

NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 05.06.2024. godine, broj 19/XXVI-1/3-MB, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„SPEKTRALNA, BIOTIČKA I FRAKTALNA ANALIZA EEG I EKG SIGNALA U EKSPERIMENTALNIM MODELIMA INFARKTA MIOKARDA I EPILEPSIJE “

kandidata dr Marka Vorkapića, zaposlenog u Institutu za Reumatologiju u Beogradu.

Mentor je prof. dr Dragan Hrnčić, vanredni profesor i naučni savetnik, Institut za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komentor je prof. dr Milica Janković, vanredni profesor, Katedra za signale i sisteme, Elektrotehnički fakultet Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

- 1. Prof. dr Olivera Stanojlović**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
- 2. Prof. dr Predrag Mitrović**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
- 3. Prof. dr Aleksandar Ristić**, docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
- 4. Dr Andrej Savić**, viši naučni saradnik, Elektrotehnički fakultet, Univerzitet u Beogradu
- 5. Prof. dr Vojin Ilić**, redovni profesor, Fakultet tehničkih nauka, Univerzitet u Novom Sadu

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 Marka Vorkapića napisana je na engleskom jeziku, u skladu sa Statutom Univerziteta u Beogradu i Pravilnikom o doktorskim studijama na Univerzitetu u Beogradu. Sadrži ukupno 93 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada,

materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci, literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 3 tabele, 49 grafikona i 8 slika. Doktorska disertacija sadrži još: sadržaj, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, pismo zahvalnosti, biografiju kandidata, spisak publikovanih rezultata koji su proizašli iz teze, kao i prateće izjave: Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **Uvodu** je napravljen pregled aktuelnih saznanja o patofiziološkim, epidemiološkim i dijagnostičkim aspektima epilepsije i akutnog infarkta miokarda, kao i o eksperimentalnim modelima zastupljenim u njihovom istraživanju. Potom su izložena saznanja o neurokardiološkoj autonomnoj regulaciji koja povezuje kortikalne centre, a prvenstveno medijalni prefrontalni korteks sa lokalnom neuronskom mrežom u srcu, kao i aferentne puteve koji mogu facilitirati dvosmernu vezu između miokarda i kortikalnih centara (srce-mozak osovina). Dat je i detaljan opis neurofiziološke osnove elektrokardiografskog (EKG, od detaljne analize akcionog potencijala kardiomiocita do funkcije sprovodnog sistema srca i registracije kardiomiocitnih potencijala) i elektroencefalografskog (EEG) signala (od strukture i funkcije neurona, transmembranske jonske propustljivosti, te vrsta sinapsi i ekscitacionih/inhibitornih postsinaptičkih potencijala do registracije kortikalnih dendritskih potencijala). U daljem tekstu, izložen je klinički i eksperimentalni značaj akvizicije i analize EKG i EEG signala kao i prednosti i mane pojedinih eksperimentalnih modela. Potom je napravljen pregled naprednih metoda analize signala počevši od linearnih metoda, preko fraktalnih i standardnih nelinearnih metoda zaključno sa novijim biotičkim nelinearnim metodama. Poseban osvrt je napravljen na veštačke neuralne mreže. U poglavlju posvećenom analizi signala detaljnije je izneta i analiza varijabilnosti RR intervala EKG signala (eng. *heart rate variability*-HRV) koja predstavlja okosnicu istraživanja neurokardiološke srčane regulacije u fiziološkim uslovima, ali i srčanim i mnogim drugim oboljenjima uključujući epilepsiju. Na kraju je dat pregled novih istraživanja u pravcu "wearable" tehnologija, digitalnih biomarkera i automatske analize signala kao potencijalnog pravca daljeg usavršavanja dijagnostike i terapije epilepsije i infarkta miokarda. Detaljnim prikazom trenutno poznatih relevantnih rezultata različitih studija o analizi bioloških signala u epilepsiji i akutnom infarktu miokarda, uvodnim izlaganjem je postavljena dobra osnova za ciljeve ove doktorske disertacije.

Ciljevi rada su precizno formulisani i sastoje se od dva jasno definisana cilja. Kao prvi cilj navedeno je određivanje spektralnih, fraktalnih i biotičkih karakteristika EEG signala nad medijalnim prefrontalnim korteksom, kao i EKG signala u periodu pre i nakon

administracije izoprenalina na modelu izoprenalinom indukovano akutnog infarkta miokarda kod pacova. Kao drugi cilj navedeno je određivanje spektralnih, fraktalnih i biotičkih karakteristika EEG signala nad medijalnim prefrontalnim korteksom, kao i EKG signal u modelu lindanom izazvane epilepsije kod pacova.

U poglavlju **Materijal i metode** su jasno izneti detalji eksperimentalnog dizajna i korišćenih savremenih metoda i tehnika. Navedeno je da se radi o eksperimentalnoj studiji na životinjama koja je sprovedena u Laboratoriji za neurofiziologiju Instituta za medicinsku Fiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Definisano je da su u radu korišćeni odrasli mužjaci pacova soja Wistar albino, koje su dopremljene iz akreditovanog vivarijuma u Beogradu, a u laboratoriji čuvane pod kontrolisanim standardnim ambijentalnim uslovima uz vodu i hranu koji su bili dostupni ad libitum. Svi eksperimentalni postupci bili su u skladu sa direktivom Evropskog parlamenta i Veća (2010/63/EU) i odobreni od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (br. 4455/2) i Rešenjem nadležnog ministarstva Republike Srbije (323-07-08097/1/2018-05). Opisana je procedura registracije EEG i EKG signala sa dovoljno potrebnih detalja. Dat je pregled primenjenih metode analize EKG i EEG signala kao i softver koji je korišćen: NeuroSciLaBG, softver razvijen u NI LabVIEW paketu (National Instruments, Austin, Texas, USA), Matlab 2016b (Mathworks, USA), Kubios HRV Standard 3.2.0 software (Kubios, Finland), Bios Analyser software. Potom je detaljno izložen tok eksperimenta izoprenalinom idukovanog infarkta miokarda sa opisom indukcije infarkta. Opisan je tok eksperimenta lindanom izazvane epilepsije sa osvrtom na metode analize signala primenjene u okviru predikcije i detekcije napada korišćenjem neuralnih mreža. Na kraju su sistematično navedene statističke metode primenjene u tezi.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati, uz adekvatne grafičke metode prikaza dobijenih rezultata.

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. Sažeto su prikazani i konzistentni su sa postavljenim ciljevima istraživanja.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 279 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Ithenticate report provera originalnosti raportirala je sumarni index podudarnosti od 14%, pri čemu nije bilo podudarnosti većih od 1% niti sa jednim pojedinačnim izvorom u literaturi. Od izvora navedenih u izveštaju postoje četiri izvora sa sličnošću od 1% od toga dva autorska rada dr M. Vorkapića koji su deo teze. Svi ostali izvori imaju manje od 1% podudarnosti.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Tokom izoprenalinom izazvanog infarkta miokarada registrovan je EEG signal nad medijalnim prefrontalnim korteksom, kako u bazalnim uslovima, tako i tokom razvoja infarkta nakon administracije izoprenalina. Dobijeni su sledeći rezultati: spektralna snaga u beta frekventnom opsegu bila je značajno povišena tokom prvog sata nakon administracije izoprenalina, kao i u toku perioda od drugog do četvrtog sata. Spektralna snaga u teta frekventnom opsegu bila je značajno povišena tokom prvog sata. Spektralna snaga alfa frekventnog opsega bila je značajno povišena tokom perioda od drugog do četvrtog sata. Sve promene u spektralnoj snazi su se vratile na osnovne vrednosti nakon 24 časa. Registrovana je i statistički značajna pozitivna korelacija između amplitude ST segmenta i promene u snazi spektra alfa frekventnog opsega tokom perioda od drugog do četvrtog sata nakon administracije izoprenalina. Takođe, nađena je i značajna promena i u relativnoj snazi beta opsega u prvom satu i u periodu od drugog do četvrtog sata koja je značajno korelirala sa ST elevacijom. Analizom HRV nađeno je povećanje srednje frekvence, kao i sniženje srednje dužine RR intervala nakon administracije izoprenalina. Uočen je statistički značajan porast vrednosti fraktalne dimenzije od prvog do četvrtog sata nakon administracije izoprenalina sa tendencijom porasta od prvog do četvrtog sata. Sa druge strane, mere entropije su pokazale statistički značajno opadanje vrednosti nakon administracije izoprenalina u celom četvorosatnom periodu. Dobijeni su sledeći rezultati biotičkih parametara: detektovan je statistički značajan pad u pokazatelju izmešane izometrije uz povećanje vrednosti serijske izometrije. Takođe, uočeno je povećanje radijusa izometrije dok su radijalna i radijalna konsektivna izometrija bile značajno snižene. Diverzifikacija i mešovita diverzifikacija su obe pokazivale statistički značajno snižene vrednosti kao i vrednosti uređenosti i originalnosti. Vrednosti metode detrendovanih fluktuacija pokazala je smanjenje vrednosti alfa 1 i alfa 2 parametara nakon administracije izoprenalina, ali je samo alfa 2 vrednost dosegla statističku značajnost.

Analizom spektralne snage EEG signala dobijenih u eksperimentalnoj studiji lindanom – izazvane epilepsije, ustanovljeno je da postoji statistički značajno usporenje EEG frekvencije tokom iktalnih perioda. Ove promene dovele su do značajnog povećanja snage teta i delta frekventnih opsega u poređenju sa alfa i beta opsezima. Spektralne gustine dobijene brzo Furijeovom transformacijom pokazale su da su spektrom dominirale frekvence teta opsega, dok su frekvence u beta opsegu bile najmanje zastupljene. Rezultati algoritma za predikciju epileptičnih napada zasnovanih na HRV pokazateljima izraženi su kroz rezultate tačnosti, preciznosti, senzitivnosti, specifičnosti i F1 skora za logističku regresiju i neuralnu mrežu. Za logističku regresiju dobijene su sledeće vrednosti: tačnost $86,81 \pm 8,87\%$; preciznost $96,3 \pm 8,28\%$ specifičnost $83,95 \pm 8,69$, senzitivnost $94,44 \pm 12,42$ i F1- skor $89,42 \pm 7,05\%$. Rezultati vrednosti neuralne mreže bili su: tačnost $66,3 \pm 22,97$; preciznost $77,86 \pm 17,83$, senzitivnost $69,92 \pm 23,79$, specifičnost $56,67 \pm 36,26$; i F1- skor $72,55 \pm 19,02$. Iz EEG signala izdvojeni su biotički parametri za kreiranje neuralne mreže u smislu detekcije epileptičkih napada. Rezultati algoritma detekcije napada na osnovu EEG biotičkih pokazatelja su sledeći: tokom treniranja bilo je ukupno 4,2% pogrešno klasifikovanih segmenata signala. Za trenažni set podataka greška je bila 5,4. Za set test podataka greška je bila 5,6% dok je za validacioni set greška iznosila 2,8%. Ukupne performanse neuralne mreže bile su 92,9%.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Do sada nije bilo studija koje su se bavile uticajem infarkta miokarda na EEG zapis nad medijalnim prefrontalnim korteksom u akutnoj fazi, iako postoje ranije studije koje su ukazivale na postojanje nervnih aferentnih i eferentnih bidirekcionih nervnih puteva između medijalnog prefrontalnog korteksa i srčanog mišića. Ova studija je pokazala da tokom akutnog infarkta miokarda izazvanog izoprenalinom dolazi do značajnih promena u spektralnoj snazi pojedinih frekventnih opsega EEG signala. Porast u snazi beta spektralnog opsega u ranijim studijama povezan je sa povećanim nivoom anksioznosti i reakcijom na stres, pa se rezultati ove studije mogu razumeti kroz prizmu stresogenog uticaja bola/nekroze na kortikalnu aktivnost. U skladu sa tim, prethodna istraživanja, prvenstveno uticaja bola na EEG spektar, pokazala su porast u snazi teta frekventnog opsega kod somatosenzornog i visceralnog bola, što se slaže sa rezultatima ove studije. Porast snage alfa spektra od drugog do četvrtog sata može ukazivati na povećanu koncentraciju i kognitivnu aktivaciju u pokušaju odgovora na signale opasnosti što bi bilo u skladu sa prethodnim studijama koje ukazuju na povišenu alfa aktivnost tokom zahtevnih kognitivnih aktivnosti. Obzirom da su prethodne

studije pokazale da amplituda ST elevacije korelira sa stepenom zahvaćenosti miokarda i stepenom nekroze od značaja je što u ovoj studiji EEG promene pozitivno koreliraju sa amplitudom elevacije ST segmenta. Prisustvo date korelacije dalje potvrđuje vezu ishemije/nekroze miokarda sa EEG promenama registrovanim tokom studije.

Tokom praćenja promena u linearnim HRV EKG parametrima nakon administracije izoprenalina registrovano je povećanje srednje srčane frekvence kao i skraćenje srednjeg RR intervala što je u skladu sa poznatim efektima izoprenalina na beta receptore, ali je efekat bio prisutan u toku celog perioda registracije prvog dana (od prvog do četvrtog časa). Obzirom da je metabolizam izoprenalina izuzetno brz dugotrajan efekat nakon administracije najverovatnije ukazuje na efekat ishemije miokarda pre nego na dejstvo same supstance. Vrednost fraktalne dimenzije je takođe pokazala statistički značajan porast od prvog do četvrtog časa nakon administracije izoprenalina. U prethodnim studijama pokazalo se da je kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom postojao značajan porast fraktalne dimenzije. Mere entropije, sa druge strane, pokazale su značajan pad vrednosti u toku perioda nakon administracije izoprenalina. Ovaj parametar se može tumačiti kao opšti porast pravilnosti u signalu, a što je u ranijim studijama prepoznato kao značajan pokazatelj otklona od fizioloških ka patološkim karakteristikama. Prethodne studije su ukazale na značajan pad vrednosti pokazatelja entropije u apneji u spavanju, HOBP-u i hroničnoj koronarnoj bolesti. Biotički parametri su zamišljeni tako da se sagledavaju kao jedna celina koja ukazuje na prirodu signala, a posebno u smislu neslučajne kompleksnosti inherentne fiziološkim biološkim signalima. Prethodne studije su pokazale da kod patoloških stanja kao što je depresija, psihoza, dolazi do promena u biotičkim parametrima koje ukazuju na smanjenje neslučajne kompleksnosti što je u skladu sa našim rezultatima. Alfa 2 vrednost metode detrendovanih fluktuacija pokazala je statistički značajno smanjenje nakon administracije izoprenalina, dok vrednost alfa 1 nije postigla statističku značajnost. Ranije studije su pokazale da se pad u vrednosti alfa 2 parametra registruje nakon inferiornog infarkta miokarda što je u skladu sa rezultatima ove disertacije. Sa druge strane, u ovoj studiji vrednost alfa 2 parametra se, kao i ostale vrednosti HRV parametara vratila na vrednosti pre administracije izoprenalina nakon 24h.

Rezultati brze Furijeove transformacije EEG signala registrovanih tokom lindanom izazvanih napada su pokazali promene spektra tokom iktalnih epoha koje su konzistentne sa prethodnim saznanjima iz literature koja se bavi patološkim EEG signalom u epilepsiji i drugim stanjima. Ovo je prva studija u literaturi koja se bavi istraživanjem mogućnosti biotičkih parametara za treniranje neuralnih mreža u svrhu automatske detekcije iktalnih

fenomena. Nakon izolovanja biotičkih parametara iz iktalnog i bazalnog EEG signala kao i treniranja neuralne mreže za automatsku detekciju iktalnih epoha dobijeni su rezultati koji su uporedivi sa drugim algoritmima zasnovanim na nelinearnim parametrima u literaturi. Nelinearni parametri su se u dosadašnjoj literaturi pokazali superiorni u odnosu na linearne parametre za automatsku detekciju napada što dodatno ukazuje na moguću vrednost korišćenja biotičkih parametara iznetih u ovoj tezi. Kada je u pitanju predikcija epileptičnih napada, velika većina studija u literaturi se zasniva na analizi EEG signala sa znatno manje studija fokusiranih na mogućnosti predikcije napada korišćenjem EKG zapisa. Zato je od značaja što je u ovoj studiji fokus na HRV parametrima koji se lakše registruju i manje su ispitani. Takođe, rezultati u literaturi pokazuju značajnu disperziju u smislu senzitivnosti i specifičnosti za predikciju napada. Rezultati ove studije koji su zasnovani na logističkoj regresiji i neuralnim mrežama su u skladu sa prethodno objavljenom literaturom i predstavljaju korak dalje u pravcu uspešne implementacije automatizovane detekcije i predikcije epileptičnog napada.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Vorkapić M, Savić A, Janković M, Useinović N, Isaković M, Puškaš N, Stanojlović O, Hrnčić D. Alterations of medial prefrontal cortex bioelectrical activity in experimental model of isoprenaline-induced myocardial infarction. PLoS ONE 2020;15(5): e0232530. **(M22, IF 3,240)**.

Useinović N, **Vorkapić M**, Leković A, Ademović A, Šutulović N, Grubač Ž, Rašić Marković A, Hrnčić D, Stanojlović O Osnovne karakteristike epileptiformnih pražnjenja izazvanih Lindanom kod pacova, Medicinski podmladak 2018; 69(03): str.69-75. 2.

Vorkapić M, Useinović N, Janković M, Hrnčić D, Heart rate variability processing in epilepsy: The role in detection and prediction of seizures and SUDEP, Medicinski podmladak 2018; 69(03): p63-68.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Spektralna, biotička i fraktalna analiza EEG i EKG signala u eksperimentalnim modelima infarkta miokarda i epilepsije“, dr Marka Vorkapića, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja eksperimentalno indukovano infarkta miokarda na EEG signal medijalnog prefrontalnog korteksa, zatim uticaj infarkta miokarda na HRV i mogućnost sticanja novih saznanja o tom uticaju korišćenjem naprednih nelinearnih i

biotičkih metoda analize signala. U eksperimentalno izazvanom modelu epilepsije ova studija je ukazala na značajne spektralne promene iktalnog EEG signala. Izdvojeni su biotički parametri EEG signala koji ranije studije nisu ispitivale i korišćeni su za treniranje neuralne mreže za detekciju epileptičnih napada i dobijene su visoke vrednosti senzitivnosti i specifičnosti. Za predikciju napada na osnovu HRV parametara EKG signala korišćene su neuralne mreže i logistička regresija, gde je logistička regresija pokazala značajnu preciznost u predikciji napada.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila 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 dr Marka Vorkapića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 24.06.2024.

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Olivera Stanojlović

Prof. dr Predrag Mitrović

Prof. dr Aleksandar Ristić

Dr Andrej Savić

Prof. dr Vojin Ilić

MENTORI:

Prof. dr Dragan Hrnčić

Prof. dr Milica Janković
