

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Sudskomedicinski značaj određivanja postmortalne koncentracije kateholamina, serotonina i acetilholina u odnosu na uzrok i poreklo smrti“

kandidata dr Irine Damjanjuk, zaposlene u Institutu za sudsku medicinu „Milovan Milovanović“ Medicinskog fakulteta u Beogradu. Mentor je Prof. dr Vesna Popović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Tatjana Atanasijević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Zoran Mihailović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Tihomir V. Ilić, profesor Medicinskog fakulteta VMA

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Irine Damjanjuk napisana je na ukupno 84 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 28 tabela, 14 grafikona i sedam slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je definisano šta je to poreklo, a šta uzrok smrti, sa sudskomedicinskog aspekta. Opisan je pojam tanatohemije i njen značaj u sudskomedicinskoj praksi. Navedeno je šta su to neurotransmiteri i njihova klasifikacija; opisani ispitivani monoaminski neurotransmiteri, serotonin i kateholamini (dopamin, noradrenalin i adrenalin) i acetilholin, njihova sinteza,

metabolizam, distribucija, njihove kognitivne i druge uloge u centralnom nervnom sistemu i perifernim organima, kao i oboljenja koja proističu iz poremećaja njihove funkcije. Posebno je objašnjena njihova uloga u centralnom i sistemskom odgovoru organizma na stres. Navedene su i karakteristike telesnih tečnosti podobnih za određivanje postmortalnih koncentracija ispitivanih neurotransmitera - krvi i cerebrospinalne tečnosti.

Takođe je prikazan detaljan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za sudskomedicinski značaj ispitivanih neurotransmitera kao postmortalnih biomarkera različitih patofizioloških stanja. Objašnjen je njihov značaj kako u određivanju porekla smrti (pre svega samoubilačkog), tako i u određivanju različitih uzroka smrti (pre svega u intoksikacijama, hipo i hipertermiji), uz ostale patofiziološke, toksikološke i druge biohemijske analize, čime nedvosmisleno odražavaju i magnitudu fizičkog stresnog odgovora tokom procesa umiranja.

Ciljevi rada su precizno definisani. Obuhvataju određivanje koncentracije monoaminskih neurotransmitera (serotonina, dopamina, noradrenalina i adrenalina) i acetilholina, u ranom postmortalnom intervalu u odnosu na različito poreklo smrti, uzrok smrti, kao i utvrđivanje eventualnog obrasca u odnosu dobijenih koncentracija u vezi sa uzrokom i poreklom smrti. Ciljevi podrazumevaju i analizu dobijenih koncentracija ispitivanih neurotransmitera u odnosu na demografske karakteristike ispitanika (životnu dob i pol), trajanje agonalnog i postmortalnog intervala, kao i postojanje svesti kod ispitanika o predstojećem mogućem letalnom ishodu. Takođe je utvrđivana korelacija između koncentracija ovih neurotransmitera u različitim odeljcima uzorkovanih telesnih tečnosti – centralnoj i lumbalnoj cerebrospinalnoj tečnosti, kao i perifernom i kardijalnom krvnom serumu.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnoj studiji na obdukcionom materijalu Instituta za sudsku medicinu “Milovan Milovanović” Medicinskog fakulteta u Beogradu. Detaljno su definisani kriterijumi za inicijalno uključanje i kasnije isključenje ispitanika iz studije. Uzorkovanje telesnih tečnosti u kojima su kvantifikovani ispitivani analiti vršeno je tokom obdukcije, bez odstupanja od standardne obdukcione tehnike. Precizno je objašnjena kompleksna analitička procedura, optimizacija i postavljanje uslova analitičke metode, priprema uzoraka i hromatografska metoda – tačna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom, kao metod izbora za određivanje ispitivanih neurotransmitera.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno, tabelarno i grafički, predstavljeni dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 69 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Simultana kvantifikacija ispitivanih monoamina u uzorcima cerebrospinalne tečnosti i seruma, metodom tačne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom, dala je sledeće opsege vrednosti: za serotonin, u likvoru od 0,08 do 7,36 ng/ml, a od 3,42 do 143,57 ng/ml u uzorcima seruma; za dopamin, u likvoru od 0,05 do 112,84 ng/ml, a u serumu od 0,6 do 168,83 ng/ml, za noradrenalin od 0,16 do 10,82 ng/ml u likvoru i od 1,07 do 856,84 ng/ml u serumu; za adrenalin u likvoru od 0,03 do 141,38 ng/ml i od 46,55 do 634,13 ng/ml u serumu. Sve izmerene serumske vrednosti za kateholamine su bile daleko više od kliničkih referentnih intervala, dok su za serotonin bile unutar intervala, sve uz velike varijacije unutar opsega. Iako primenjena analitička metoda jeste metoda izbora i za utvrđivanje vrednosti acetilholina, kao hidrofilnog jedinjenja niskomolekularne težine, u ovoj studiji nije dala zadovoljavajuće rezultate, odnosno koncentracije acetilholina su bile ispod limita detekcije naše analitičke procedure. Koncentracije ispitivanih analita u odnosu na poreklo smrti (prirodna/nasila), što je bio jedan od glavnih ciljeva rada, pokazale su značajne razlike: vrednosti svih monoamina u likvoru su bile više u grupi nasilnih smrti, a za serotonin i dopamin sa statističkom značajnošću – ovde su utvrđene i granične vrednosti za oba monoamina, iznad kojih su dobijene vrednosti označavale nasilnu smrt (za serotonin 3,23 ng/ml, za dopamin 0,24 ng/ml). Između podgrupa nasilne smrti (samoubilačka/ubilačka/zadesna) nisu ustanovljene statistički značajne razlike, iako su jedino vrednosti serotonina bile niže u grupi samoubilačkih smrti. Serumske vrednosti ispitivanih kateholamina, iako evidentno više u grupi nasilnih smrti, nisu dale statistički značajne razlike.

Iako se sa sudskomedicinskog aspekta može napraviti jasna razlika u mehanizmu umiranja kroz različite uzroke smrti, ova studija nije pokazala statistički značajne razlike u koncentracijama ispitivanih monoamina u odnosu na uzrok smrti. Ipak, i bez statistički značajnih razlika i uz evidentne velike varijacije u njihovim vrednostima, posmatrajući srednje vrednosti dobijenih koncentracija, uočava se izvesna pravilnost: u uzorcima likvora, vrednosti serotonina i dopamina su bile najviše u trovanju ugljen-monoksidom (za šta su i vrednosti noradrenalina bile među najvišima), dok su za serotonin i noradrenalin bile najniže

u hipotermiji. Serumske vrednosti kateholamina su pokazale sledeće rezultate: dopaminske vrednosti su bile najviše u smrtima usled ubodina i u trovanju ugljenmonoksidom, a najniže u hipotermiji i srčanim smrtima. Slični rezultati su dobijeni i za noradrenalin: najviše vrednosti u ubodinama, a najniže u ustrelinama. Vrednosti adrenalina su bile najviše u ubodinama i trovanju CO, ali i u hipotermiji.

Za serotonin i noradrenalin nije ustanovljena Spirmanova povezanost između vrednosti u uzorcima likvora i seruma, kao ni vrednosti dopamina u perifernom i kardijalnom serumu, dok su vrednosti dopamina i adrenalina pokazale značajnu korelaciju između centralnog i lumbalnog likvora, ali ne i u odeljcima seruma. Od svih ispitivanih monoamina, jedino su vrednosti adrenalina pokazale srednje jaku korelaciju između vrednosti u likvoru i serumu. Vrednosti ispitivanih monoamina nisu pokazale značajne razlike u odnosu na pol ispitanika, izuzev likvorskih vrednosti dopamina, koje su bile značajno više kod ženskog pola. Dobijene vrednosti monoamina su pokazale tendenciju opadanja sa starošću ispitanika, sa značajnom negativnom korelacijom vrednosti serotonina u likvoru i dopamina i noradrenalina u serumu, u odnosu na starosne grupe. Vrednosti ispitivanih analita su vidno rasle sa dužinom postmortalnog intervala, dok dužina perioda agonije, iako očekivano, nije imala uticaja na vrednosti ispitivanih monoamina – za pojedine neurotransmitere, dopamin i noradrenalin u likvoru i sve kateholamine u serumu, dobijene su više vrednosti u kategoriji kratkog agonalnog perioda, no bez statistički značajnih razlika. Testiranje hipoteze da svesnost žrtve o predstojećem letalnom ishodu, time i psihološka komponenta stresa može imati uticaja na vrednosti ispitivanih monoamina, nije dala statistički značajne rezultate: njihove srednje vrednosti u likvoru i serumu su pokazale tek minimalne razlike između ove dve kategorije.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Do danas u literaturi ne postoje podaci o referentnim postmortalnim vrednostima ispitivanih neurotransmitera, a analiza rezultata se oslanja na kliničke referentne vrednosti. Razlozi za to su višestruki: brojnih egzogeni i endogenih faktori utiču na ritam sekrecije i njihove zaživotne i postmortalne koncentracije, vrednosti pokazuju velike individualne varijacije, a vrednosti su takođe zavisne i od uzorkovanja i metoda kvantifikacije. Iako je značaj postmortalnog određivanja koncentracija ovde analiziranih neurotransmitera u postmortalnim uzorcima telesnih tečnosti poznat dugi niz godina, još uvek su, sa sudskomedicinskog aspekta, upotreba i tumačenje dobijenih rezultata ograničeni. U skladu sa podacima iz literature, i u ovoj studiji dobijene vrednosti su, po pravilu, bile više od dostupnih kliničkih referentnih vrednosti. Naši

su rezultati pokazali da likvorske vrednosti ispitivanih monoamina mogu biti biomarker porekla smrti; sve koncentracije su bile više u nasilnim smrtima, a statistički značajno za serotonin i dopamin u likvoru, gde su određene granične vrednosti iznad kojih koncentracije ukazuju na nasilnu smrt, što je u suprotnosti sa literaturom (Quan i sar., 2011), koja ističe da vrednosti pre korespondiraju sa različitim uzrokom nego poreklom smrti. Slično drugim autorima (Kauert i sar., 1988, Arranz i sar., 1997, Quan i sar., 2011,), za distinkciju između podgrupa nasilne smrti (samoubilačke, ubilačke, zadesne), nisu ustanovljene statističke značajnosti, iako naša studija, kao i pojedine druge (Ohmori i sar. 1992, Arranz i sar., 1997, Musshoff i sar. 2004,), demonstrira niže vrednosti serotonina u samoubilačkim smrtima. Iako bez statističke značajnosti, ova je studija pokazala određeni obrazac u razlikama koncentracija ispitivanih analita u odnosu na različite uzroke smrti, kakav postoji i pojedinim navodima iz literature: Quan i sar. (2011) i Zhu i sar. (2007) takođe navode, ali statistički značajno, niže vrednosti monoamina u hipotermiji, a više u asfiksijama, utopljenju i srčanoj smrti, slično ovome i Ishikawa i sar. (2013) u mehaničkim povredama, utopljenju i intoksikaciji; Arranz i sar. (1997) povišene vrednosti serotonina, dopamina i noradrenalina u likvoru kod trovanja ugljenmonoksidom, dok Wilke i sar. (2007) nisu ustanovili nikakve razlike. Svi literaturni podaci ukazuju na velike varijacije unutar izmerenih opsega vrednosti, zbog čega ispitivani uzorak zahteva mnogo veću brojnost.

Značajno negativna korelacija između ispitivanih analita u odnosu na uzrast ispitanika, što korespondira i sa podacima iz literature (Zhu i sar., 2007, Ishikawa i sar. 2013)), demonstrira redukovanu serotonergičku i simpatičko/adrenomedularnu aktivnost u starijoj životnoj dobi. Suprotno, vrednosti rastu sa dužinom postmortalnog intervala, što je opservacija i u drugim studijama (Kauert i sar., 1988, Hirvonen i sar., 1996, Quan i sar. 2011, Ishikawa i sar., 2013), a rezultat je degradacije i/ili difuzije iz okolnih tkiva i postmortalnih promena u enzimskoj aktivnosti.

Odsustvo korelacije između dobijenih koncentracija ispitivanih monoamina u cerebrospinalnoj tečnosti i serumu, u ovoj studiji, potvrđuje činjenice da su njihova centralna i periferna sinteza i uloga u organizmu (kao neurotransmitera i hormona) nezavisne, stoga i vrednosti u serumu ne mogu biti marker njihove centralne aktivnosti. Takođe i koncentracije u različitim telesnim tečnostima (komorski i lumbalni likvor, kardijalni i periferni serum), koji su fiziološki međusobno zavisni, zbog postmortalne degradacije i difuzije, ne pokazuju značajne korelacije.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Damjanjuk Irina, Popović Vesna, Lukić Vera, Soldatović Ivan, Mihailović Zoran, Atanasijević Tatjana **Postmortem serotonin level in cerebrospinal fluid as a marker of the manner of death** Vojnosanitetski pregled, 2018 OnLine-First (00):49-49 doi.org/10.2298/VSP170221049D

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Sudskomedicinski značaj određivanja postmortalne koncentracije kateholamina, serotonina i acetilholina u odnosu na uzrok i poreklo smrti**“ dr Irine Damjanjuk, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju neurotransmitterske i hormonalne uloge ispitivanih jedinjenja kao biomarkera stresnog odgovora u procesu umiranja. Ovo takođe ističe i značaj doprinosa tanatohemije sudskomedicinskoj praksi. Upotreba ovih analiza u rutinskoj sudskomedicinskoj praksi uslovljena je uvođenjem referentnih rangova “normalnih” vrednosti ispitivanih analita, na osnovu kojih bi se mogli interpretirati dobijeni rezultati. Hipoteza da vrednosti monoamina pokazuju izvesnu pravilnost u pogledu porekla i uzroka smrti se pokazala tačnom: vrednosti monoamina su pokazale više vrednosti u nasilnim smrtima u odnosu na prirodne, a za dva monoamina – serotonin i dopamin i sa statističkom značajnošću. Takođe, dobijene vrednosti su pokazale i izvestan obrazac u odnosu na pojedine uzroke smrti. Bez obzira što se u literaturi ovi neurotransmiteri proglašavaju postmortalnim biomarkerima stresnog odgovora, ostaje pitanje da li ustanovljene razlike u dobijenim koncentracijama treba posmatrati kroz pretpostavljeni fizički i psihički stres ili sa aspekta patofizioloških promena u sklopu disfunkcije CNS-a i drugih organa u različitim mehanizmima smrti. Praktična upotreba određivanja njihovih vrednosti, uprkos velikim varijacijama, uz kompletnu autopsijsku dijagnostiku, bila bi korisna u evaluaciji uzroka i porekla smrti, onda kada su morfološke karakteristike minimalne ili odsutne, kao što je slučaj npr. mehaničkih asfiksija, intoksikacija ili hipotermije i u evaluaciji magnitude psihičkog i fizičkog odgovora u procesu umiranja, što bi imalo implikacije i u krivičnompravnom sistemu.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju „**Sudskomedicinski značaj određivanja postmortalne koncentracije kateholamina, serotonina i acetilholina u odnosu na uzrok i poreklo smrti**“ dr Irine Damjanjuk i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 08.06.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Tatjana Atanasijević

Prof. dr Zoran Mihailović

Prof. dr Tihomir V. Ilić

Mentor:

Prof. dr Vesna Popović
