

УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ У БЕОГРАДУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ ВМА

Оцену готове докторске тезе  
доставља, -

На 62. седници Наставно-научног већа Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране, бр.10/62, одржаној 25.06.2018. године, одређена је комисија за оцену и одбрану готове докторске дисертације пп асист. мр Саше Милићевића, из Клинике за пластичну хирургију и опекотине ВМА, чија тема гласи:

**„ПОВЕЗАНОСТ ПОЛИМОРФИЗМА РАХ3 И ТМТС2 ГЕНА СА ТРОДИМЕНЗИОНАЛНИМ КООРДИНАТАМА МЕКОТКИВНИХ КЕФАЛОМЕТРИЈСКИХ ТАЧАКА НАКОН ЕКСЦИЗИЈЕ ТУМОРА КОЖЕ ЛИЦА“.**

Након увида у достављени материјал и разговора са кандидатом, комисија у саставу: пк проф. др сц. мед. Ненад Степић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, ВС проф. др сц. мед. Звонко Магић, Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, проф. др сц. мед. Злата Јањић, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду, подноси следећи

## **ИЗВЕШТАЈ**

### **1) Приказ садржаја докторске дисертације**

Докторска дисертација је написана на 137 страна и подељена на следећа поглавља: Увод (22 стране), Хипотеза (једна страна), Циљеви (једна страна), Материјал и методе

(9 страна), Резултати (73 стране), Дискусија (10 страна), Закључак (једна страна), и Литература (16 страна).

Резултати су документовани са 113 табела и 15 графикона. У раду је цитирано 120 радова.

## **2) Увод, хипотеза и циљеви истраживања**

**Тема** овог истраживања је утврђивање повезаности полиморфизма PAX3 (rs7559271, G/A) и TMTС2 (rs10862567, T/A) гена са тродимензионалним координатама мекоткивних кефалометријских тачака након ексцизије тумора коже лица.

У **уводу** кандидат наводи досадашња сазнања о морфолошкој анализи резултата у пластичној и реконструктивној хирургији лица, математичком моделу морфолошке анализе лица, кефалометријским тачкама лица, генетској основи морфологије лица са освртом на полиморфизам PAX3 и TMTС2 гена, као и о математичко-генетској основи морфологије лица.

Значај и допринос ове докторске дисертације огледа се у утврђивању повезаности полиморфизма PAX3 и TMTС2 гена са променом тродимензионалних координата мекоткивних кефалометријских тачака, након елипсасте ексцизије тумора коже образне регије лица и постексцизионе директне сутуре. Тиме је јасно дефинисана улога полиморфизма PAX3 и TMTС2 гена у морфологији лица пре и након елипсасте ексцизије тумора коже лица са постексцизионом директном сутуром. Процењивана је ширина ексцизије тумора коже образне регије лица након које се рана може директно затворити, без опасности да доведе до значајног померања кефалометријских тачака, што ће свакако довести до бољих естетских и функционалних резултата.

Поред наведеног, значај истраживања је у објективном аспекту примене предложене технологије, који се односи на прецизно аутоматизовано мерење и предлагање ширине елипсасте ексцизије тумора коже лица у пракси, са циљем да се минимизира нарушавање хармоније морфометријских карактеристика кожног покривача, али и да се, према потреби, постојећа хармонија подигне на виши степен. На тај начин истраживање даје квантитавни показатељ за одлуку о примени адекватне пластично-хируршке процедуре након елипсасте ексцизије тумора коже лица (директна сатура, аутотрансплантат коже или режањ).

Из свега наведеног кандидат је поставио следећу **хипотезу**:

Полиморфизми у генима PAX3 (rs7559271, G/A) и TMTС2 (rs10862567, T/A) нису повезани са значајним померањем тродимензионалних координата мекоткивних кефалометријских тачака медијалне образне регије након постексцизионе директне сутуре, а удружени су са разликама у морфологији медијалне образне регије.

За проверу постављене хипотезе кандидат је дефинисао следеће **циљеве** истраживања:

1. Утврдити дистрибуцију пола, старосног доба, фактора ризика (узимање кортикостероида и пушачки статус), ширине ексцизије, генотипова PAX3 (rs7559271, G/A) и TMTС2 (rs10862567, T/A) гена, као и фреквенцију алела PAX3 и TMTС2 гена у испитиваној групи пацијената.

2. Утврдити дистрибуцију пола, старосног доба, фактора ризика (узимање кортикостероида и пушачки статус), генотипова PAX3 (rs7559271, G/A) и TMTС2 (rs10862567, T/A) гена, као и фреквенцију алела PAX3 и TMTС2 гена у групама пацијената са различитом ширином ексцизије тумора коже лица (<10mm, 10-15mm, >15mm).

3. Утврдити дескриптивно статистичке параметре (број пацијената, средња вредност, стандардна девијација) и  $p$  вредност Прокрустових дистанци, као и  $x$ ,  $y$  и  $z$  координата пет кефалометријских тачака медијалне образне регије (доња палпебрална, ендокантион, назион, средишња ендокантална, проназале) преоперативно, 7. и 90. постоперативног дана, у односу на пол, старосно доба, факторе ризика (узимање кортикостероида и пушачки статус), ширину ексцизије, генотипове PAX3 (rs7559271, G/A) и TMTС2 (rs10862567, T/A) гена.

4. Утврдити  $p$  вредност разлике и коефицијент корелације Прокрустових дистанци, као и  $x$ ,  $y$  и  $z$  координата пет кефалометријских тачака медијалне образне регије (доња палпебрална, ендокантион, назион, средишња ендокантална, проназале), у односу на пол, старосно доба, факторе ризика (узимање кортикостероида и пушачки статус), ширину ексцизије, генотипове PAX3 (rs7559271, G/A) и TMTС2 (rs10862567, T/A) гена, између различитих времена скенирања (преоперативно, 7. и 90. постоперативног дана).

5. Утврдити повезаност полиморфизма PAX3 (rs7559271, G/A) и TMTС2 (rs10862567, T/A) гена са ширином ексцизије преоперативно, 7. и 90. постоперативног дана.

6. Утврдити предикторски утицај пола, старосног доба, фактора ризика (узимање кортикостероида и пушачки статус), ширине ексцизије, генотипова PAX3 (rs7559271, G/A) и TMTС2 (rs10862567, T/A) гена на промену Прокрустових дистанци, и x, y, и z координата пет кефалометријских тачака медијалне образне регије (доња палпебрална, ендокантион, назион, средишња ендокантална, проназале) 7. и 90. постоперативног дана у односу на преоперативне вредности.

3) У поглављу **Материјал и методе** представљени су: дизајн студије, пацијенти и детаљан приказ примењених метода.

Клиничком проспективном студијом обухваћено је 150 пацијената, оба пола, старијих од 50 година, код којих је постављена медицинска индикација за хируршку елипсасту ексцизију тумора коже медијалне образне регије лица.

Пре хируршке елипсасте ексцизије пацијенти су потписали сагласност за учешће у истраживању. Обавештење и писани пристанак за узимање узорка крви и тродимензионално скенирање лица ласером одобрени су одлуком Етичког одбора ВМА на седници одржаној 22.03.2012. Након тога венепункцијом је узимано 5ml периферне крви, у коју је додат антикоагуланс и иста чувана у замрзивачу на -20°C. ДНК је бити изолована из периферне крви у Институту за медицинска истраживања Војномедицинске академије. Полиморфизам гена је испитиван са предизајнираним СНП есејима методом алелске дискриминације на REAL-TIME апарату.

Непосредно преоперативно код свих пацијената маркирана је елипсаста ексцизиона линија око тумора коже са маргином клинички неизмењене коже ширине 2mm и правцем елипсасте ексцизије који је паралелан са линијама минималне тензије, након чега су пацијенти преоперативно скенирани ласер скенером (Laserscanner, Институт за роботику и контролу процеса, Универзитет у Брауншвајгу, Немачка, 2009.). Сваки испитаник је постављан у седећи положај испред аутофокусабилне камере Logitech Quicksam 9000 pro и линијског ласера црвене ласер линије, који је покретан ротационо, помоћу електромотора (Tamiya 4-speed crank axle gearbox, Japan, 2011.). Након гашења светла у просторији испитанику је наложено да током скенирања затвори очи, после чега се укључивао електромотор. На тај начин је камером снимана пројекциона линија ласера на лицу пацијената, чиме се добијао виртуелни модел са 400.000-600.000 тачака

дефинисаних  $x$ ,  $y$  и  $z$  координатом. Видео запис је накнадно обрађен у рачунару покретањем програма Laserscanner.

Након спроведене преоперативне припреме по дефинисаном протоколу за амбулантне операције у Војномедицинској академији, учинила се елипсаста ексцизија тумора коже у локалној анестезији, у операционој сали Клинике за пластичну хирургију и опекотине Војномедицинске академије, и постексцизиона директна сатура. Препарат је послат на ПХ анализу.

Први контролни преглед и превијање пацијената урадио се другог постоперативног дана. Скидање коначног и постоперативног скенирања пацијената урадио се седмог постоперативног дана. Додатно скенирање урадио се деведесетог постоперативног дана. PAX3 и TMTC2 гени немају улогу у формирању ожиљка, али је скенирање деведесетог постоперативног дана вршено због потребног периода за сазревање ожиљка, када се очекује већа стабилност тродимензионалних координата кефалометријских тачака.

Пре и постоперативни скенови обрађивани су у програмима за тродимензионалну анализу (MeshLab (конвертовање тродимензионалног скенираног објекта у .ply формат), Notepad ++ (екстраховање  $x$ ,  $y$  и  $z$  координата из .ply формата) и 3D Tool софтвер (прецизно аутоматизовано мерење ширине ексцизије и  $x$ ,  $y$  и  $z$  координате испитиваних мекоткивних кефалометријских тачака)).

Пацијенти су подељени у три групе у зависности од ширине ексцизије:

1.  $<10\text{mm}$
2.  $10\text{-}15\text{mm}$
3.  $>15\text{mm}$

Код свих пацијената одређиване су тродимензионалне координате пет мекоткивних кефалометријских тачака:

1. доња палпебрална (доња граница доњег капка) ( $x_1, y_1, z_1$ )
2. ендокантион (унутрашњи угао ока) ( $x_2, y_2, z_2$ )
3. назион (средина споја фронталне и назалних костију) ( $x_3, y_3, z_3$ )

4. средишња ендокантална (средина линије споја унутрашњих углова очију) (x4, y4, z4)
5. проназале (најистуренија тачка врха носа) (x5, y5, z5)

Код свих пацијената регистрована су следећа обележја посматрања:

1. пол (мушкарци, жене)
2. старосно доба (<50 година, 50-60 година, >60 година)
3. узимање кортикостероида (да, не)
4. пушачки статус (да, не)
5. ширина ексцизије (<10mm, 10-15mm, >15mm)
6. PAX3 ген (rs7559271, G/A) (алели: G и A; генотипови: wild type (GG), хетерозигот (GA) и мутирани (AA))
7. TMTС2 ген (rs10862567, T/A) (алели: T и A; генотипови: wild type (TT), хетерозигот (TA) и мутирани (AA))
8. преоперативне x, y и z координате мекоткивних кефалометријских тачака у регији тумора коже (x1-5, y1-5, z1-5)
9. постоперативне x, y и z координате мекоткивних кефалометријских тачака у регији тумора коже, седам дана након операције (x1-5, y1-5, z1-5)
10. постоперативне x, y и z координате мекоткивних кефалометријских тачака у регији тумора коже, деведесет дана након операције (x1-5, y1-5, z1-5)

У анализи тродимензионалних карактеристика испитиване регије коришћене су две методологије: Прокрстова анализа различитости облика испитиване регије, дефинисаних тродимензионалних координатама кефалометријских тачака, и испитивање различитости позиције кефалометријских тачака помоћу тродимензионалних координата. Примена обе методологије неопходна је ради добијања свеобухватних резултата, генерално, у зависности од облика испитиване регије, али и детаљнијом анализом облика помоћу тродимензионалних координата испитиваних кефалометријских тачака.

#### **4) Статистичка обрада података**

Резултати у тексту, табелама и графиконима приказани су као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (SD). Други праћени параметри анализирани су регистравањем фреквенције њихове појаве и представљени путем релативних односа (%).

Статистичка значајност између дистрибуција фреквенција појединих група одређивана је применом  $\chi^2$  теста. У зависности од варијабилности појединих параметара статистичка значајност између две групе одређивана је применом т-теста за зависна обележја или Wilcoxon-овим тестом. Значајност разлика између више група утврђивана је применом анализе варијансе у 1 правцу (АНОВА) или коришћењем Kruskal-Wallis теста, за анализу облика испитиване регије, односно мултиваријантном анализом за координате кефалометријских тачака.

Корелација појединих параметара испитивана је применом Pearsonове корелационе анализе.

Предиктивни значај појединих параметара на коначни исход оперативног захвата одређиван је коришћењем униваријантне логистичке регресије.

У раду су установљена три нивоа статистичке значајности -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ .

Прокрстова анализа урађена је у статистичком софтверу за геометријску морфометријску анализу дводимензионалних и тродимензионалних оријентирних тачака (MorphoJ, version 1.06d, 2014), а обрада података извршена је помоћу статистичког софтвера за РС рачунаре (SPSS 23, IBM, 2015).

#### **5) Кратак опис постигнутих резултата**

Добијени резултати представљени су у оквиру група: демографске карактеристике, анализа полиморфизма гена у односу на тродимензионалне координате кефалометријских тачака, корелације полиморфизма гена и ширина ексцизије,

мултипла регресиона анализа, анализа зависних и независних варијабли, графички приказ ширине ексцизије у различитим временским интервалима.

У спроведеном истраживању учествовао је једнак број пацијената мушког и женског пола. Старосна доб пацијената подељена је на три интервала (<50 година, 50-60 година, >60 година), са по 50 пацијената. Кортикостероиде је узимало 117 од 150 пацијената, а укупно је верификовано 83 пушача од 150 пацијената. Број пацијената у односу на ширину ексцизије је симетрично распоређен у три интервала (<10mm; 10-15mm; >15mm).

Испитивањем полиморфизма PAX3 гена утврђено је постојање wild типа код 72 пацијената, док је било 34 хетерозигота и 24 мутанта. Испитивањем полиморфизма TMTС2 гена утврђено је постојање wild типа код 103 пацијената, док је било 17 хетерозигота и 10 мутаната.

Анализом резултата утврђена је статистичка значајност разлике тродимензионалних координата кефалометријских тачака преоперативно, у пределу медијалног кантуса, између wild type и мутаната PAX3 гена, док статистички значајна разлика није присутна преоперативно између генотипова TMTС2 гена. Додатном анализом утврђено је да полиморфизам PAX3 и TMTС2 гена нема улогу у морфолошком изгледу медијалног кантуса постоперативно, 7. и 90. дана.

Анализом утицаја ширине ексцизије на постоперативне тродимензионалне координате пет посматраних мекоткивних кефалометријских тачака, нађено је да статистички значајна разлика не постоји код пацијената са ширином ексцизије до 10 mm, на основу чега се може закључити да ексцизија ширине до 10 mm не утиче на промену симетрије медијалне образне регије лица постоперативно. Појединачном анализом тродимензионалних координата нађена је статистички значајна разлика постоперативно у односу на преоперативно стање код  $y_{2-4}$  и  $z_{2-4}$  координата, што је и логично јер технички оперативни поступак подразумева промену у и z, али не и x координате, због позиције елипсасте ексцизије у тродимензионалном простору.



## 6) Дискусија

Кандидат је детаљно и свеобухватно анализирао резултате истраживања и упоредио их са резултатима сличних студија других аутора. Објаснио је корисност и применљивост добијених резултата у клиничкој пракси.

Поред иновативних решења до којих је кандидат дошао током истраживања (аутокорективно електронско коло употребом операционог амплификатора, статистичко метод анализе облика испитиване регије, метод аутоматизованог одређивања тродимензионалних координата кефалометријских тачака), кандидат је детаљно анализирао до сада познате начине одређивања тродимензионалних координата мекоткивних кефалометријских тачака, истичући значај објективизације, економског аспекта и једноставне примене апаратуре за скенирање, као и значај начина обраде резултата.

Поред наведеног, кандидат је анализирао резултате радова других аутора, који се односе на повезаност полиморфизма гена и морфологије лица и упоредио досадашња истраживања са добијеним резултатима.

У дискусији је објашњена методологија морфолошке анализе применом Прокрустових дистанци, при чему је кандидат указано на предности методе морфолошке анализе у истраживању у односу на друге, до сада коришћене методе.

Анализирајући досадашња истраживања, кандидат је указао на могућност примене методологије која је коришћена у овом истраживању, како у клиничкој пракси, тако и у будућим научним студијама.

Приликом предаје готове докторске дисертације кандидат је доставио потврде уредништва Војносанитетског прегледа да су два рада из области докторске дисертације прихваћена за штампу и да ће бити објављена у једном од наредних бројева. Кандидат је први аутор у оба рада: "Association of PAX3 and TMTC2 gene polymorphism on the face morphology change after excision of skin tumors" и "The influence of the skin tumors excision width in the postoperative facial asymmetry".

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације једногласно предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, обзиром да су испуњени сви законски услови за јавну одбрану докторске тезе који су дефинисани одлуком Наставно-научног већа број 6/488 од 25.10.2007. године, да извештај прихвати и одобри јавну одбрану докторске дисертације пп асист. мр Саше Милићевића, под насловом: **„Повезаност полиморфизма RAX3 и TMTС2 гена са тродимензионалним координатама мекоткивних кефалометријских тачака након ексцизије тумора коже лица“**.

#### КОМИСИЈА

1. пк проф. др сц. мед. Ненад Степић

---

2. ВС проф. др сц. мед. Звонко Магић

---

3. проф. др сц. мед. Злата Јањић

---