

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
MEDICINSKOG FAKULTETA U NIŠU
ODBORU ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE**

Predmet:

Stručna ocena i mišljenje o izradjenoj doktorskoj disertaciji dr Marije Trenkić Božinović

Odlukom Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Nišu od 30.03.2016. godine, prihvaćen je izveštaj mentora prof. dr Gordane Zlatanović o izradenoj doktorskoj disertaciji dr Marije Trenkić Božinović, pod odobrenim naslovom **“Komparativna analiza genske varijabilnosti i nivoa cirkulišućih faktora nekroze tumora, HSP 70 i Fas/FasL u primarnom glaukomu otvorenog ugla”** i imenovana je komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije u sastavu:

- Prof. dr Predrag Jovanović, predsednik, Medicinski fakultet Niš
- Prof. dr Gordana Zlatanović, mentor i član, Medicinski fakultet Niš
- Prof. dr Tatjana Jevtović Stoimenov, član, Medicinski fakultet Niš
- Prof. dr Miroslav Vukosavljević, član sa VMA Univerziteta odbrane Beograd
- Doc. dr Jasmina Jocić Đorđević, član, Medicinski fakultet Niš

U skladu sa ovom odlukom i pregledom doktorske disertacije, komisija donosi sledeći izveštaj.

IZVEŠTAJ

I Opšti podaci

Tema za izradu doktorske disertacije **dr Marije Trenkić Božinović** pod naslovom **“Komparativna analiza genske varijabilnosti i nivoa cirkulišućih faktora nekroze tumora, HSP 70 i Fas/FasL u primarnom glaukomu otvorenog ugla”** odobrena je odlukom Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Nišu br 04-KM-38/07, na sednici održanoj 24.04.2014. godine.

Doktorand dr Marija Trenkić Božinović, lekar specijalista oftalmologije, zaposlena na Klinici za očne bolesti Kliničkog centra u Nišu, obavila je istraživanje na Klinici za očne bolesti, Kliničkog centra u Nišu, Katedri za biohemiju i Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku, Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

II Odnos izradene doktorske disertacije prema prijavljenoj i odobrenoj temi

Doktorska teza **“Komparativna analiza genske varijabilnosti i nivoa cirkulišućih faktora nekroze tumora, HSP 70 i Fas/FasL u primarnom glaukomu otvorenog ugla”** predstavlja originalni i samostalan naučno-istraživački rad iz oblasti oftalmologije.

Naslov doktorske disertacije je u potpunosti saglasan sa sadržajem sprovedenog istraživanja. Ciljevi i metodologija rada su ostali nepromenjeni tokom celog toka istraživanja.

III Tehnički opis disertacije

Doktorska disertacija je napisana na 137 strana (tekst i literatura na 122 strane) i sastoji se iz poglavlja: Uvod, Pregled literature, Ciljevi istraživanja, Ispitanici i metode istraživanja, Rezultati istraživanja, Diskusija, Zaključak, Opšti zaključak, Literatura. Pored navedenog sadrži podatke o doktorskoj disertaciji na srpskom i engleskom jeziku, listu skraćenica i simbola, biografiju i izjave autora. Disertacija sadrži 70 tabela, 7 grafikona, 2 sheme, 5 slika. Broj bibliografskih podataka je 270. Tekst je pisan u Microsoft Word, font Times New Roman, veličine 12 pt.

IV Sadržajna struktura doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Marije Trenkić Božinović pod naslovom “**Komparativna analiza genske varijabilnosti i nivoa cirkulišućih faktora nekroze tumora, HSP 70 i Fas/FasL u primarnom glaukomu otvorenog ugla**” je originalan i samostalan naučni rad iz oblasti oftalmologije, sa dobro postavljenim ciljevima, koji su u skladu sa zadatom temom. Disertacija obuhvata opširan prikaz najnovijih svetskih saznanja iz oblasti genetske osnove bolesti i aktivnosti imunog sistema u primarnom glaukomu otvorenog ugla, i poređenje ovih saznanja sa adekvatnim kliničkim parametrima. U realizaciji istraživanja primenjena je savremena i adekvatna metodologija. Rezultati su temeljno statistički obradjeni i dobro dokumentovani tabelama i grafikonima, a zaključci do kojih se došlo će doprineti boljem razumevanju patogeneze primarnog glaukoma otvorenog ugla, novijem dijagnostičkom postupku i lečenju bolesnika sa primarnim glaukomom otvorenog ugla. Metodologija je adekvatna i detaljno objašnjena tako da omogućava laku proverljivost i reproducibilnost istraživanja.

U **uvodnom delu** disertacije se iznose najnoviji podaci o etiologiji, patogenezi i podeli glaukoma, o dijagnostičkim procedurama, koje su neophodne da bi se postavila dijagnoza i omogućilo adekvatno praćenje pacijenata sa primarnim glaukomom otvorenog ugla i ciljevima terapije ove bolesti. Posebno se ističe značaj najnovijih saznanja o ulozi ekscitotoksičnosti, oksidativnom stresu i autoimunosti u patogenezi primarnog glaukoma otvorenog ugla.

U poglavlju **pregled literature** prikazana su najnovija saznanja ne samo o etiologiji, faktorima rizika, patogenezi, kliničkoj slici, lečenju i ciljevima lečenja već i o neurodegeneraciji i neuroprotekciji u glaukomu. Istaknuta su najnovija genetska saznanja u patogenezi primarnog glaukoma otvorenog ugla (POAG), autoimunosti i najnovijim biomarkerima oksidativnog stresa, imunog odgovora i apoptoze u POAG (TNF- α , HSP 70, Fas i FasL). Genetska heterogenost POAG ukazuje da su različiti geni ili različiti genetski mehanizmi uključeni u njegovu prirodu. Promena koncentracije različitih medijatora zapaljenja i imunog odgovora u krvi, očnoj vodici ili tkivima oka podržava teoriju o aktivnosti imunog sistema u patogenezi POAG. Faktor nekroze tumora - alfa (TNF- α), važan proinflamatorni citokin, ispoljava razne fiziološke i patogene efekte koji dovode do razaranja tkiva. Nedavna istraživanja ukazuju da TNF- α ima ili zaštitnu ulogu ili negativni efekat u patogenezi POAG. Stoga, je postavljena **hipoteza** da genski polimorfizam TNF- α (-308, -863) može biti jedan od genetskih faktora za razvoj POAG zbog dejstva na proteinsku ekspresiju TNF- α . Takođe, određivanje HSP 70 u serumu i solubilnih Fas i FasL u očnoj vodici bi definisalo njihovu ulogu u patogenezi POAG.

Ciljevi istraživanja su jasno definisani: utvrđivanje međuzavisnog kliničkog i biohemijskog nalaza (sa osvrtnom na genski polimorfizam i savremene biomarkere) kod osoba obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG-HTG):

1. Kliničko ispitivanje bolesnika obolelih od glaukoma otvorenog ugla standardnom i opšteprihvaćenom metodologijom (vidna oštrina, izgled komornog ugla, visina intraokularnog pritiska, morfometrija glave vidnog živca, nalaz vidnog polja, debljina peripapilarnih nervnih vlakana).

2. Ispitivanje distribucije genskih polimorfizama na genu za TNF- α -308 G/A i -863 C/A kod pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG) u odnosu na zdrave ispitanike.
3. Ispitivanje učestalosti alela i polimorfnih genotipova na genu za TNF- α (-308 i -863) kod pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG) i utvrđivanje odnosa genskog polimorfizma i kvantitativnih kliničkih parametara bolesti.
4. Određivanje serumske koncentracije faktora nekroze tumora (TNF- α) i proteina toplotnog šoka 70 (HSP 70) kod pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG) i ispitivanje veze ovih biomarkera i stepena kliničkog razvoja bolesti, kao i genskog polimorfizma.
5. Određivanje koncentracije Fas i FasL u očnoj vodici pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG) i uvrđivanje veze ovih markera apoptoze i stepena kliničkog razvoja bolesti.

U poglavlju **Ispitanici i metode istraživanja** opisano je navedeno istraživanje izvedeno po metodu prospektivne komparativne studije. Za istraživanje je korišćen biološki materijal (eritrociti, plazma i DNK) pacijenata obolelih od glaukoma i staračke katarakte i kontrolne grupe zdravih subjekata. Istraživanje je obavljeno na Klinici za očne bolesti, Kliničkog centra u Nišu, Katedri za biohemiju i Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku, Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. U ovo istraživanje uključeno je 357 ispitanika, podeljenih u četiri grupe: 81 ispitanik oboleo od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG); 77 ispitanika sa staračkom kataraktom; 35 ispitanika obolelih od pseudoeksfolijativnog glaukoma otvorenog ugla (PEXG); 164 zdravih subjekata koji su po starosti i polu odgovarali pacijentima. Obradeno je po 30 uzoraka očne vodice pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim očnim pritiskom (hipertenzivnog glaukoma, HTG), ispitanika sa staračkom kataraktom i bolesnika obolelih od pseudoeksfolijativnog glaukoma otvorenog ugla. Detaljno su opisane korišćene metode kliničkog pregleda. Dat je detaljan opis dijagnostičkih procedura koje odgovaraju u potpunosti najsavremenijim standardima za postavljanje dijagnoze i praćenje progresije kod pacijenata sa glaukomom otvorenog ugla. Jasno su definisani kriterijumi za uključivanje, tj. isključenje iz studije. Opisane su metode uzorkovanja krvi i očne vodice. Precizno su opisane sve ELISA metode i testovi korišćeni za određivanje serumskih koncentracija TNF- α i HSP 70, i koncentracije Fas i FasL u očnoj vodici pacijenata, kao i postupak detekcije polimorfizma na genu za TNF- α metodom PCR- RFLP. U analizi podataka primenjen je adekvatan **statistički metod** koji je detaljno objašnjen.

Rezultati su detaljno i pregledno prikazani tabelama i grafikonima. U istraživanje je uključeno 357 ispitanika, podeljenih u četiri grupe: 81 ispitanik oboleo od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (hipertenzivni glaukom, POAG- HTG), 77 ispitanika sa staračkom kataraktom (CAT), 35 ispitanika obolelih od pseudoeksfolijativnog glaukoma otvorenog ugla (PEXG) i 164 zdravih subjekata koji su po starosti i polu odgovarali pacijentima. U tri ispitivane grupe (I, II, III) bilo je 193 pacijenta. Grupa ispitanika je bila nehomogena u odnosu na raspodelu tipova glaukoma i kataraktu (χ^2 test: $p < 0,001$). Zastupljenost pacijenata obolelih od POAG- HTG (81, tj. 41,97%) i pacijenata sa kataraktom (77, tj. 39,90%) bila je značajno veća u odnosu na zastupljenost pacijenata obolelih od PEXG koji je dijagnostikovao kod 35 (18,13%) ispitanika. Nije bilo statistički značajne razlike u starosti ($71,13 \pm 9,35$ godina) između ispitivanih grupa ($p < 0,001$), kao ni u odnosu na pol (52,33% muškaraca, 47,67% žena). Kod pacijenata obolelih od POAG-HTG dominirala je vidna oštrina 0,9–1,0 i nju je imalo 69 (42,59%) očiju ove grupe, što je statistički značajno viša zastupljenost u odnosu na sve ostale vidne oštrine ($p < 0,001$). Najveća vrednost IOP bila je kod očiju ispitanika obolelih od PEXG, sledi IOP pacijenata obolelih od POAG- HTG. Vrednosti IOP u obe ove grupe ispitanika statistički su značajno veće u odnosu na ispitanike sa staračkom kataraktom, kod kojih je ujedno i najniža vrednost IOP ($p < 0,001$). Prikazani su rezultati istraživanja koji se odnose na indeks eskavacije vidnog živca, otvorenost i

pigmentaciju komornog ugla, funkcionalna ispitivanja i parametre vidnog polja: MD, PSD i CPSD, kao i morfološka ispitivanja debljine peripapilarnih nervnih vlakana retine: RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf.

Najviša serumska koncentracija TNF- α bila je kod pacijenata obolelih od PEXG (2,05 \pm 1,48 pg/ml), niža kod obolelih od POAG- HTG (2,04 \pm 1,98 pg/ml), a najniža kod ispitanika sa senilnom kataraktom (1,43 \pm 2,0 pg/ml). Sprovedeno istraživanje pokazalo je postojanje statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji TNF- α između grupe POAG- HTG i PEXG u odnosu na grupu ispitanika sa senilnom kataraktom ($p < 0,05$). Nije utvrđena statistički značajna korelacija koncentracije TNF- α u serumu ni sa jednim ispitivanim kliničkim parametrom koji bi odredio stepen razvoja i oštećenja u glaukomu, kao što su vidna oštrina, visina IOP, MD, PSD, CPSD, RNFL Avg, RNFL Sup, RNFL Inf. Rezultati kliničkih ispitivanja su pokazali da nisu utvrđene statistički značajne razlike između grupe pacijenata obolelih od POAG- HTG i PEXG poređenjem vrednosti RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf.

Centralna tema istraživanja se odnosi na proučavanje genskog polimorfizma -308 i -863 za TNF- α . Rezultati ukazuju da je zastupljenost genotipa GG na genu -308 za TNF- α statistički značajno veća kod POAG- HTG ispitanika (81,69%) u odnosu na kontrolnu grupu potpuno zdravih subjekata (68,90%) ($p < 0,05$). Nije utvrđen nijedan genotip (GG, GA, AA) za polimorfizam gena -308 TNF- α koji statistički značajno utiče na vrednosti ispitivanih parametara (vidna oštrina, IOP, C/D, MD, RNFL Avg, RNFL Sup, RNFL Inf) kod ispitanika obolelih od POAG- HTG.

Genotip CC na genu -863 za TNF- α je bio zastupljeniji kod pacijenata obolelih od POAG-HTG (70,42%), statistički zastupljeniji u odnosu na kontrolnu grupu zdravih subjekata (54,63%) ($p < 0,05$), a u odnosu na PEXG (50,00%) bio je veoma blizu granice statističke značajnosti ($p = 0,0556$). Nije utvrđen nijedan genotip (CC, CA, AA) za polimorfizam -863 gena za TNF- α koji statistički značajno utiče na vrednosti ispitivanih parametara (vidna oštrina, IOP, C/D, MD, RNFL Avg, RNFL Sup, RNFL Inf) kod ispitanika obolelih od POAG- HTG. Blizu granice statističke značajnosti je uticaj AA genotipa koji smanjuje vrednosti MD za 7,22, odnosno vrednosti C/D za 0,14.

Rezultati biohemijskih ispitivanja pokazuju da su serumske vrednosti HSP 70 bile veoma slične u sve tri grupe ispitanika (POAG- HTG 2,27 \pm 1,70 ng/ml, PEXG 2,14 \pm 0,96 ng/ml, katarakta 2,20 \pm 1,32 ng/ml), pa nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih pacijenata. Koncentracija HSP 70 u serumu je jedini faktor koji statistički značajno utiče na MD vidnog polja, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf pacijenata sa POAG- HTG. Povećanje HSP 70 za jednu mernu jedinicu uzrokuje kod pacijenata sa POAG- HTG značajan pad vrednosti MD, RNFL Avg RNFL Sup i RNFL Inf.

Sprovedeno istraživanje pokazalo je da je vrednost Fas u očnoj vodici bila najveća kod očiju sa PEXG (720,14 \pm 167,39 pg/ml), niža kod pacijenata obolelih od POAG- HTG (713,43 \pm 162,69 pg/ml). Solubilni Fas u očnoj vodici glaukomnih pacijenata ima ulogu u patogenezi primarnog glaukoma otvorenog ugla i u vezi je sa progresijom glaukomnog oštećenja, tj. RNFL Inf.

Koncentracija solubilnog FasL u očnoj vodici bila je najniža kod pacijenata obolelih od POAG- HTG (9,28 \pm 0,551 pg/ml), gotovo statistički značajno manja u odnosu na koncentraciju FasL kod pacijenata obolelih od PEXG (9,45 \pm 0,61 pg/ml) ($p = 0,0566$). Nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji FasL iz očne vodice očiju obolelih od različitih tipova glaukoma i očiju sa staračkom kataraktom (9,48 \pm 9,46 pg/mL). Rezultati istraživanja definisali su solubilni FasL kao značajan biomarker u patogenezi glaukomnog oštećenja. Takođe, sFasL je definisan kao pomoćna merna jedinica za funkcionalna (MD) i strukturalna (RNFL Avg) glaukomatozna oštećenja. Porast FasL u grupi pacijenata sa PEXG za mernu jedinicu dovodi do pada RNFL Sup za 48,47.

Diskusija rezultata je u skladu sa metodologijom drugih studija koje ispituju genski polimorfizam -308 i -863 za TNF- α , kao i nivoe biomarkera TNF- α , HSP 70, Fas i FasL i kliničkih parametara pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla. Doktorand je diskutovao rezultate svog istraživanja poredeći ih sa rezultatima savremenih studija.

Navedeni **zaključci** proističu iz rezultata rada, sadrže odgovore na postavljene ciljeve istraživanja i otvaraju nove perspektive o genskoj osnovi glaukomne bolesti i aktivnosti auto-imuniteta i učesću apoptoze u glaukomnoj neuropatiji. Zaključci ukazuju da je serumski TNF- α moćan citokin sa značajnom

ulogom u patogenezi glaukoma i glaukomnoj neuropatiji. Takođe, HSP 70 i solubilni Fas i FasL imaju ulogu u patogenezi primarnog glaukoma otvorenog ugla i mogu biti pokazatelji razvoja i progresije glaukomne neuropatije. Dokazano je da A alelni polimorfizam -863 za TNF- α ima zaštitnu ulogu u patogenezi primarnog glaukoma otvorenog ugla.

Poslednje poglavlje, **literatura**, sadrži 270 referenci, novijeg datuma, uglavnom stranih autora i sa engleskog govornog područja.

V Ocena naučnog doprinosa doktorske disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom “**Komparativna analiza genske varijabilnosti i nivoa cirkulišućih faktora nekroze tumora, HSP 70 i Fas/FasL u primarnom glaukomu otvorenog ugla**” predstavlja originalni i samostalni naučno- istraživački rad kandidata sa značajnim doprinosom u oblasti oftalmologije. Postavljene hipoteze i ciljevi doktorske teze su aktuelni. Za proveru naučne hipoteze i postavljenih ciljeva istraživanja korišćena je odgovarajuća metodologija, klinička, biohemijaska i genetska, precizno objašnjena. Istraživanje je dizajnirano da se tehnički može relativno lako izvesti i ponoviti. Disertacija je napisana jasnim i preciznim stručnim jezikom, i omogućava sveobuhvatni pristup temi istraživanja. Primenjena je adekvatna statistička metodologija. Rezultati doktorske disertacije predstavljaju značajan doprinos proučavanju genskog polimorfizma pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla, cirkulišućih nivoa biomarkera TNF- α i HSP 70 u serumu glaukomnih pacijenata, kao i nivoa Fas i FasL u očnoj vodici glaukomnih pacijenata i međusobnoj povezanosti ovih genskih i biohemijaskih markera sa najbitnijim kliničkim parametrima na kojima se zasniva dijagnostikovanje glaukoma i praćenje progresije bolesti. Izvedeni zaključci proističu iz dobijenih rezultata i otvaraju mogućnost daljeg istraživanja.

VI Ocena kandidata

Prilikom izrade doktorske disertacije kandidat **dr Marija Trenkić Božinović** pokazala je sklonost za adekvatan izbor teme i studioznu analizu aktuelnih problema u dijagnostici, patogenezi i praćenju glaukomne neuropatije. Kandidat je pokazao sposobnost za primenu adekvatne metodologije naučnog istraživanja, sposobnost korišćenja referentne literature, temenjan pristup problemu i visoki stepen analitičnosti.


ZAKLJUČAK KOMISIJE

Doktorska disertacija dr Marije Trenkić Božinović, pod nazivom **“Komparativna analiza genske varijabilnosti i nivoa cirkulišućih faktora nekroze tumora, HSP 70 i Fas/FasL u primarnom glaukomu otvorenog ugla”** izrađena je prema savremenim principima naučno-istraživačkog rada i predstavlja originalan i naučno zasnovan rad. Doktorska disertacija je uspešno realizovana u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja. Dobijeni rezultati su jasno prikazani i zaključci daju jasne odgovore na postavljene ciljeve istraživanja. Korišćena je aktuelna literatura novijeg datuma kako u uvodu, tako i u diskusiji, pri komparaciji dobijenih rezultata iz dosadašnjih studija. Kandidatkinja je ovim istraživanjem dala doprinos razvoju saznanja o genskom polimorfizmu pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla, cirkulišućih nivoa biomarkera TNF- α i HSP 70 u serumu glaukomnih pacijenata, kao i nivoa Fas i FasL u očnoj vodici glaukomnih pacijenata i međusobnoj povezanosti ovih genskih i biohemijskih markera sa najbitnijim kliničkim parametrima na kojima se zasniva dijagnostikovanje glaukoma i praćenje progresije bolesti.

Na osnovu svih navedenih podataka, komisija u navedenom sastavu prihvata i pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju dr Marije Trenkić Božinović, pod nazivom **“Komparativna analiza genske varijabilnosti i nivoa cirkulišućih faktora nekroze tumora, HSP 70 i Fas/FasL u primarnom glaukomu otvorenog ugla”** i predlaže Odboru za poslediplomske studije i Nastavno-naučnom veću Medicinskog fakulteta u Nišu da usvoji pozitivnu ocenu izradene doktorske disertacije i pokrene postupak za njegovu javnu usmenu odbranu.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Predrag Jovanović
predsednik, Medicinski fakultet Niš




Prof. dr Gordana Zlatanović
mentor i član, Medicinski fakultet Niš



Prof. dr Tatjana Jevtović Stoimenov
član, Medicinski fakultet Niš



Prof. dr Miroslav Vukosavljević
član sa VMA Univerziteta odbrane Beograd



Doc. dr Jasmina Jocić Đorđević
član, Medicinski fakultet Niš



U Nišu, 2016. godine.