

НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На седници Научног већа Медицинског факултета у Београду, одржаној
24.06.2019. године, именована је комисија за оцену завршене докторске дисертације
под насловом:

**„Процена структурних и функционалних промена нервног система
код пацијената са Гошеовом болешћу типа 1“**

кандидата др Милана Лакочевића. Ментор је академик Владимир Костић,
коментор проф. др Милан Петаков.

Комисија за оцену завршене докторске дисертације именована је у саставу:

1. Проф. др Јасна Зидверц Трајковић, Медицински факултет у Београду
2. Проф. др Мирјана Платиша, Медицински факултет у Београду
3. Проф. др Мирослав Савић, Фармацеутски факултет у Београду

На основу анализе приложене докторске дисертације, комисија за оцену
завршене докторске дисертације једногласно подноси Научном већу Медицинског
факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација Милана Лакочевића написана је на укупно 90 страна и подељена је на следећа поглавља: увод, циљеви, методологија, резултати, дискусија, закључци и литература. У дисертацији се налази укупно 22 слике и 11 табела. Докторска дисертација садржи резиме на српском и енглеском језику, биографију кандидата, податке о комисији и списак скраћеница коришћених у тексту.

У **уводу** је објашњен лизосомски систем и конститутивни путеви с којима су лизосоми блиско повезани. Наведене су класификације болести накупљања у лизосомима на основу биохемијске природе продуката накупљања и природе молекулског дефицита у

лизосомском систему. Протумачен је молекулски основ Гошеове болести (ГБ). Описана је грађа и еволуција гена *GBA1* и псеудогена ψ *GBA1*. Детаљно је приказана пост-транслациона обрада лизосомске β -гликоцереброзидазе. Дат је прегледан клинички аспект типова 1, 2 и 3 ГБ.

Циљеви рада су прецизно дефинисани. Рад је предузет с циљем да се код оболелих од Гошеове болести типа 1 без клиничких неуролошких манифестација докажу функционалне промене у централном нервном систему (ЦНС), такође да се утврди да ли у ЦНС-у постоје и структурне промене, као и да се испита повезаност функционалних промена у нервном систему и полних хормона.

У поглављу **методологија** наведено је да се ради о студији пресека која је спроведена у Клиничком центру Србије. Подробно су описани: одабир пацијената, одређивање каталитичке активности β -гликоцереброзидазе, анализа гена *GBA1*, позитронска емисиона томографија мозга по протоколу за статичку студију мозга, функционална магнетна резонанција мозга током извођења моторичког задатка, морфометрија и волуметрија мозга, соматосензорни потенцијали изазвани електричном стимулацијом *n. medianus*-а обе руке и радиоимунолошка анализа. Ова студија спроведена је у складу са Хелсиншком декларацијом и одобрена од стране Етичке комисије Медицинског факултета Универзитета у Београду.

У поглављу **резултати** детаљно су описани и јасно представљени сви добијени резултати.

Дискусија је написана јасно и прегледно, уз приказ података других истраживања са упоредним прегледом добијених резултата докторске дисертације.

Закључци сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада. Коришћена **литература** садржи списак од 138 референци.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

Код испитаника оболелих од типа 1 ГБ измерена резидуална вредност активности лизосомске β -гликоцереброзидазе кретала се у распону од 0,5 до 3,14 nmol/mg/h. У анализованим кодирајућим регионима гена *GBA1* пронађене су следеће промене појединачног нуклеотида: с.256C>G, с.475C>T, с.754T>A, с.968A>G (слика 3), с.1226A>G, с.1246G>A, с.1342G>C, с.1448T>C, с.1505G>A. Такође су детектоване две

делеције: c.1236_1317del82bp и c.1265_1319del55bp. Поред тога, откривена су и два вишеструко мутирана алела: [c.882T>G; c.1342 G>C] и [c.1448T>C; c.1483G>C; c.1497G>C]. Укупно је нађено 12 различитих сложених хетерозиготних мутација, при чему су сви пацијенти са ГБ типа 1 на једном алелу имали супституцију c.1226A>G. Пронађена је и једна хомозиготна мутација са променом c.1226A>G на оба алела.

Код свих пацијената са типом 1 ГБ, визуелном и квантитативним анализом појединачних налаза регистрован је снижен метаболизам гликозе у регионима коре мозга, базалним ганглијама, možданом стаблу и церебелуму. Групном СПМ анализом ¹⁸F-ФДГ-ПЕТ налаза код пацијената са ГБ типа 1 без клиничких неуролошких манифестација добијен је образац регионалног метаболизма гликозе који карактерише хипометаболизам у: кори мозга обострано фронтално (највише медијално, предњи цингулум, инсуларно), фронтно-паријетално (перицентрално – сензомоторни кортекс), темпорално (мезијално и латерално), стријатуму, таламусу, možданом стаблу (најизраженије у средњем мозгу), церебелуму (изреженији у вермису него у хемисферама). Групном анализом помоћу генералног линеарног модела примењеног на фМР снимке добијене при извођењу моторног задатка, утврђено је да су код пацијената активирани региони: сензомоторни кортекс и суплементарна моторна ареа обострано, таламус само десно, церебелум, док стријатум није активиран. Статистички значајно нижа активација код оболелих у односу на здраве испитанике утврђена је у шест региона (кластера). Морфометрија кортекса показала је на левој хемисфери мозга сигнификантно мању дебљину кортекса код оболелих у пет кластера, на десној хемисфери мозга у једном кластеру. Одређивањем волумена субкортикалних сивих маса, сигнификантна мања запремина код пацијената у односу на здраву контролну групу утврђена је само у путамену обострано.

Соматосензорни потенцијали изазвани на *n. medianus*-у обострано показали су да нема разлике латенци пикова између оболелих и здравих испитаника по свим параметрима (N9, N11, N13, N20, P25, N20-N13, P25-N13, P25-N20), али у контролној групи здравих постоји значајна разлика по полу од N9 до P25, док се код пацијената та разлика по полу завршава на N13 и губи се на N20 и P25. У групи здравих, једино је статистички сигнификантна повезаност централног времена спровођења (N20-N13) и концентрације тестостерона код мушкараца. Код оболелих, значајна негативна корелација латенци и концентрација тестостерона постоји само код пацијенткиња и то на периферији (N11,

N13). Само код оболелих мушкараца сигнификантна је негативна корелација централног времена спровођења (N20-N13) и концентрације естрадиола. У контролној групи здравих жена значајна је позитивна повезаност латенце N13 и концентрације естрадиола, док је код пацијенткиња значајна негативна повезаност латенце N9 и концентрације естрадиола.

В) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе

По важећој општеприхваћеној подели ГБ на три типа, успостављеној 1972. године, обавезан критеријум за постављање дијагнозе типа 1 је да нема знакова захваћености ЦНС-а. Међутим, од последње деценије XX века запажено је да се код мање од 2,5 одсто пацијената са типом 1 јавља паркинсонизам. Од 2004. године изнето је и експертско мишљење да је ГБ исправније окарактерисати као континуум феноטיפова, од којих неки пркосе класификацији у класична три типа, али да је можда, најрелевантнија разлика у томе што је код неких пацијената са ГБ захваћен нервни систем а код других није. Таквом догматском становишту супротставља се ова дисертација. Будући да све еукариотске ћелије, укључујући и неуроне, садрже лизосоме у којима се одвија катаболизам сфинголипида, изведена је хипотеза да због дефицијентне активности β -гликоцереброзидазе последичне промене настају и у ЦНС-у пацијената са типом 1 ГБ без паркинсонизма (скоро 98% оболелих), упркос непостојања клиничких неуролошких манифестација. Осмишљено је да упориште за пружање доказа буде у функционалној неуровизуализацији методом ^{18}F -ФДГ-ПЕТ. Додатно је аргументовано методом фМР. До сада оваквих истраживања није било. Резултати истраживања потврђују постављену хипотезу. Чак је изненађујућа дискрепанца између непостојања јасних клиничких показатеља мождане дисфункције и широких зона хипометаболизма на ^{18}F -ФДГ-ПЕТ-у код пацијената са ГБ типа 1 без неуролошких знакова, и то већ у стању мировања, будући да у мозгу здравих људи постоји пропорционални однос између можданих функција и метаболизма гликозе. Зашто нема клиничких неуролошких испољавања аутор дисертације образлаже пластичношћу доказаном и у адултном ЦНС-у, да се захваљујући реорганизацији синапса мозак пацијената са типом 1 ГБ адаптира на хипометаболичке услове тако да се не достиже критички праг оштећења, па стога нема клиничких неуролошких манифестација. Зашто се при истим комбинацијама сложених хетерозиготних мутација у *GBA1*, чак и када се ради о монозиготним близанцима, поставља дијагноза различитих типова ГБ, тип 1, без клинички манифестних неуролошких знакова, и тип 3,

код ког се неуролошки знаци клинички јасно показују, шта је разлог што је код типа 3 капацитет неуропластицитета исцрпљен а код типа 1 није, аутор темељно објашњава каузалитет фенотипских разлика деловањем генā модификатора преко четири основна механизма – променама у пенетранцији, експресивности, доминантности, и/или плеотропији, као и различитим епигенетским статусом, наводећи бројне релевантне референце.

До сада је спроведено само једно мултимодално неурофизиолошко испитивање (укључујући ССЕР) код одраслих особа са типом 1 ГБ. Овом дисертацијом су потврђени такви налази, али се отишло и даље. Откривено је да постоје полне разлике – краће латенце и код здравих и код оболелих жена у односу на мушкарце, које до сада уопште нису биле примећене. Затим, у контролној групи здравих уочена је значајна разлика латенци по полу од N9 до P25, док се код оболелих од типа 1 ГБ та разлика губи на N20 и P25. Дакле, на нивоу ЦНС-а полни диверзитет постоји и у патофизиолошком механизму ГБ типа 1. Ради разумевања тог механизма у ово истраживање је уведено испитивање полних хормона, што такође до сада није рађено. Утврђено је да је код жена сигнификантна корелација латенци и концентрација полних хормона само на периферији. Код здравих жена значајна је једино позитивна корелација са естрадиолом. И код оболелих жена је значајна, али негативна, а негативна је и са тестостероном, што је новина у односу на здраве. Код мушкараца, значајна је само повезаност централног времена спровођења ССЕР и концентрација полних хормона. Важан налаз је да код здравих мушкараца постоји негативна корелација са концентрацијом тестостерона, док је код оболелих мушкараца корелација негативна, али са другим полним хормоном – естрадиолом. Аутор дисертације своје налазе тумачи у односу на најновија експериментална сазнања о исходишту и дејству полних хормона у физиолошким и патолошким стањима, и на основу тих чињеница налази објашњења за тип 1 ГБ.

Г) Објављени рад који чини део докторске дисертације

Lakočević M, Platiša M, Šumarac Z, Suvajdžić N, Mačukanović L, Petakov M. Peripheral neural response and sex hormones in type 1 Gaucher disease. *J Med Biochem* 2019;38:1–5. DOI: 10.2478/jomb-2019-0020 (IF 2.00)

Д) Закључак (образложење научног доприноса)

Докторска дисертација „Процена структурних и функционалних промена нервног система код пацијената са Гошеовом болешћу типа 1“ Милана Лакочевића је пионорски рад који предствља озбиљан научни допринос разумевању праве природе Гошеове болести типа 1.

Ова докторска дисертација урађена је према свим принципима научног истраживања. Циљеви су прецизно дефинисани, научни приступ је оригиналан и брижљиво изабран, методологија рада је савремена. Резултати су прегледно и систематично приказани и дискутовани а из њих је су изведени одговарајући закључци.

На основу свега наведеног, и имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, комисија предлаже научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду да прихвати докторску дисертацију Милана Лакочевића и одобри њену јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду, 12.07.2019.

Чланови комисије:

Проф. др Јасна Зидверц Трајковић

Проф. др Мирјана Платиша

Проф. др Мирослав Савић

Ментор:

Академик Владимир Костић

Проф. др Милан Петаков
