

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 22.12.2017. godine, broj 5940/14 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Fraktalna i teksturalna analiza strukture hromatina limfocita krvi kod pacijenata sa različitim stepenom depresije“

kandidata dr Drage Dimitrijević, zaposlene u Klinici za psihijatrijske bolesti „Dr Laza Lazarević“ u Beogradu. Mentor je Doc. dr Igor Pantić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandar Damjanović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Dejan Nešić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Doc. dr Biserka Vukomanović Đurđević, docent 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 Drage Dimitrijević napisana je na ukupno 143 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 3 tabele, 2 slike i 18 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji i biografiju kandidata.

U **uvodu** je dat kratak prikaz fraktalne analize kao savremenog matematičkog metoda u biomedicinskim istraživanjima. Definisana je pojam fraktalne dimenzije kao najvažnijeg parametra fraktalne evaluacije ćelijske i tkivne strukture. Dat je osvrt na dosadašnja istraživanja na polju primene fraktalne analize u molekularnoj biologiji, histologiji, patologiji kao i u kliničkim istraživanjima. U uvodu je takođe definisana teksturalna analiza kao još jedan metod u evaluaciji strukture ćelija i tkiva u fundamentalnim medicinskim naukama. Napomenuto je da se i fraktalna i teksturalna analiza mogu sa uspehom koristiti u detekciji i

kvantifikaciji diskretnih strukturnih promena u hromatinskoj organizaciji koje nisu uočljive konvencionalnim mikroskopskim metodama.

U uvodu je takođe kratko istaknut potencijalni značaj imunskog sistema u nastanku i razvoju depresije. Dat je osvrt na skorašnje studije o uticaju inflamacije na depresivno raspoloženje, kao i ulozi citokina i drugih hemijskih medijatora u patogenezi psihijatrijskih poremećaja. Na ovaj način je adekvatno obrazložena naučna osnova za izradu ove doktorske disertacije.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sprovedeno istraživanje je imalo dva cilja. Prvi je bio da se utvrdi postojanje razlike u fraktalnim i teksturalnim parametrima hromatina limfocita između pacijenata sa depresijom, i ispitanika koji ne zadovoljavaju dijagnostičke kriterijume za depresiju. Drugi cilj je bio da se utvrdi postojanje i jačina korelacije između stepena depresije i fraktalnih, odnosno teksturalnih parametara hromatina limfocita krvi.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o istraživanju koje je dizajnirano po tipu studije preseka i obavljeno u Klinici „Dr Laza Lazarević“ u Beogradu. Detaljno je opisan način intervjuisanja pacijenata. Detaljno su navedeni kriterijumi za isključenje iz studije poput organskog mentalnog poremećaja, zloupotrebe i zavisnosti od psihoaktivnih supstanci, sistemskih bolesti, hipotireoze i hipertireoze. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključjenja u studiju. Pored ostalog, navedeno je da su korišćena dva psihijatrijska upitnika: Bekova skala za procenu depresije i Skala depresivnosti, anksioznosti i stresa DASS–21. Takođe je detaljno opisana histološka obrada razmaza periferne krvi ispitanika, kao i fraktalna i teksturalna analiza hromatina limfocita periferne krvi. Kao dodatak studiji, urađen je i eksperiment u *in vitro* uslovima na limfocitima periferne krvi gde su testirane potencijalne promene u fraktalnim i teksturalnim parametrima hromatina limfocita nakon tretmana oksidopaminom. Na adekvatan način je prikazan matematički algoritam računanja fraktalnih parametara hromatina poput fraktalne dimenzije i lakunarnosti. Takođe je detaljno objašnjen protokol za računanje teksturalnih karakteristika hromatina kao što su entropija, angularni drugi momenat, inverzni momenat razlike, tekturalni kontrast i teksturalna korelacija.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi 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 204 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U eksperimentalnoj grupi, prosečna vrednost skora Bekove skale za depresiju je bila 25.8 ± 11.8 , dok je u kontrolnoj grupi ona iznosila 12.8 ± 9.7 . Očekivano, postojala je statistički visoko značajna razlika u ovom parametru između dve grupe ($p < 0.01$). Srednja vrednost skorova za depresivnost, anksioznost i stres u eksperimentalnoj grupi iznosile su 10.9 ± 5.3 , 9.2 ± 4.4 , odnosno 11.6 ± 5.3 . U kontrolnoj grupi iznosile su 5.8 ± 5.1 , 5.3 ± 4.1 , odnosno 6.4 ± 4.1 . Za sva tri aspekta DASS skale, postojala je statistički visoko značajna razlika između grupa.

Prosečna vrednost fraktalne dimenzije hromatina limfocita u grupi pacijenata sa rekurentnim depresivnim poremećajem, iznosila je 1.544 ± 0.162 , a u kontrolnoj grupi 1.656 ± 0.160 . Detektovana je statistički visoko značajna razlika između dve grupe ($p < 0.01$). Vrednost hromatinske lakunarnosti je takođe bila značajno različita između grupa ($p < 0.01$), ali, za razliku od fraktalne dimenzije, ona je bila veća u eksperimentalnoj grupi. Uočena je statistički visoko značajna negativna korelacija između vrednosti skora Bekove skale za depresiju i fraktalne dimenzije hromatina u uzorku pacijenata sa rekurentnim depresivnim poremećajem ($p < 0.01$). Drugim rečima, sa povećanjem skora Bekove skale, došlo je do smanjenja vrednosti fraktalne dimenzije, i obrnuto. Ovaj rezultat ukazuje potencijalni prediktorski značaj fraktalne analize u evaluaciji težine depresivnog poremećaja. Nije bilo značajne razlike u pogledu teksturalnih parametara hromatina limfocita između pacijenata sa depresijom i kontrolne grupe.

U *in vitro* delu studije, pokazano je da se teksturalni parametri hromatina značajno menjaju nakon tretmana oksidopaminom. Korišćenjem ROC (Receiver operating characteristic) analize, utvrđeno je da su pojedini pokazatelji teksturalne analize visoko senzitivni u detekciji diskretnih strukturnih promena u hromarinu izazvanih na ovaj način. Ovim je istaknut potencijalni značaj teksturalne analize u dizajnu budućih biosenzora za kvantifikaciju strukturnih alteracija u hromatinskoj organizaciji. Takođe je ukazano na potencijalnu ulogu dopamina i njegovih derivata u regulaciji hromatinske distribucije u jedru limfocita kod pacijenata obolelih od depresije.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Poznato je da se biološke strukture kao što je jedarni hromatin odlikuju određenim stepenom strukturne kompleksnosti. Strukturna kompleksnost hromatina je važan pokazatelj

očuvanosti i nivoa njegove organizacije. U procesima tokom kojih je distribucija euhromatina i heterohromatina narušena, hromatinska kompleksnost se menja. Ranije studije su ukazale da su ove promene posebno izražene kod ćelija koje su izložene dejstvu štetnih agenasa poput zračenja, toksina ili drugih faktora koji dovode do DNK oštećenja i smrti ćelije (Losa et al. 2005; Pantic et al. 2012).

Ranija istraživanja su pokazala da se strukturna kompleksnost može kvantifikovati na nekoliko načina. One biološke strukture koje u svojoj morfologiji ispoljavaju karakteristike fraktala se mogu analizirati takozvanom fraktalnom analizom, metodom kojom se određuju vrednosti fraktalne dimenzije i lakunarnosti. Ove dve veličine u biologiji i medicini se koriste za objektivno vrednovanje, opisivanje i klasifikaciju raznih struktura i pojava koji ne podležu pravilima Euklidske geometrije i do sada su uspešno primenjene u raznim medicinskim granama (Landini, 2011; Moal et al. 2006). Smanjenje fraktalne dimenzije bioloških struktura kao što je nukleusni hromatin u pojedinim stanjima je pokazatelj gubitka kompleksnosti. Nekoliko skorašnjih studija je potvrdilo da je nukleusni hromatin u svojoj osnovi fraktal (Lebedev et al. 2005; Bancaud et al. 2009). Fraktalna priroda hromatina je potvrđena na osnovu karakteristične, nenasumične distribucije pojedinih nanomaterijala u ćelijskom jedru, kao i na osnovu specifičnosti u kinetici pojedinih hromatin-vezujućih proteina u heterohromatinu. Takođe je pokazano da je fraktalna dimenzija euhromatina značajno veća od fraktalne dimenzije heterohromatina, što ukazuje na potencijalni značaj fraktalne analize u proceni transkripcione aktivnosti jedra kao celine (Bancaud et al. 2009).

Drugi način za procenu strukturne kompleksnosti bioloških struktura je teksturalna analiza upotrebom GLCM (Grey level co-occurrence matrix) metode (Park et al. 2011). Ovom tehnikom se na osnovu digitalnih mikrografa tkiva, odnosno ćelijskih elemenata, može proceniti stepen strukturne heterogenosti i neuređenosti (entropije). GLCM metodom se pored ostalog mogu odrediti teksturalni parametri hromatina kao što su entropija, varijansa, angularni drugi momenat (Angular second moment), teksturalni kontrast, teksturalna korelacija, i inverzni momenat razlike (inverse difference moment). Ove veličine se dobijaju primenom statistike drugog reda na distribuciju vrednosti rezolucionih jedinica u digitalnim mikrografima. Svi ovi parametri su kvantitativni pokazatelji kompleksnosti odgovarajuće biološke strukture i danas se koriste ili kao integralni deo ili kao dodatak fraktalnoj analizi.

U prethodnim studijama pokazano je da određeni GLCM parametri hromatina limfocita u germinativnim centrima slezine potencijalno važni pokazatelji finih

ultrastrukturnih promena koje se dešavaju tokom kondenzacije i marginalizacije hromatina (Pantic et al. 2012). Detektovana je statistički značajna korelacija između entropije, angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike sa jedne strane, i konvencionalnih parametara veličine i oblika jedra sa druge strane. Ovo je ukazalo na značaj GLCM kao metode u detekciji diskretnih promena u kompleksnosti hromatina koje je nemoguće uočiti tokom standardne svetlosne mikroskopije.

Depresija kao psihijatrijski poremećaj je povezana sa brojnim promenama u imunskom sistemu. Depresivni pacijenti imaju izmenjene koncentracije citokina i interleukina u perifernoj krvi (Felger et al. 2013). Takođe, poznato je da tokom depresije dolazi do promenjene aktivnosti različitih subpopulacija limfocita kako u krvi, tako i u primarnim i sekundarnim limfatičkim organima. Zbog ovih saznanja, danas postoji hipoteza da je depresija barem jednim delom posledica inflamatornog procesa u organizmu (Brites et al. 2015). Tome u prilog govori i činjenica da razne bakterijske i virusne infekcije koje izazivaju inflamatorni odgovor dovode do izmena u ponašanju pacijenta (tokom akutne faze bolesti) koje je veoma slično ponašanju koje se viđa u depresiji.

Međutim vrlo je malo literaturnih podataka koji se odnose na promene koje se tokom depresije dešavaju na individualnim limfocitima, odnosno njihovim jedrima. Iako se zna da se proizvodnja citokina i drugih hemijskih medijatora kod limfocita menja, nejasno je da li su ova dešavanja praćena promenama u strukturnoj organizaciji hromatina kod ovih ćelija. Praćenje strukturne kompleksnosti hromatina limfocita bi bio jedan od načina procene uticaja epigenetskih činilaca na već dokumentovane promene u imunskom sistemu kod depresije. Zbog toga je jedan od važnih ciljeva ove studije bio da se sagleda potencijalna povezanost između stepena depresivnog raspoloženja i fraktalnih parametara limfocitnih jedara.

Nekoliko studija je do sada ukazalo da se fraktalna analiza hromatinske organizacije limfocita može sa uspehom koristiti kao pomoćno dijagnostičko i prognostičko sredstvo tokom razvoja i progresije nekih hematoloških bolesti (Ferro et al. 2011; Adam et al. 2006). Moguće je da je fraktalna dimenzija hromatina određenih ćelija može biti senzitivna dijagnostički i prognostički faktor i velikog broja drugih bolesti (Metze, 2013). Takođe, fraktalni parametri jedra krvnih ćelija su potencijalno značajni parametri kliničkog toka kod pacijenata obolelih od leukemije i limfoma (Brites et al, 2015, Blume et l. 2011). Istraživanje opisno u ovoj disertaciji je, pored ostalog, sugerisalo i dijagnostičku vrednost fraktalnih i teksturalnih parametara hromatina limfocita kod pacijenata obolelih od depresije čime je

doprinelo postojećim saznanjima o upotrebljivosti ovih matematičkih metoda u savremenoj medicinskoj praksi.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Igor Pantic, *Draga Dimitrijevic*, Dejan Nesic, Danica Petrovic. Gray level co-occurrence matrix algorithm as pattern recognition biosensor for oxidopamine-induced changes in lymphocyte chromatin architecture. *Journal of Theoretical Biology* (2016) 406:124-8.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Ispitivanje kompleksnosti jedarnog hromatina je savremen i egzaktan, ali nedovoljno korišćen metod kako u oblasti ćelijske biologije, tako i u kliničkim disciplinama. Fraktalna analiza predstavlja objektivnu matematičku metodu za kvantifikovanje kompleksnosti bioloških struktura i sa uspehom može detektovati čak i vrlo male promene na raznim nivoima hromatinske organizacije. Detektovane promene kompleksnosti jedarnog hromatina limfocita, ukazale su na značaj unutar nukleusnih faktora (kao što epigenetske promene i promene u hromatinskoj regulaciji) u ukupnoj promeni u funkcionisanju imunskog sistema kod pacijenata sa depresivnim poremećajem. Rezultati istraživanja bi mogli biti od velikog naučnog značaja i predstavljati veliki doprinos boljem razumevanju uloge imunskog sistema u nastanku i razvoju depresije.

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 Drage Dimitrijević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 10.01.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Aleksandar Damjanović

Prof. dr Dejan Nešić

Doc. dr Biserka Vukomanović Đurđević

Mentor:

Doc. dr Igor Pantić
