

## **НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На седници Научног Већа Медицинског факултета у Београду, одржаној дана 15.03.2018. године, број 5940/15-ЈР, именована је Комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом:

**„Карактеризација механизма дегенерације фоторецептора након аблације ретине;  
евалуација анатомског и функционалног постоперативног опоравка“  
(Characterization of the Mechanisms of Photoreceptor Degeneration during Retinal  
Detachment; the Evaluation of Postoperative Anatomical and Functional Recovery)**

Кандидата др **Јелене Потих**, запослене на Клиници за очне болести, Клиничког центра Србије, као специјалиста офталмологије. Ментори су Проф. Yvan Arsenijvic, неуробиолог, професор Медицинског факултета Универзитета у Лозани, Швајцарска и Проф. Thomas Wolfensberger, офталмолог, професор Медицинског факултета Универзитета у Лозани, Швајцарска.

Комисија за оцену завршене докторске дисертације именована је у саставу:

1. Академик Проф. Др Владимир Бумбаширевић, хистолог и ћелијски биолог, професор Медицинског факултета Универзитета у Београду
2. Проф. Др Татјана Пекмезовић, епидемиолог, професор Медицинског факултета Универзитета у Београду
3. Проф. Др Миленко Стојковић, офталмолог, професор Медицинског факултета Универзитета у Београду
4. Проф. Др Драган Вуковић, офталмолог, професор Медицинског факултета Универзитета у Београду
5. Prof. Francis Munier, офталмолог, професор Медицинског факултета Универзитета у Лозани, Швајцарска

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 под називом „Карактеризација механизма дегенерације фоторецептора након аблације ретине; евалуација анатомског и функционалног постоперативног опоравка“ (Characterization of the Mechanisms of Photoreceptor Degeneration during Retinal Detachment; the Evaluation of Postoperative Anatomical and Functional Recovery) садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви рада, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Дисертација је написана на 161 страни и садржи 18 табела, 10 графикана и 10 слика. У последњем поглављу је изнет преглед литературе која је цитирана у докторској дисертацији и садржи 278 навода и списак скраћеница коришћених у тексту. Докторска дисертација је написана на енглеском језику, садржи сажетак на енглеском и српском језику, биографију кандидата, податке о Комисији и прилоге.

**УВОД** се састоји од три целине. У првој целини је описана анатомија ока уопштено, као и хистологија ретине, са посебним освртом на фоторецепторе и ретинални пигментни епител. Друга целина описује аблацију ретине; обухватајући поделу аблација ретине, усмеравајући се уже на регматогене аблације ретине. Детаљно је објашњена епидемиологија, фактори ризика, узроци, патофизиологија и могућности лечења регматогене аблације ретине. Трећа целина истиче значај истраживања аблација ретине.

**ЦИЉЕВИ РАДА** су јасно дефинисани и подразумевају истраживање протеина ћелијског циклуса, као и других путева ћелијске смрти фоторецептора код аблација ретине, карактеризацију постоперативног анатомског опоравка након аблације ретине користећи 3Д системе визуализације ретине, као и предности *in vivo* визуализације фоторецептора. Циљеви су такође подразумевали истраживање постоперативног

функционалног опоравка болесника са аблацијом ретине као и истраживање квалитета живота код ових болесника, користећи валидирани упитник NEI VFQ-13.

**МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** обухватају детаљно описане процедуре које су коришћене у прикупљању материјала и експерименталном раду, као и детаље прикупљања болесника. Састоји се из две целине. У овом поглављу је детаљно објашњено да је ова докторска дисертација састављена из три дела: клиничког, епидемиолошког и лабораториског. Прва целина односи се на клинички и епидемиолошки део студије, где је наведено да докторска дисертација представља обсервациону, проспективну, нерандомизовану кохортну студију спроведену на Клиници за очне болести Jules-Gonin у Лозани, Швајцарска, у периоду од фебруара 2015. године до марта 2017. године. Студија је спроведена уз одобрење Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Београду (Бр 29/ П-31) као и Етичког комитета Кантона Во у Швајцарској (бр 483/14) уз писмену сагласност свих испитаника. У студију су били укључени сви болесници са примарном регматогеном аблацијом ретине, лечени на Одељењу за витреоретиналну хирургију, њих 194. Свим болесницима је детаљно објашњена студија и њени циљеви. Фактор укључења у студију је: сви болесници са примарном регматогеном аблацијом ретине. Фактори искључења из студије су били следећи: болесници који нису у стању да одлуче о свом пристанку, болесници млађи од 18 година и старији од 99 година, болесници са аблацијом ретине која траје дуже од 30 дана, болесници са придруженим офталмолошким тегобама: васкуларне оклузије ретиналне вене или артерије, дијабетичка ретинопатија, сенилна дегенерација макуле, пролиферативна витреоретинопатија градус Ц или виши). Болесници су прегледани пре операције, као и 1, 3 и 6 месеци након операције аблације ретине. Следећи параметри су праћени: најбоља коригована видна оштрина, преглед задњег сегмента на биомикроскопу, оптичка кохерентна томографија, ултразвучна дијагностика, *in vivo* фотографисање фоторецептора помоћу технологије адаптив оптикса (*adaptive optics*). Свим болесницима је такође био подељен упитник о квалитету живота у вези са видном функцијом (NEI VFQ-13), препшеративно, као и 1, 3, 6 месеци након операције аблације ретине. Болесници су били подељени у две групе: који су имали аблацију ретине са захваћеном макулом и болесници са аблацијом ретине са незахваћеном макулом. На крају, наведени су тестови коришћени за статистичку обраду података.

Друга целина се односи на експериментални део студије, која је спроведена у складу са одобрењем Етичког комитета Медицинског факултета Универзитета у Београду (бр 29/ П-31) и у складу са одобрењем Етичког комитета кантона Во, Швајцарска (бр 340-15). Експерименти су рађени на пост-мортем хуманим ретинама које су добијене након дисекције рожњаче за Банку рожњаче. Истраживање је спроведено у лабораторији Истраживачког центра Клинике за очне болести Jules-Gonin у Лозани, Швајцарска (Unit of Gene Therapy and Stem Cell Biology) у периоду од фебруара 2015. до марта 2017. године. Експлант хумане ретине су припремљени као *in vitro* модел аблације ретине, подељени такође у две групе: ретнални експлант без ретиналног пигментног епитела, који су имитирали аблацију ретине, и ретинални експлант са сачуваним ретиналним пигментним епителом, који су представљали контролну групу. Имунохистохемијске анализе (CDK4, TUNEL, DAPI, H3K27me3, AIF, caspase-3) су извршене према стандардном протоколу, на криосекцијама дебљине 14  $\mu\text{m}$ . На крају су описане методе коришћене за статистичку анализу података.

**РЕЗУЛТАТИ** су приказани на 100 страна, јасно и детаљано, кроз 16 табела, 10 графикана и 10 слика. Резултати су подељени у 5 целина: клинички аспект аблације ретине, квалитет живота код болесника са аблацијом ретине, клиничке „имицинг“ технике код болесника са аблацијом ретине (оптичка кохерентна томографија) и новине, експериментални „имицинг“ код болесника са аблацијом ретине: адаптив оптикс, експериментално базично истраживање на хуманом *in vitro* моделу аблације ретине. У свим целинама резултата све табеле, графикони и слике су праћени текстом, чији садржај у потпуности одговара садржају прилога. Резултати су приказани на јасан и концизан начин. Резултати су дали јасне одговоре на постављене циљеве.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидат је на свеобухватан и детаљан начин повезао своје резултате са резултатима других аутора. На основу тога, кандидат је изнео своје закључке и хипотезе, који објашњавају резултате ове докторске дисертације у складу са резултатима већине других аутора који имају исти научни интерес. Значајан допринос представља утврђивање промене квалитета живота после операције аблације ретине код болесника са захваћеном и незахваћеном макулом, као и документовање промене густине фоторецептора после операције болесника са аблацијом ретине са незахваћеном макулом. Значајан допринос представља утврђивање различитих путева ћелијске смрти

фоторецептора у зависности од дужине трајања аблације ретине, на хуманом *in vitro* моделу аблације ретине. У овом делу су наведене предности и недостаци спроведених студија, са критичким освртом на ограничења презентованих истраживања.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** наведени су најзначајнији закључци који су потпуно у складу са добијеним резултатима и наведеним циљевима истраживања. Приказано је да су псеудофакија и краћа аксијална дужина ока повезани са настанком аблације ретине са захваћеном макулом. Утврђено је да постоји статистички значајна разлика, како у композитном скору, тако и у подскалама за мерење квалитета живота (социоемоционална подскала и подскала функционисања у вези са видом) између болесника са аблацијом ретине са захваћеном и незахваћеном макулом. Најизаженије промене су забележене у социоемоционалној подскали. Ово је веома важно јер, иако постоји добар анатомски постоперативни успех, као и добра постоперативна видна оштрина (која представља један део видне функције), болесници се и даље жале на постоперативне сметње у виду, што може имати значајне последице на независност и мобилност болесника. Оптичка кохерентна томографија (ОЦТ) је омогућила утврђивање и дефинисање нове, посебне подгрупе аблација ретине, са делимично одлуженом макулом (хеми-макуларна аблација), која се јавља у око 4.4% болесника са примарном регматогеном аблацијом ретине. У овој студији су по први пут утврђене промене у дебљини хориоиде код болесника са аблацијом ретине, у субфовеалном и субмакуларном региону. Дебљина хориоиде је варијала, у зависности од простирања и типа аблације ретине, како пре, тако и након оперативног лечења. Чак и три месеца након успешне операције аблације ретине, и без уочљивих промена у слојевима ретине на ОЦТ-у, алтерације у мозаику фоторецептора (пре свега чепића) су уочене, а нарочито код оних болесника који су имали аблацију ретине са захваћеном макулом. Ове промене уочене су помоћу адаптив оптикса. Насупрот очекивањима, забележено је смањење густине чепића након операције и код болесника са незахваћеном макулом, иако је дошло до опоравка три месеца након операције. У фундаменталном истраживању, пик TUNEL-позитивних ћелија је уочен након 3 дана *in vitro* (ДИВ), који је био праћен пиком AIF-позитивних ћелија. Ова појава указује да највероватније AIF учествује у активирању првих путева ћелијске смрти. H3K27me3 позитивне ћелије су присутне са пиком након 5ДИВ, који се одржава и након 7ДИВ,

указујући да се у каснијем периоду у пут ћелијске смрти укључују и епигенетске модификације.

У поглављу **ЛИТЕРАТУРА** наведено је 278 библиографских јединица из страних публикација које су цитиране према општеприхваћеним стандардима. Литература је адекватна и савремена.

## **Б. Кратак опис постигнутих резултата:**

У студији је учествовало 52.6% болесника са аблацијом ретине са захваћеном макулом (макула-ОФ АР). Просечна старост болесника износила је  $63.9 \pm 12.0$  vs.  $59.7 \pm 11.2$  година у групи са макула-ОФ, одн. макула-ОН АР (болесници за аблацијом ретине са незахваћеном макулом). Било је 129 мушкараца (66.5%) и 65 (33.5%) жена. Статистички значајно више су биле заступљене десне очи (десне очи: леве очи 123 (63.4%) vs. 71 (36.6%),  $p=0.000$ ). Статистички значајно више болесника са миопијом ( $<-3D$ ) је имало макула-ОН АР ( $p=0.04$ ). Факни болесници су били значајно више заступљени у кохорти (55.7%), а такође значајно више болесника са факним очима су презентовали макула-ОН АР ( $p=0.01$ ). Мултиваријантна анализа је показала да су псеудофакија и очи са аксијалном дужином (АЛ)  $< 25mm$  ( $p=0.06$ ) независни предиктивни фактор за настанак макула-ОФ АР ( $p=0.02$ ), док пол и страна (десно/лево) не представљају фактор ризика за захваћеност макуле. Видна оштрина (ВО) је била статистички значајно различита између макула-ОФ и макула-ОН АР преоперативно:  $2.0[2.3-0.95]$  vs  $0[0.1-0]$ ; након месец дана (М1)  $0.35[0.5-0.1]$  vs  $0.05[0-0.1]$  и након три месеца (М3)  $0.25[0.3-0.1]$  vs  $0[0-0]$ .

47 болесника је попунило упитник NEI-VFQ-13 (26 макула-ОН и 21 макула-ОФ) у свим временским интервалима (пре операције, М1, М3-М6). У макула-ОФ групи, скорови квалитета живота (КвЖ) су се побољшали након М1 у односу на пре операције, а ово побољшање се наставило и након М3-6. У макула-ОН групи, скор КвЖ се погоршао након М1, али се поправио након М3-6. Преоперативно, уочена је значајна разлика у КвЖ између макула-ОН и макула-ОФ група ( $p<0.03$ ), а најосетљивија подскала за ове промене је била ССЕС (скраћена социоемотивна скала). Након М1 није уочена значајна разлика између група. Након М3-6 поново је уочена значајна разлика између група, како у композитном скору (КС) тако и у ССЕС подскали ( $p=0.03$ ,  $p=0.002$ ), али не и у ССВФ (скраћена скала видне функције) ( $p=0.10$ ). Значајано побољшање у ВО у макула-ОФ групи кроз

постоперативно праћење се подударало са побољшањем у КвЖ, иако није забележена статистичка значајност. У макула-ОН групи, забележено је статистички значајно побољшање у ВО између М1 и М3-6 ( $p=0.03$ ), што се подударало са значајним побољшањем ССЕС скорa ( $p=0.006$ ). Преоперативно, ВО и КвЖ нису показали значајну повезаност ( $R^2 < 0.20$ ). Постоперативно, у макула-ОФ групи, присутна је позитивна корелација између ВО и КвЖ, највише изражена након М3-6 и то у ССЕС подскали ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.58$ ). У макула-ОН групи уочена је позитивна корелација између ВО и ССФВ након М3-6 ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.41$ ).

Код ХМАР (хеми-макуларна аблација ретине) преоперативно, субретинална течност (СРТ) формира циркуларно субфовеални џеп ( $85 \pm 85 \mu\text{m}$ ), снижавајући се код периферне ивице фовее ( $82.9 \pm 55.4 \mu\text{m}$ ;  $200 \mu\text{m}$  од фовее). Плитка АР перзистира парацентрално ( $113.2 \pm 66.4 \mu\text{m}$  на  $500 \mu\text{m}$  од фовее) до васкуларне аркаде, када се висина СРТ нагло повећава ( $548.1 \pm 348.8 \mu\text{m}$  на  $3000 \mu\text{m}$  од фовее). Постоперативна ВО је износила  $0.1[0.2-0.0]$  logMAR, иако су се болесници жалили на сметње у виду. Хипорефлексивне зоне у нивоу елипсоидног слоја ретине биле су видљиве на АнФас ОЦТ-у, правећи отисак на месту некадашње ивице АР, на короналним снимцима.

Код периферних АР, разлика између оперисаног и неоперисаног ока у дебљини хориоиде (ДХ) субфовеоларно је показала задебљавање током периода праћења (преоперативно:  $19.6\% \pm 43.9$ , М1:  $22.9\% \pm 27.5\%$ , М3:  $18.2\% \pm 35.6\%$ ). Насупрот овоме, код парацентралних АР, уочена разлика између оперисаног и неоперисаног ока у ДХ субфовеално показала је истањење хориоиде у односу на здраво, неоперисано око (преоперативно:  $-7.8\% \pm 21.9$ , М1:  $-5.5\% \pm 26.1$ , М3:  $-9.3\% \pm 19.4$ ). Макула-ОФ АР праћене су значајним истањењем ДХ субфовеално и М1 ( $-14.1\% \pm 18.7\%$ ) и након М3 ( $-9.9\% \pm 15\%$ ). Разлика између оперисаног и здравог, неоперисаног ока у ДХ мерено субфовеално између периферних макула-ОН АР и парацентралних макула-ОН АР као и између периферне макула-ОН АР и макула-ОФ АР, била је статистички значајно другачија на М1 ( $p=0.00$ ,  $p=0.00$ ) и М3 ( $p=0.00$ ,  $p=0.00$ ).

Помоћу адаптив оптикса (АО) уочено је да је густина чепића стабилна/непромењена кроз време (М1 и М3) код неоперисаног здравог ока ( $p=0.67$ ); снижена код оперисаних очију ( $p < 0.05$ ); повећана постоперативно код макула-ОН АР

( $p=0.02$ ), али не и у макула-ОФ групи ( $p=0.97$ ). ВО и тип АР су независно позитивно повезани са густином чепића ( $p=0.004$ ,  $p=0.000$ ).

Потврђено је да *in vitro* модел хумане АР имитира кинетику ћелијске смрти која је описана на *in vivo* моделима. Број ТУНЕЛ-позитивних ћелија, ако се упореди након 1 дан *in vitro* (1 ДИВ) и 7 дана *in vitro* (7 ДИВ) се повећао са временом у ретиналном експланту са РПЕ (1ДИВ:  $1.50\pm 0.00$  vs 7ДИВ:  $7.67\pm 0.00$ ) и без РПЕ (1ДИВ:  $2.83\pm 1.03$  vs 7ДИВ:  $15.84\pm 1.73$ ,  $p=0.02$ ), а пик позитивности је забележен након 3ДИВ (саРПЕ:  $0.75\pm 0.30$  vs безРПЕ:  $11.83\pm 6.68$ ). CDK4-позитивне ћелије су биле слабо присутне у обе групе након 1 ДИВ (саРПЕ:  $0.00\pm 0.00$  vs безРПЕ:  $2.01\pm 0.75$ ,  $p=0.02$ ), и након 7 ДИВ (саРПЕ:  $1.58\pm 0.12$  vs безРПЕ:  $4.73\pm 0.86$ ,  $p=0.02$ ). НЗК27 $me^3$  позитивне ћелије су биле присутне све време, али су највише биле изражене након 5ДИВ (саРПЕ  $1.35\pm 0.08$  vs. безРПЕ  $12.68\pm 2.06$ ). АИФ позитивне ћелије су биле слабо присутне након 1ДИВ, док су након 3ДИВ достигле свој максимум, пратећи пик TUNEL – позитивних ћелија.

## **В. Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима литературе**

У докторској дисертацији је обрађена тема аблација ретине са више аспеката: клиничког, епидемиолошког и експерименталног. Аблације ретине, које имају иначе нагли почетак, неминовно воде слепилу уколико се не оперишу на време. Основна хипотеза пројекта је била да се дефинише да ли ће боља карактеризација протеина ћелијског циклуса и фактора апоптозе *in situ*, као и ћелијске морфологије аблације ретине, помоћи у предвиђању постоперативног анатомског и функционалног опоравка и, следствено томе, болесниковог квалитета живота.

У овој проспективној студији анализирано је 194 болесника са примарном аблацијом ретине (АР). Болесници су били подељени у групе у зависности од захваћености макуле (са захваћеном макулом: макула-ОФ, са незахваћеном макулом: макула-ОН), што је потврђено преоперативним ОЦТ-ом. У обе групе, значајно више заступљене су биле десне очи ( $63.4\%$  vs.  $36.6\%$ ) и АР се јављала дупло чешће код мушкараца него код жена. Поред тога, униваријантна анализа је показала позитивну корелацију између година, статуса сочива, аксијалне дужине очне јабучице и сферног еквивалента са АР, док је



мултиваријантна анализа показала да су краћа аксијална дужина ока и псеудофакија били једини независни фактори ризика за настанак макула-ОФ АР.

Такође, код 4.4% болесника са АР, идентификована је посебна нова подгрупа АР: хеми-макуларна аблација ретине (ХМР). У тези су описане клиничке карактеристике ХМР, која има посебан преоперативни облик: субфовеални цеп испуњен субретиналном течношћу (СРТ) који постаје булозан изван васкуларних аркада, и посебан постоперативни „жиг“ који је видљив у елипсоидном слоју ретине и на АнФас ОЦТ-у.

Посебне карактеристике ОЦТ-а помогле су у описивању и детектовању различитих путања еволуције и опоравка хориоиде у зависности од врсте АР. На овај начин, отворена су врата многим субклиничким и физиолошким питањима на која и даље не постоји одговор. У овој дисертацији показано је да код периферних макула-ОН АР, дебљина хориоиде (ДХ) субфовеално је дебља током периода праћења у поређењу са другим, здравим оком (интер-окуларна разлика; оперисано око – здраво око). Код парацентралних макула-ОН АР, субфовеално, ДХ је тања у поређењу са другим, здравим оком. Код макула-ОФ АР, уочено је значајно истањење ДХ субфовеално, у поређењу са здравим оком, након М1 и М3. Интерокуларна разлика у субфовеалној ДХ између периферне макула-ОН АР и парацентралне макула-ОН АР и између периферне макула-ОН АР и макула-ОФ АР је била статистички значајна након М1 ( $p=0.00$ ,  $p=0.00$ ) и након М3 ( $p=0.00$ ,  $p=0.00$ ).

Узимајући у обзир заједно све клиничке резултате, уочено је да је макула-ОФ АР значајно ређе била заступљена код средњих и високих миопа. Такође, аксијална дужина ока  $>25$ мм је значајно ређе измерена код макула-ОФ АР. Постоје бројни разлози који би могли да буду укључени у ову појаву. Ови разлози су детаљно продискутовани у одговарајућем поглављу. Интересантно је споменути да си болесници са високом миопијом боље информисани о симптомима АР током стандарног клиничког прегледа и неге. Такође, тања хориоида можда може да спречи перфузију ретине, и следствено томе, то може инхибирати акумулацију СРТ, што за последицу има спорију прогресију АР. Овим се може објаснити да негативна корелација између аксијалне дужине и дебљине хориоиде могу утицати на вишу стопу појаве макула-ОФ АР код краћих очију. (Flores-Moreno, Lugo et al. 2013, Alshareef, Khuthaila et al. 2017, Iwase, Kobayashi et al. 2017, Sayman Muslubas, Hocaoglu et al. 2017)

Могућност прегледа фоторецептора *in vivo* отворила је могућност детекције и евалуације субклиничких промена код обољења ретине и стога повећала могућност разумевања, објашњења и чак можда и предикције функционалног опоравка. По први пут, у овој дисертацији, код болесника са АР корошћен је експериментални „имицинг“, адаптив оптикс камера током постоперативног опоравка. На прецизан и веома добро дефинисан начин (детаљно објашњено у одговарајућем поглављу тезе), праћени су чепићи и анализирани исте регије од интереса (РОИ) код једног ока кроз време, повезујући их са кореспондирајућим РОИ између оперисаног и здравог ока. У циљу елиминације „noise“, по први пут је предложен нови начин приказа и анализе резултата: као интерокуларна разлика (оперисано око-здрavo око). Интерокуларна разлика је раније коришћена код неких студија глаукома и ретко код неких извештаја о хирургији руптура макуле. Широко распрострањена употреба интерокуларне разлике је остала по страни. Ово је веома важно код асиметричних болести, као што је АР. У циљу провере и обезбеђивања сигурности у методологију коришћену приликом анализе адаптив оптикса (АО), анализирана је стабилност густине чепића код здравих, неоперисаних очију. Мерено помоћу АО, густина чепића је била стабилна код здравих очију између М1 и М3. Као што се и очекивало, густина чепића је била смањена код оперисаних очију у поређењу са неоперисаним. Супротно очекивањима, густина чепића је била снижена такође и код макула-ОН АР након М1. Током 3 месеца праћења, густина чепића се повећала код макула-ОН АР, али не и код макула-ОФ АР. Видна оштрина (ВО) и врста АР (захваћеност макуле) су били независно позитивно корелирани са густином чепића.

По први пут, у овој студији, алтерација у топографији чепића су уочене чак и код макула-ОН АР након парс плана витректомије (ППВ) са тампонадом гасом. Ово неочекивано прво смањење након М1 од ППВ, а потом и повећање након М3, у густини чепића код макула-ОН АР је најконтроверзније. Неколикоо механизма би могло да објасни ова резултате. У ранијим студијама на здравим испитаницима, „нестајање“ чепића на АО је објашњено Стајлс-Крафордвим феноменом (Stiles-Crawford effect), тачније, да би чепић могао да се детектује помоћу АО, неопходно је је упадни угао светлости на чепић прав - од 90°. (Stiles and Crawford 1933, Roorda, Romero-Borja et al. 2002, Miloudi, Rossant et al. 2015, Morris, Blanco et al. 2015) Код АР, фоторецептори су одвојени од ретиналног пигментног епитела (РПЕ), због чега они мењају своју оријентацију и распоред у простору

(spacing). Чак и код периферних макула-ОН АР, „истезање“ фоторецептора се преноси са периферије ка макуларној регији, тј ка фовеи. Овај „неред“ кдо фоторецептора се највероватније јавља због промена у њиховој поларности. Све наведено доводи до смањене детектабилности чепића путем АО, код обе групе, и макула-ОН и макула-ОФ АР. Овај стрес може имати два узрока, тј у његовој основи може бити сама болест (због саме АР) и јатрогени узрок, тј као последица хирургије. Сви анализирани болесници су оперисани помоћу ППВ са тампонадом гасом. Још увек је непознато какав је утицај саме витректомије на чепиће, а не зна се ни утицај тампонирајућих супстанци које су током одређеног временског периода у сталном контакту са ретином. Да би се боље карактерисали и објаснили ови механизми, потребно је још *in vivo* истраживања (са АО камером). Објашњење за „опоравак“ чепића три месеца након ППВ код макула-ОН АР може се наћи у студији Хагемана и сарадника, који је доказао да интерфоторецепторски (између чепића пре свега) матрикс веома чврсто адхерира за РПЕ; чепићи иако истегнути али и даље спојени са РПЕ, могу дати утисак повећања густине чепића са временом. (Hageman, Marmor et al. 1995) Три месеца након ППВ, чепићи поново заузимају свој положај и поново постају детектабилни за АО камеру. (Roorda, Romero-Vorja et al. 2002, Roorda and Williams 2002, Morris, Blanco et al. 2015)

Такође, виталност чепића и њихово поновно заузимање свог положаја може да буде повезано и са хориоидалном перфузијом, с обзиром да се спољашњи слојеви ретине исхрађују из хориоиде (метаболичка размена). (Forrester, Dick et al. 2015) Различити путеви хориоидалне перфузије и последично реакције хориоиде на различите врсте АР, као што је већ описано, могу да утичу такође на постоперативни опоравак чепића. Неопходно је ову тему даље дубље истражити у будућим студијама, у циљу праћења субклиничких промена у фоторецепторима и хориоидеи а све у циљу предикције постоперативног функционалног опоравка.

Све наведено има велики утицај на квалитет живота болесника са АР. Чак и након одличног постоперативног анатомског успеха (потпуно налегла ретина), видна функција није увек најбоља. Разлози за постоперативне видне сметње се могу објаснити клиничким резултатима ове тезе. Да би се боље разумео утицај АР на свакодневни живот болесника и њихову способност да се врате нормалним дневним активностима, ипитаницама је подељен и анализиран упитник NEI VFQ-13, у различитим временским периодима. С обзиром да је

у овом упитнику, који представља скраћену верзију упитника NEI VFQ-25, који је широко распрострањен, испоштован концепт унидимензионалности, као и одговарајуће interval-level мерење, у тези је анализиран композитни скор и скор подскала. Преоперативно, болесници са макула-ОН АР су били „најмање узнемирени“, што је било статистици значајно у поређењу са болесницима са макула-ОФ АР. Као што се и очекивало, болесници са макула-ОФ АР су се опорављали у постоперативном периоду праћења, што се поклапало са побољшањем ВО. Код болесника са макула-ОН АР, пацијенти су били незадовољни месец дана након операције, и поред тога што њихова ВО се није значајно променила. Међутим то је прошло на контроли након три месеца. Веома је важно истаћи да су најизраженије промене забележене у социоемоционалној подскали, а не у подскали видне функције. Први пут, у овој тези је коришћена скраћена верзија упитника NEI VFQ-25, тј. NEI VFQ-13. По први пут, у овој тези су приказани резултати квалитета живота за једну врло хомогену групу болесника, који су сви оперисани истом техником и сви су имали исту интраокуларну тампонаду. Ово је једна од веома ретких студија у којима се пореде скорови квалитета живота између макула-ОН и макула-ОФ АР кроз период праћења. Има само понека студија које су проучавале квалитет живота након АР. (Okamoto, Okamoto et al. 2008, Zou, Zhang et al. 2011, van de Put, Hoeksema et al. 2014, Smretschnig, Falkner-Radler et al. 2016) У већини њих је анализиран квалитет живота код макула-ОФ АР у једном временском периоду након операције (cross-sectional, студија пресека), са различитим хируршким техникама (ППБ + гас, ППВ + силикон, класична операција АР (scleral buckling)) и макула-ОН и макула-ОФ групе. Само једно истраживање је обухватило преоперативни квалитет живота код макула-ОН и макула-ОФ АР, али су такође помешали различите хируршке технике. (Zou, Zhang et al. 2011)

Веома је важно анализирати квалитет живота повезан са видом код болесника са АР, јер ВО није довољно репрезентативна за видну функцију у целини, и, као што је већ показано, чак и са добром ВО болесници се могу осећати угрожено због свог вида. Да би се детектовале и најситније разлике између група, неопходно је анализирати хомогену групу болесника са АР и пратити их проспективно, за ово су потребне дуготрајне проспективне студије. Слабост ове студије је што за анализу хомогене групе болесника (иста врста хирургије, иста врста тампонаде, макула-ОН АР одвојено од макула-ОФ АР, попуњен упитник у сва 4 временска интервала) број испитаника није велики. Такође, није

узет у обзир социоекономски статус болесника. Такође, ова студија можда има „bias“ због избора болесника који су лечени или упућени у болницу Jules-Gonin, болесници су вероватно тежи и компликованији него у другим офталмолошким центрима.

У циљу разумевања и карактеризације разлога што хируршко лечење АР треба да се уради у што краћем временском периоду, код ових болесника, а нарочито код оних са макула-ОН АР, као и у циљу разумевања постоперативне прогнозе уколико је макула одвојена неколико дана, потребно је детаљно истражити ћелијске механизме. Уколико схватимо да ћелијски процеси воде ка непоправљивој видној функцији и немогућем опоравку фоторецептора, отварају се врата новом циљу лечења и тражења агенаса који би деловали управо на ћелијском нивоу. Да би се боље разумели ћелијски процеси у фоторецепторима током АР, у овој тези је дизајниран модел хумане *in vitro* АР. Знајући да фоторецептори умиру код АР, као и да је доминантна врста ћелијске смрти апоптоза, у тези је истраживано да ли постоји преклапање механизма ћелијске смрти раније описаних код ретиналних дегенерација. Анализирано је да ли постоји поновни улазак ћелије у ћелијски циклус (нарочито G1/S фаза регулације), испитујући присуство CDK4, циклин-зависних киназа, чије присуство је показано да уведе ћелију поново у њен циклус који се завршава апоптозом. CDK4 су откривене на моделу дегенерација ретине на глодарима, као и на моделу оштећења ретине светлошћу (light-damage model). (Höglinger, Breunig et al. 2007, Sancho-Pelluz, Arango-Gonzalez et al. 2008, Zencak, Schouwey et al. 2013) TUNEL-бојење је показало да постоји пик ћелијске смрти након 3 дана *in vitro* (ЗДИВ), тј уколико је ретина одвојена 3 дана. Ово је повезано са клиничким искуством да АР које трају дуже од 3 дана су више оштећене и функционални постоперативни опоравак није тако добар као у случају да је хируршко лечење обављено раније. (Burton 1982) По први пут, у овој тези се може рећи да је CDK4 експримиран такође и у хуманом *in vitro* моделу АР. Важно је приметити да је број CDK4 позитивних ћелија знатно мањи од броја TUNEL позитивних ћелија, што указује да највероватније постоје и други механизми који су такође укључени у смрт фоторецептора код АР, као и да реактивација ћелијског циклуса није главни пут ћелијске смрти. У тези су тестирани и други про-апоптотични фактори и други путеви ћелијске смрти. Тестирана је caspase-3, као финални ефектор апоптозе. Изненађујуће, веома мали број ћелија у спољашњем нуклеарном слоју ретине (ONL) је било присутно у обе групе. Даље истраживање укључило је тестирање епигенетских модификација на

хистонском нивоу, као што је раније показано на моделу *retinitis pigmentosa*. (Farinelli, Perera et al. 2014) H3K27me3 је био присутан, али са највећим пиком након 5ДИВ, задржавајући стабилан ниво и на 7ДИВ. Такође, одлучено је да се анализира и апоптоза-индукујући фактор (AIF). На моделу обољења ретине код глодара је доказан AIF. (Hisatomi, Sakamoto et al. 2001) Резултати ове тезе су потврдили присуство AIF позитивних ћелија са највећим пиком након 3ДИВ. Ови резултати указују да AIF највероватније игра главну улогу код ране ћелијске смрти. Касније, епигенетске модификације могу имати важну улогу у смрти фоторецептора код AP. Даља истраживања су неопходна да се потпуно разуме механизам који стоји иза ћелијске смрти фоторецептора код AP, нарочито на хуманој ретини. Једном када се открије таргет механизам, инхибиторни молекули треба да се тестирају у циљу превенције ћелијске смрти и обезбеђивања комплетног опоравка фоторецептора.

#### **Г. Објављени радови који чине део докторске дисертације**

1. **Potic J**, Bergin C, Giacuzzo C, Daruich A, Konstantinidis L, Wolfensberger TJ. Primary rhegmatogenous retinal detachment: risk factors for macular involvement. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2018 Mar;256(3):489-494. doi: 10.1007/s00417-017-3880-x. Epub 2017 Dec 28.
2. Giacuzzo C, **Potic J**, Wolfensberger TJ, Daruich A. Central Scotoma after Removal of Silicone Oil in Retinal Detachment: A Multimodal Imaging Case Report. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2018 Feb 28. doi: 10.1055/s-0043-123643. [Epub ahead of print]
3. **Potic J**, Bergin C, Giacuzzo C, Daruich A, Pournaras JA, Konstantinidis L, Wolfensberger TJ. Hemi-macular detachment: EnFace optical coherence tomography characteristics and clinical implications. *Acta Ophthalmol Scand*. 2018 doi: 10.1111/aos.13727 [Epub ahead of print]

**Д. ЗАКЉУЧАК** (Образложење научног доприноса):

Докторска дисертација **„Карактеризација механизма дегенерације фоторецептора након аблације ретине; евалуација анатомског и функционалног постоперативног опоравка (Characterization of the Mechanisms of Photoreceptor Degeneration during Retinal Detachment; the Evaluation of Postoperative Anatomical and Functional Recovery)“** др Јелене Потих представља оригинални научни допринос изучавању аблација ретине у нашој земљи. Ово истраживање пружа прве информације о употреби адаптив оптикса код болесника са аблацијом ретине, прве информације о посебној подгрупи аблација ретине са делимично одвојеном макулом, прве информације о употреби новог модификованог упитника о квалитету живота ових болесника као и нове информације о начину умирања фоторецептора у зависности од дужине трајања аблације ретине.

Ова докторска дисертација је урађена према свим принципима научног истраживања. Циљеви су били прецизно дефинисани, научни приступ је био оригиналан и пажљиво изабран, а метод рада је био савремен. Резултати су прегледно и систематично приказани и дискутовани, а из њих 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 др Јелене Потих и одобри њену јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

У Београду, 26.03.2018.

**Ментори:**

**Чланови Комисије:**

---

Prof. Yvan Arsenijevic

---

Академик Проф Др Владимир Бумбаширевић

---

Prof. Thomas Wolfensberger

---

Проф. Др Татјана Пекмезовић

---

Проф. Др Миленко Стојковић

---

Проф. Др Драган Вуковић

---

Prof. Francis Munier