

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRADU

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

„Utvrđivanje povezanosti relevantnih genetskih polimorfizama i nalaza nuklearne magnetne rezonance mozga kod pacijenata sa depresivnim poremećajem”

kandidata dr Milutina Kostića, zaposlenog u Institutu za mentalno zdravlje u Beogradu, kao lekar specijalista psihijatrije. Mentor je prof. dr Dušica Lečić 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, Instituta 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 ĐukićDejanović, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Milutina Kostića napisana je na 134 strane i podeljena je na sledeća 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 čestog 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 urađena 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 čitavog 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

poremećaj, agorafobija i socijalna fobija) i poremećaja ličnosti, ugrađeni metalni predmeti u telo usled kojih snimanje magnetnom rezonancom ne bi bilo moguće, kao i sumnja na zloupotrebu medicinske službe sa ciljem sticanja tercijarne dobiti. Kontrolna grupa je uključivala 73 zdrava dobrovoljca, koja nisu imali podatke o bilo kakvom psihijatrijskom poremećaju i koji su upareni po polu i godinama sa studijskom grupom, tj. pacijentima sa depresivnim poremećajem. magnetnom rezonancom i transkranijalnom sonografijom rađeno je na Klinici za neurologiju KCS. Molekularno genetičke analize: Real-time PCR, TaqMan metodologija za genotipizaciju, standardna PCR metoda i restrikciona digestija rađeni su u genetskoj laboratoriji Klinike za neurologiju KCS. Softverska obrada snimaka magnetnom rezonancom rađena 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 naučne prakse* Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Studija je odobrena od strane Etičkog 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 klinička obrada, sa opisom uključujućih i isključujućih kriterijuma, opisom odabranih instrumenata. Drugi korak je vađenje krvi, izolacija DNK i molekularno genetičke analize 3 polimorfizma: rs6265; rs4680; 5-HTTLPR. Treći korak je snimanje magnetnom rezonancom aparatom jačine 1,5 T i detaljan opis obrade snimaka radi analiziranja morfometrije zasnovane na vokselima, debljine korteksa i traktografije. Četvrti korak je snimanje transkranijalne sonografije transduktorom (sondom) jačine 2,5 MHz. Poslednji korak je statistička 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 ograničenja primenjenog istraživanja.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **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 režnjau 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 serotoniniskog transportera. Kada se posmatraju interakcije pronađeno je da pacijenti sa visokom statističkom značajnošću imaju upravo kombinaciju ova tri alela. Korišćenjem ovog rezultata kao odskočne daske za dalje analize napravljen je akumulacioni model. Visoko rizičnu grupu 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 podela na visoko, intermedijarno i nisko rizičnu grupu je napravljena i sa kontrolama.

Upoređivanjem grupa akumulacionog modela uočeno je da pacijenti oboleli od depresivnog poremećaja sa visokim rizikom imaju značajno češći hereditet u odnosu na ostale pacijente. Takođe je uočeno da imaju veće diurnalne varijacije raspoloženja kao potencijalno kliničku specifičnost ove grupe. Morfološki uočeno je nekoliko razlika među grupama. Morfometrijom zasnovanom na vokselima pronađeno 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 srednje 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 poređenju sa visoko rizičnim i nisko rizičnim pacijentima. Traktografijom je pronađeno da su i visoko rizični i nisko rizični pacijenti imali smanjenu frakcionu anizotropiju korpusa kalozuma (KK), posebno izraženo u telu KK, u odnosu na visoko rizične kontrole.

Kada se porede pacijenti sa i bez komorbiditeta generalizovanog anksioznog poremećaja pronađeno je da su, u poređenju sa samo depresivnim poremećajem, pacijenti sa ovim komorbiditetom pokazivali kortikalno stanjivanje u desnom medijalnom orbitofrontalnom korteksu, desnom fuziformnom korteksu, levom temporalnom polu i levom lateralnom okcipitalnom girusu. Primenom traktografije pronađeno je da su, u poređenju sa zdravim kontrolama, pacijenti samo sa depresijom, ali ne i sa komorbiditetom, imali povećanu aksijalnu i srednju difuzivnost bilateralno u superiornom longitudinalnom fascikulusu.

U ispitivanom uzorku pronađeno je da je hipoehogenost rafe značajno češća kod pacijenata obolelih od depresivnog poremećaja u odnosu na kontrole. Urađena je stepwise diskriminaciona analiza i utvrđeno je da su 4 prediktora koja su zajednički uticala na ehogenost rafe kod pacijenata: HAMA pitanje 5 (poremećaj koncentracije), komorbiditet socijalne fobije, S homozigot 5-HTTLPR i komorbiditet generalizovanog anksioznog poremećaja.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U uzorku korišćenom za ovu doktorske disertacije pronađeno je da su od tri izučavana polimorfizma, kod pacijenata češći 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 značajnost ili trend, ali ako se sva tri akumuliraju da se dobija visoka značajnost i da tek sa akumulacijom faktora rizika dolazi do povećane podložnosti za depresivni poremećaj. I ranije je pokazano da je BDNF Val alel značajan u razvoju bazične anksioznosti, neuroticizma (Lang et al, 2005) i povećane verovatnoće za razvoj depresivnih simptoma (Chen et al, 2013). I za Met alel

COMT postoje istraživanja koja dovode upravo ovaj alel sa većom podložnošću za razvojem depresivnog poremećaja (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 najčešće zavisni od dodatnih uslova da bi se značajnost uočila (stres, na primer) (Caspi et al, 2003). Direktno poređenje rezultata akumulacionog modela sa nekim drugim istraživanjem nije moguće s obzirom na to da je do sada urađeno 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).

Utvrđeno je da visoko rizična grupa ima najveći hereditet. To može ukazati da da nije svaka depresija jednako nasledna, niti sve depresije imaju isto genetsko opterećenje, što je koncept koji su Flint i Kendler već predstavili (Flint & Kendeler, 2014).

Visoko rizična grupa ima i povećanu 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 najveća 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 poremećaja i ostavljaju mogućnost da se podgrupe sa specifičnim lezijama bele mase mogu naći u budućnosti. Upravo je istraživanje doktoranta imalo takav pristup i pokazalo je da visoko rizični i nisko rizični pacijenti imaju poremećaj mikrostrukture bele mase u korpusu kalozumu (posebno izraženo u telu korpusa kalozuma) u odnosu na visoko rizične kontrole i to u vidu smanjenja frakcione anizotropije.

Merenjem debljine korteksa pronađeno je da visoko rizični pacijenti imaju stanjenu sivu masu moždane kore obostrano u rostralnim srednjim frontalnim girusima u odnosu na visoko i nisko rizične kontrole. Ova oblast je deo dorzolateralnog prefrontalnog korteksa. Redukcija ove oblasti predstavlja čest nalaz u istraživanjima depresivnog poremećaja (Kang

et al, 2015). Drugi nalaz je stanjenje desnog lateralnog okcipitalnog girusa kod visoko rizičnih pacijenata u odnosu na visoko rizične 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 pronađeno je da visoko rizična grupa pacijenata ima značajno smanjen volumen prevashodno frontalnih područja mozga u odnosu na nisko rizičnu grupu. Velika meta analiza morfometrije zasnovane na vokselu u depresivnom poremećaju je upravo izdvojila donji frontalni girus kao jednu od oblasti koja je smanjena u depresiji što je pronađeno i za visoko rizičnu grupu ove doktorske disertacije (Du et al, 2012).

Urađena je diskriminantna analiza koja je pokazala da su značajni prediktori hipoehogenosti rafe uzrokovani prisustvom komorbidnog anksioznog poremećaja, sa visoki skorom na pitanju 5 HAMA upitnika (poremećaj koncentracije i memorije) i homozigotnost za S alel 5-HTTLPR polimorfizma. Još ranije je pokazano da je serotoninaska aktivnost smanjena u anksioznim i depresivnim poremećajima (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 hipoehogenošću rafe, koja češće ima S homozigot 5-HTTLPR i veći pad koncentracije i druga, sa normalnom ehogenošću rafe i manje izraženim simptomima anksioznosti.

D) Objavljen rad koji čini 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 „**Utvrđivanje 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 genska 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 hipoehogen 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 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 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 Đukić Dejanović

Mentor:

Prof. dr Dušica Lečić Toševski
