

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 07.03. 2016. godine, odluka broj 5040/3, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Utvr ivanje povezanosti relevantnih genetskih polimorfizama i nalaza nuklearne magnetne rezonance mozga kod pacijenata sa depresivnim poreme ajem”

kandidata dr Milutina Kostića, zaposlenog u Institutu za mentalno zdravlje u Beogradu, kao lekar specijalista psihijatrije. Mentor je prof. dr Dušica Le i Toševski.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor, Institut za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Tatjana Pekmezović, redovni profesor, Institut za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Sanja Totić Poznanović, vanredni profesor, Klinika za psihijatriju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. Doc. dr Šarlota Mesaroš, docent, Klinika za neurologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Slavica uki Dejanović, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicnskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Milutina Kostića napisana je na 134 strane i podeljena je na sledeće poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi 13 tabela i 5 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** su prikazana aktuelna saznanja o etiopatogenezi depresivnog poremećaja i prikazane najpoznatije biološke i psihosocijalne teorije. Prikazan je istorijat, klinička slika, dijagnostički kriterijumi i epidemiološka slika depresivnog poremećaja. Napravljen je osvrt na problematiku istog komorbiditeta generalizovanog anksioznog poremećaja i depresije.

U daljem tekstu disertacije prikazani su opšti podaci za tri polimorfizma koja su ispitivana (5-HTTLPR polimorfizam gena za serotonininski transporter, Val66Met funkcionalni polimorfizam neurotrofnog faktora dobijenog iz mozga (BDNF) i Val158Met funkcionalni polimorfizam katehol-O-metiltransferaze (COMT)), kao i prikaz dosadašnjih istraživanja nabrojanih polimorfizama u etiopatogenezi depresije.

Opisani su osnovni podaci o metodama magnetne rezonance koje su korišćene u doktorskoj disertaciji uz prikaz istraživanja koja su do sada rađena u depresivnom poremećaju.

Opisana je i transkranijalna ultrasonografija i istraživanja rađena u depresivnom poremećaju korišćenjem ove metode.

Na kraju uvoda detaljno su prikazana do sada rađena istraživanja koja su koristila dva ili sva tri polimorfizma i model interakcije gena, uz upotrebu magnetne rezonance.

Ciljevi rada su precizno definisani i mogu se podeliti u 4 celine. 1) definisanje morfoloških i genetskih razlika između depresivnih pacijenata i zdravih kontrola.

2) definisanje specifičnih interakcija i akumulacija alela koje su različite u studijskoj grupi nego u kontrolnoj grupi ispitanika. Po utvrđivanju takve akumulacije definisan je akumulativni model sa deljenjem istavog uzorka na 3 grupe pacijenata i 3 grupe kontrola. Grupe su napravljene prema broju rizičnih alela u svakoj i nazvane su Visoko rizična grupa, Intermedijarna grupa i Nisko rizična grupa. Zatim su te grupe upoređene međusobno prema sociodemografskim, kliničkim i morfološkim karakteristikama. Na kraju su urađena ista ta poređenja samo koristeći svaki alel zasebno (van akumulacionog modela) da bi se sprečilo da jedan od istraživanih alela stvori lažno pozitivan nalaz u akumulacionom modelu.

3) utvrđivanje morfoloških i kliničkih razlika između pacijenata koji imaju dijagnozu samo depresivnog poremećaja i pacijenata koji imaju komorbiditet depresivnog poremećaja i generalizovanog anksioznog poremećaja.

4) utvrđivanje genetskih, sociodemografskih i kliničkih parametara koji utiču na nalaz u rafe jedrima transkranijalnom ultrasonografijom kod depresivnih pacijenata.

Iz datih ciljeva vidi se da je fokus doktorata na pronalaženju suptilnih razlika u studijskoj grupi (pacijenti) i definisanje homogenih grupa u okviru depresivnog poremećaja što bi pomoglo rešavanju problema visoke kliničke i heterogenosti ovog oboljenja koji mogu uticati na tok i ishod poremećaja.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da ovaj doktorat predstavlja studiju slučajeva i kontrola i studiju preseka. Klinički deo istraživanja rađen je u Institutu za mentalno zdravlje. U studijsku grupu uključeno je 85 konsekutivnih, hospitalizovanih pacijenata kojima je postavljena klinička dijagnoza *prve depresivne epizode* ili *rekurentnog depresivnog poremećaja* (F32 i F33 prema MKB-10 klasifikaciji), starosti od 18 do 65 godina. Dijagnoza je postavljana na osnovu kliničkog intervjua i potvrđena strukturisanim dijagnostičkim intervjuom za kliničke sindrome osovine I DSM IV-TR. Kriterijumi isključenja bili su sledeći: postojanje neurološkog komorbiditeta, mentalna retardacija, psihotične karakteristike (halucinacije i sumanutosti), alkoholizam, postojanje bilo kojeg psihijatrijskog komorbiditeta izuzev anksioznih poremećaja (konkretno generalizovani anksiozni poremećaj, panični

poreme aj, agorafobija i socijalna fobija) i poreme aja li nosti, ugra eni metalni predmeti u telo usled kojih snimanje magnetnom rezonancom ne bi bilo mogu e, kao i sumnja na zloupotrebu medicinske službe sa ciljem sticanja tercijarne dobiti. Kontrolna grupa je uklju ivala 73 zdrava dobrovoljca, koja nisu imali podatke o bilo kakvom psihijatrijskom poreme aju i koji su upareni po polu i godinama sa studijskom grupom, tj. pacijentima sa depresivnim poreme ajem. magnetnom rezonancom i transkranijalnom sonografijom ra eno je na Klinici za neurologiju KCS. Molekularno geneti ke analize: Real-time PCR, TaqMan metodologija za genotipizaciju, standardna PCR metoda i restrikciona digestija ra eni su u genetskoj laboratoriji Klinike za neurologiju KCS. Softverska obrada snimaka magnetnom rezonancom ra ena je u Neuroimaging Research Unit, Institute of Experimental Neurology, Division of Neuroscience, Scientific Institute and University Hospital San Raffaele u Milanu (Italija). Istraživanje je sprovedeno po svim principima *dobre nau ne prakse* Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Studija je odobrena od strane Eti kog komiteta Instituta za mentalno zdravlje i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Metodološki deo sastoji se iz 5 koraka, od kojih je svako detaljno opisan. Prvi korak je odabir pacijenata i klini ka obrada, sa opisom uklju uju ih i isklju uju ih kriterijuma, opisom odabranih instrumenata. Drugi korak je va enje krvi, izolacija DNK i molekularno geneti ke analize 3 polimorfizma: rs6265; rs4680; 5-HTTLPR. Tre i korak je snimanje magnetnom rezonancom aparatom ja ine 1,5 T i detaljan opis obrade snimaka radi analiziranja morfometrije zasnovane na vokselima, debljine korteksa i traktogrfije. etvrti korak je snimanje transkranijalne sonografije transduktorom (sondom) ja ine 2,5 MHz. Poslednji korak je statisti ka obrada rezultata.

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. U disertaciji su jasno prikazani snaga i ograni enja primenjenog istraživanja.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišena **literatura** sadrži spisak od 327 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje ima, kao i u ciljevima, četiri celine u rezultatima. Pronađeno je da ispitanici sa depresivnim poremećajem imaju manji volumen desnog superiornog frontalnog režnja u odnosu na zdrave kontrole. Pronađeno je i da su ispitanici studijske grupe (pacijenti sa depresivnim poremećajem) statistički značajno češće Val homozigoti za Val66Met BDNF, dok su na nivou trenda češće Met nosioci Val158Met COMT polimorfizma i L nosioci 5-HTTLPR polimorfizma serotoninskog transportera. Kada se posmatraju interakcije pronalazeno je da pacijenti sa visokom statističkom značajnošću imaju upravo kombinaciju ova tri alela. Korišćenjem ovog rezultata kao osnovne baze za dalje analize napravljen je akumulacioni model. Visoko rizična grupa je definisana kao pacijenti sa sva tri alela koja se češće nalaze kod ispitanika sa depresivnim poremećajem. Intermedijarnu grupu činili su pacijenti koji imaju 2 od tri alela i Nisko rizičnu grupu pacijenti koji imaju jedan ili nijedan od rizičnih alela. Ista podjela na visoko, intermedijarno i nisko rizičnu grupu je napravljena i sa kontrolama.

Upoređivanjem grupa akumulacionog modela utvrđeno je da pacijenti oboleli od depresivnog poremećaja sa visokim rizikom imaju značajno češći hereditet u odnosu na ostale pacijente. Takođe je utvrđeno da imaju veće diurnalne varijacije raspoloženja kao potencijalno kliničku specifičnost ove grupe. Morfološki utvrđeno je nekoliko razlika među grupama. Morfometrijom zasnovanom na vokselima pronalazeno je da su visoko rizični pacijenti imali smanjen volumen u odnosu na nisko rizične kontrole u bilateralnom inferiornom frontalnom korteksu, bilateralnom srednjem orbitofrontalnom girusu i insuli bilateralno, kao i u levom superiornom frontalnom girusu, levom srednjem cingularnom korteksu i levom inferiornom temporalnom girusu. Visoko rizični pacijenti sa depresivnim poremećajem imali su značajno redukovanu debljinu sive mase u rostralnom srednjem frontalnom girusu bilateralno u odnosu i na visoko rizične i na nisko rizične kontrole. Nisko rizične kontrole imale su povećanu debljinu sive mase u levom inferiornom parietalnom

korteksu u pore enju sa visoko rizi nim i nisko rizi nim pacijentima. Traktografijom je prona eno da su i visoko rizi ni i nisko rizi ni pacijenti imali smanjenu frakcionu anizotropiju korpusa kalozuma (KK), posebno izraženo u telu KK, u odnosu na visoko rizi ne kontrole.

Kada se porede pacijenti sa i bez komorbiditeta generalizovanog anksioznog poreme aja prona eno je da su, u pore enju sa samo depresivnim poreme ajem, pacijenti sa ovim komorbiditetom pokazivali kortikalno stanjivenje u desnom medijalnom orbitofrontalnom korteksu, desnom fuziformnom korteksu, levom temporalnom polu i levom lateralnom okcipitalnom girusu. Primenom traktografije prona eno je da su, u pore enju sa zdravim kontrolama, pacijenti samo sa depresijom, ali ne i sa komorbiditetom, imali pove anu aksijalnu i srednju difuzivnost bilateralno u superiornom longitudinalnom fascikulusu.

U ispitivanom uzorku prona eno je da je hipoehogenost rafe zna ajno eš a kod pacijenata obolelih od depresivnog poreme aja u odnosu na kontrole. Ura ena je stepwise diskriminaciona analiza i utrv eno je da su 4 prediktora koja su zajedni ki uticala na ehogenost rafe kod pacijenata: HAMA pitanje 5 (poreme aj koncentracije), komorbiditet socijalne fobije, S homozigot 5-HTTLPR i komorbiditet generalizovanog anksioznog poreme aja.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U uzorku koriš enom za ovu doktorske disertacije prona eno je da su od tri izu avana polimorfizma, kod pacijenata eš i Val homozigoti za Val66Met BDNF, Met nosioci Val158Met COMT polimorfizma i L nosioci 5-HTTLPR polimorfizma serotoninskog transportera. Posebno je važno da je svaki od ovih alela pokazao slabu zna ajnost ili trend, ali ako se sva tri akumuliraju da se dobija visoka zna ajnost i da tek sa akumulacijom faktora rizika dolazi do pove ane podložnosti za depresivni poreme aj. I ranije je pokazano da je BDNF Val alel zna ajan u razvoju bazi ne anksioznosti, neuroticizma (Lang et al, 2005) i pove ane verovatno e za razvoj depresivnih simptoma (Chen et al, 2013). I za Met alel

COMT postoje istraživanja koja dovode upravo ovaj alel sa ve om podložnoš u za razvojem depresivnog poreme aja (Mandelli et al, 2007, Ohara et al, 1998). Kada je u pitanju 5-HTTLPR dominantno S alel smatran je faktorom rizika za razvoj depresije, mada su ti rezultati nekonzistentni (Long et al, 2013) i naj eš e zavisni od dodatnih uslova da bi se zna ajnost uo ila (stres, na primer) (Caspi et al, 2003). Direktno pore enje rezultata akumulacionog modela sa nekim drugim istraživanjem nije mogu e s obzirom na to da je do sada ura eno samo jedno istraživanje sa ova tri polimorfizma i njihovom akumulacijom, obavljeno samo na zdravoj populaciji kojem su direktno posmatrane samo substrukture hipokampusa (Rabl et al, 2014).

Utvr eno je da visoko rizi na grupa ima najve i hereditet. To može ukazati da da nije svaka depresija jednako nasledna, niti sve depresije imaju isto genetsko optere enje, što je koncept koji su Flint i Kendler ve predstavili (Flint & Kendeler, 2014).

Visoko rizi na grupa ima i pove anu diurnalnu varijaciju raspoloženja što se može objasniti uticajem sva tri gena na cirkadijalni ritam (Morin, 1999; Dauviliers et al, 2011; Drakopoulos et al, 2015).

U istraživanjima depresije koja su koristila traktografiju postoji velika heterogenost u rezultatima, ali dva najve a istraživanja nemaju pozitivan nalaz (Choi et al, 2014; Olvet et al, 2015). Ipak, i jedna i druga grupa autora u svojim radovima naglašavaju da je verovatan problem svih dosadašnjih studija heterogenost depresivnog poreme aja i ostavljaju mogu nost da se podgrupe sa specifi nim lezijama bele mase mogu na i u budu nosti. Upravo je istraživanje doktoranta imalo takav pristup i pokazalo je da visoko rizi ni i nisko rizi ni pacijenti imaju poreme aj mikrostrukture bele mase u korpusu kalozumu (posebno izraženo u telu korpusa kalozuma) u odnosu na visoko rizi ne kontrole i to u vidu smanjenja frakcione anizotropije.

Merenjem debljine korteksa prona eno je da visoko rizi ni pacijenti imaju stanjenu sivu masu moždane kore obostrano u rostralnim srednjim frontalnim girusima u odnosu na visoko i nisko rizi ne kontrole. Ova oblast je deo dorzolateralnog prefrontalnog korteksa. Redukcija ove oblasti predstavlja est nalaz u istraživanjima depresivnog poreme aja (Kang

et al, 2015). Drugi nalaz je stanjenje desnog lateralnog okcipitalnog girusa kod visoko rizi nih pacijenata u odnosu na visoko rizi ne kontrole. U ranijim istraživanjima pokazano je da ove dve oblasti, prefrontalni i okcipitalni korteks, imaju smanjenje nivoa GABA kod depresivnih pacijenata (Hasler et al, 2007; Sanacora et al, 1999).

Metodom morfometrije zasnovane na vokselima prona eno je da visoko rizi na grupa pacijenata ima zna ajno smanjen volumen prevashodno frontalnih podru ja mozga u odnosu na nisko rizi nu grupu. Velika meta analiza morfometrije zasnovane na vokselu u depresivnom poreme aju je upravo izdvojila donji frontalni girus kao jednu od oblasti koja je smanjena u depresiji što je prona eno i za visoko rizi nu grupu ove doktorske disertacije (Du et al, 2012).

Ura ena je diskriminantna analiza koja je pokazala da su zna ajni prediktori hipoehogenosti rafe uzrokovani prisustvom komorbidnog anksioznog poreme aja, sa visoki skorom na pitanju 5 HAMA upitnika (poreme aj koncentracije i memorije) i homozigotnost za S alel 5-HTTLPR polimorfizma. Još ranije je pokazano da je serotoninska aktivnost smanjena u anksioznim i depresivnim poreme ajima (Eison and Eison, 1994), kao i da je dorzalni rafe nukleus aktiviran stimulusima koji izazivaju anksioznost i da je povezan sa strukturama prednjeg mozga koje kontrolišu anksioznost (Lowry et al, 2008). I ovde, dakle, može da se postavi hipoteza o dve podgrupe depresije: prva, anksiozna, sa hipoehogenoš u rafe, koja eš e ima S homozigot 5-HTTLPR i ve i pad koncentracije i druga, sa normalnom ehogenoš u rafe i manje izraženim simptomima anksioznosti.

D) Objavljen rad koji ini deo doktorske disertacije

Kostic M, Canu E, Agosta F, Munjiza A, Novakovic I, Dobricic V, Maria Ferraro P, Miler Jerkovic V, Pekmezovic T, Lecic Tosevski D, Filippi M. The cumulative effect of genetic polymorphisms on depression and brain structural integrity. *Hum Brain Mapp.* 2016 Mar 9. doi: 10.1002/hbm.23165. [Epub ahead of print]

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Utvrdjivanje povezanosti relevantnih genetskih polimorfizama i nalaza nuklearne magnetne rezonance mozga kod pacijenata sa depresivnim poremećajem**” dr Milutina Kostića predstavlja originalni naučni doprinos u rasvetljavanju potencijalnih homogenih podgrupa depresije što može imati veliki značaj za dijagnostiku i terapijski pristup. Korišćena su tri različita pristupa ovoj problematici, genetska, klinička i morfološka, uz to da je morfološki pristup odrađen sa tri različite tehnike magnetne rezonance i sa transkranijalnom ultrasonografijom. Ovo istraživanje je prvo koje je koristilo više od 2 genetska polimorfizma u definisanju podgrupa depresije i pritom je za definisane podgrupe pronašlo specifične morfološke susptrate što govori u prilog različitim etiopatogenetskim mehanizmima razvoja depresije kod osoba koje boluju od onoga što se danas dijagnostikuje kao depresivni poremećaj. Pored toga, ovo istraživanje je prvo koje je koristilo genetiku kao dodatan faktor u analiziranju rezultata transkranijalne ultrasonografije i koje je ukazalo na kliničke i genetske specifičnosti pacijenata koji imaju hipohogen nalaz u odnosu na pacijente sa normalnim nalazom. Rezultati ove doktorske disertacije mogu pomoći u razvoju pristupa specifičnijeg i kvalitetnijeg dijagnostikovanja depresivnog poremećaja.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima dobre istraživačke prakse. 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 i zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Milutina Kostića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 22.03. 2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Ivana Novaković

Prof. dr Tatjana Pekmezović

Prof. dr Sanja Totić-Poznanović

Doc. dr Šarlota Mesaroš

Prof. dr Slavica Čukić-Dejanović

Mentor:

Prof. dr Dušica Lečić-Toševski
