр. 20/12; 25/13 и 12/16) који подразумевају написану докторску дисертацију и оригиналан научни рад објављен у истакнутом међународном часопису категорије М22 са импакт фактором 3,307 из садржаја докторске тезе у којој је кандидат други аутор (први аутор у раду је ментор).

Сагледавши испуњеност свих законских обавеза за одбрану докторске дисертације, комисија предлаже Наставно-научном већу МФ ВМА УО у Београду да рад "**Значај одређивања параметара оксидативног стреса и витамина Д у крви код оболелих од релапсно-ремитентне мултипле склерозе**" прихвати као завршену докторску дисертацију и да дипл. фарм.-мед. биохемичару **Тамари Анђелић** одобри јавну одбрану тезе ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду, 05.11.2021.

КОМИСИЈА

вс проф. др Милица Нинковић, председник



вс научни саветник др Ивана Стевановић, члан



проф. др Јелена Котур-Стевуљевић, члан



