

Научно наставном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду

На седници од 17.11.2011. Научно веће Медицинског факултета у Београду одредило је комисију за оцену докторске тезе кандидаткиње мр сци мед др Јасне Тодоровић, под насловом ПРОТЕИНИ АПОПТОЗЕ У ШТИТАСТОЈ ЖЛЕЗДИ ОБОЛЕЛИХ ОД ХАШИМОВОГ И ЛИМФОЦИТНОГ ТИРОИДИТИСА.

Комисија у саставу

Проф др Божо Трбојевић, редовни професор Медицинског факултета у Београду, председник

Проф. др Снежана Жунић Божиновски, ванредни професор Медицинског факултета у Београду

Проф др Новица Милићевић, редовни професор Медицинског факултета у Београду

Проф др Светислав Татић, ванредни професор Медицинског факултета у Београду

Доц. др Небојша Митић, Медицински факултет Косовска Митровица

је проучила садржај тезе и подноси Већу једногласни

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација др Јасне Тодоровић је написана на 107 страна, садржи 8 поглавља и има 16 прилога у виду 2 табеле и 14.графикона као и фотодокументацију у виду 24 фотографије бојених ткивних препарата. Поглавља су како је уобичајено у изради докторске тезе посвећена уводним напоменама, дати су циљеви, описан је избор пацијената и поступака за обраду материјала, саопштени су резултати који су потом дискутовани у наредном поглављу коме следи поглавље закључака и списак литературних одредница.

Дисертација садржи сажетак на српском и енглеском језику, списак скраћеница и биографију кандидаткиње.

У уводном поглављу су исцрпно и документовано описани појмови значајни за разумевање програмиране ћелијске смрти, наведени су облици и до сада упознати механизми умирања ћелије првенствено у физиолошким али и у патолошким околностима. Посебан простор је одвојен за објашњење апоптозе, њеног значаја и улоге, механизма функционисања, генетској контроли, молекуларној природи чинилаца који учествују у овом сложеном биолошком процесу. Описани су природа ензимских учесника у апоптози, апоптозни путеви, значај митохондрија у апоптози, учешће јона у апоптози и улога протеинских чинилаца апоптозе.

У другом делу увода описани су основни подаци из физиологије тироидне жлезде, патофизиологије запаљенских стања, тироидитиса, преглед класификације ових поремећаја са посебним освртом на недовољно познавање прецизних етиолошких чињеница неопходних за поуздану узрочну класификацију ових стања. Нарочито је подвучена блиска али ипак различита природа лимфоцитног тироидитиса и лимфоматозне струме (Хашимото тироидитиса) и потреба да се ове често суптилне разлике утврде јер је природа ова два ентитета различита. Потом је направљена синтеза у приступу улози апоптозе у тироидној аутоимуности. Дат је преглед савремених схватања улоге апоптозе у имунским процесима уопште и у тироидној имуности (аутоимуности) посебно. Потом су описане форме тироидитиса који су предмет студије са основним епидемиолошким, клиничким, лабораторијским и посебно молекуларним особеностима. Описана су сазнања о могућој

улози апоптозе у природном току лимфоматозне струме (Хашимото тироидитиса) а затим је исти поступак примењен за опис лимфоцитног тироидитиса. С обзиром да је у студији коришћена и група са простом, нетоксичном струмом, описана је њена природа, основне особености у клиничком и лабораторијском изгледу и до сада познате чињенице о учешћу апоптозе у току ове врсте структурне промене штитасте жлезде. На крају је дат преглед основних особености, клиничког значаја и улоге две класе тироидних аутоантитела, анти-тироглобулинских и антитела према тироидној пероксидази.

Увод је у целини информативан, неоптерећен вишком чињеница, указује на савременост и значај студираног проблема и представља добру полазну базу за развијање радне хипотезе. У поглављу Циљеви на једној страници су дати очекивани исходи (радне хипотезе) на основу следећих постављених циљева:

Радна хипотеза: Апоптоза је укључена у патогенезу Хашимотовог и лимфоцитног тироидитиса, али се ова обољења разликују по:

- степену апоптозе тироцита и инфилтришућих лимфоцита;
- експресији про-апоптотског (Bax) и анти- апоптотског (Bcl2) молекула;
- степену корелације између нивоа апоптозе и експресије испитиваних про- и анти-апоптотских молекула;
- нивоу анти-тиреоглобулинских и анти-пероксидазних антитела;

За проверу ове хипотезе постављени су следећи циљеви:

У групи испитаника оболелих од Хашимотовог тироидитиса, лимфоцитног тироидитиса и нодозне струме (контролна група) одредити и међусобно упоредити:

1. Нивое анти-тиреоглобулинских и анти-тиреопероксидазних антитела;
2. Степен апоптозе тироцита и инфилтришућих лимфоцита у узорцима ткива оперисаних штитастих жлезда;
3. Нивое експресије про-апоптотског (Bax) и анти- апоптотског (Bcl2) молекула у тироцитима и инфилтришућим лимфоцитима;
4. Међусобну повезаност између степена апоптозе и нивоа експресије про- и анти-апоптотских молекула у тироцитима и инфилтришућим лимфоцитима;
5. Међусобну повезаност између нивоа испитиваних аутоантитела и параметара апоптозе у штитастој жлезди.

Поглавље посвећено избору пацијената и коришћеним поступцима и методама на 8 страна садржи основне податке о испитиваним групама. Истраживање је спроведено на 36 особа, од тога 33 жене и 3 мушкарца. Они су разврстани у 3 групе. Прву групу чине особе оболеле од Хашимотовог тироидитиса (16 особа), другу групу особе оболеле од лимфоцитног тироидитиса (10 особа,) и трећу групу чине особе са колоидном струмом (10 особа,). Трећа група је контролна група. Сви испитаници су били еутироидни током испитивања. Од шеснаест испитаника у првој групи, њих 11 је било на супституционој терапији тироидним хормонима, док је у другој и трећој групи од њих 10 само по једна особа била на супституционој терапији. Потом су исцрпно и у детаље описане методе за лабораторијску обраду (одређивање тироидних хормона у циркулацији, одређивање тироидних аутоантитела и одређивање тироглобулина у циркулацији) и за имунохистохемијску обраду режњева ткива штитасте жлезде добијених хируршким путем. За параметарску статистику и хомогене групе је коришћен тест ANOVA и Post Hoc test Tukey HSD ако је показано да међу групама постоји статистички значајна разлика, а за нехомогене групе је коришћен тест Welch и Post Hoc test Games Hoowel ако је показано да међу групама постоји статистички значајна разлика. За непараметарску статистику је коришћен Kruskal-Wallis и Mann-Whitney тест. Поред тога, коришћен је и Wilcoxon тест рангова. За испитивање постојања корелације између одређених параметара коришћен је Spearman тест. Разлика је сматрана статистички значајном уколико је p мање од 0.05 ($p < 0,05$).

У поглављу посвећеном резултатима на 35 страна текста са табелама и графиконима дати су резултати учињених тестова и поступака са квалификованим образложењима добијених налаза, тумачењима могућих узрока и објашњењима значаја у светлу постављених циљева тезе. На крају поглавља је документаија фотографијама посматраних препарата светлосном микроскопијом обојених методама описаним у претходном поглављу.

У поглављу дискусије на 18 страница после увода који осветљава опште околности које су биле повод да се проблем који је обрађен препозна као интересантан и значајан како са научног, тако и практичног аспекта, дискутован је сваки појединачни налаз са сличним из савремене литературе. Импресивно је са колико је критичности, поузданости и научне оштрине сваки резултат оцењиван, одмераваан и провераван са резултатима других аутора било да су сагласни или да су више или мање опречни резултатима добијеним у овој студији.

Закључци на 2 странице систематски прате логику постављених циљева и одговарају на питања постављена у том делу тезе. Са сигурношћу се може рећи да су закључци зрели, добро утемељени, засновани на резултатима и не остављају простор за недоумице и недоречености.

У литературном додатку цитирано је 130 одредница домаће и стране литературе. По природи теме, литература је новијег датума, у највећој мери из периодике са највишим импакт факторима.

Прилог је списак скраћеница.

Теза је написана књижевним српским језиком. По природи теме у великој мери су коришћени англицизми јер у српском језику нема одговарајућих појмова, али су транскрипција или фонетизација поштовани у највећој мери тако да се текст лако чита и потпуно разуме.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

У првом делу су дати општи демографски подаци испитиваних група и епидемиолошки подаци о испитиваним променама у штитастој жлезди. Потом су дате просечне вредности испитиваних параметара метаболичког статуса испитиваних група. Дате су просечне вредности тироглобулина а затим вредности тироидних аутоантитела (према тироглобулину и тироидној пероксидази).

Потом су приказани резултати испитивања апоптозе у тироцитима и лимфоцитима који инфилтришу тироидну жлезду у Хашимото односно лимфоцитном тироидитису. Kruskal-Wallis тестом је показано да постоји статистички високо значајна разлика међу групама у погледу броја тироцита у апоптози, па је применом Mann-Whitney теста добијено да између Хашимотовог и лимфоцитног тироидитиса нема статистички значајне разлике, док, с друге стране, између Хашимотовог тироидитиса и струме, постоји високо значајна разлика, а између лимфоцитног тироидитиса и струме статистички значајна разлика. Kruskal-Wallis тест је показао да постоји статистички високо значајна разлика међу групама у погледу броја лимфоцита у апоптози, па је применом Mann-Whitney теста добијено да између Хашимотовог и лимфоцитног тироидитиса нема статистички значајне разлике, као ни између лимфоцитног тироидитиса и струме, док између Хашимотовог тироидитиса и струме постоји статистички значајна разлика. Графички приказан, процентуални однос апоптотских тироцита и лимфоцита је као слика у огледалу. Испитивањем протеинских маркера апоптозе Kruskal-Wallis тест је показао да међу групама не постоји статистички значајна разлика у заступљености Bcl2 позитивних тироцита. Исти тест није показао ни статистички значајну разлику у експресији Bcl2 на лимфоцитима у све три испитиване групе.

Kruskal-Wallis тест је показао да међу групама не постоји статистички значајна разлика у заступљености Вах позитивних тироцита, али да постоји статистички високо значајна разлика међу групама у погледу броја Вах позитивних лимфоцита, па је применом Mann-Whitney теста добијено да постоји статистички значајна разлика у Вах позитивним лимфоцитима између свих испитиваних група.

Применом Wilcoxon теста рангова добијено је да у Хашимотовом тироидитису постоји статистички високо значајна разлика између броја апоптотских тироцита и апоптотских лимфоцита као и између броја Bcl2 позитивних тироцита и Bcl2 позитивних лимфоцита. Такође, статистички високо значајна разлика постоји и између броја Вах позитивних тироцита и Вах позитивних лимфоцита.

Применом Wilcoxon теста рангова у лимфоцитном тироидитису добијено је да постоји статистички високо значајна разлика између броја апоптотских тироцита и апоптотских лимфоцита као и између броја Вах позитивних тироцита и Вах позитивних лимфоцита док између Bcl2 позитивних тироцита и Bcl2 позитивних лимфоцита постоји статистички значајна разлика.

Применом Wilcoxon теста рангова добијено је да постоји у струми статистички значајна разлика између броја апоптотских тироцита и апоптотских лимфоцита, док између броја Bcl2 позитивних тироцита и Bcl2 позитивних лимфоцита постоји статистички високо значајна разлика. Такође, статистички високо значајна разлика постоји и између броја Вах позитивних тироцита и Вах позитивних лимфоцита.

Вршено је и испитивање постојања корелације између одређених параметара унутар испитиваних група. Параметри између којих је испитивано постојање корелације су следећи: процента апоптотских тироцита, односно лимфоцита и нивоа тиреоглобулина, процента апоптотских тироцита, односно лимфоцита и нивоа антитиреоглобулинских антитела, процента апоптотских тироцита, односно лимфоцита и нивоа антипероксидазних антитела, процента Bcl 2 позитивних тироцита, односно лимфоцита и нивоа тиреоглобулина, процента Bcl 2 позитивних тироцита, односно лимфоцита и нивоа антитиреоглобулинских антитела, процента Bcl 2 позитивних тироцита, односно лимфоцита и нивоа антипероксидазних антитела, процента Вах позитивних тироцита, односно лимфоцита и нивоа тиреоглобулина, процента Вах позитивних тироцита, односно лимфоцита и нивоа антитиреоглобулинских антитела, процента Вах позитивних тироцита, односно лимфоцита и нивоа антипероксидазних антитела, процента апоптотских тироцита и процента Bcl 2 позитивних тироцита, процента апоптотских тироцита и процента Вах позитивних тироцита, процента апоптотских лимфоцита и процента Bcl 2 позитивних лимфоцита, процента апоптотских лимфоцита и процента Вах позитивних лимфоцита. Имајући у виду вредност корелација као доказа наводимо да је статистички значајна негативна корелација у Хашимотовом тироидитису нађена између нивоа тиреоглобулина и нивоа антитиреоглобулинских антитела као и између нивоа тиреоглобулина и нивоа антипероксидазних антитела, док је статистички значајна позитивна корелација нађена између нивоа антитиреоглобулинских и антипероксидазних антитела. Статистички значајна позитивна корелација у лимфоцитном тироидитису је нађена између нивоа антитиреоглобулинских и антипероксидазних антитела. Статистички значајна негативна корелација је нађена између нивоа тиреоглобулина и антитиреоглобулинских антитела, док је статистички значајна позитивна корелација нађена између нивоа антитиреоглобулинских и антипероксидазних антитела у струми. Поглавље резултата је затворено микрофотографијама имунохистохемијских, ХЕ препарата обрађиваних у студији које документују претходно описане резултате.

В) Упоредна анализа резултата кандидаткиње са резултатима из литературе

У последњој деценији у великој мери су упознате основне особености и детаљни аспекти апоптозе као фундаменталног процеса у животињском али и биљном свету. Истовремено, последњих деценија је боље упознат патогенезни механизам развоја аутоимунских процеса. У том погледу је познавање развоја лимфоматозне струме значајно више одмакло од познавања других облика и варијетета запаљенских стања у штитастој жлезди. Упркос бољем познавању патогенезе, утврђивање базичних етиолошких чинилаца у настанку аутоимунске тироидне болести није значајно одмакло од тврдње да наследни фактори у заједници са чиниоцима средине учествују у појави аутоимунских процеса. У основи функционишу две хипотезе са различитим варијацијама, хипотеза о урођеном дефекту Т супресорских лимфоцита и хипотеза о аберантној експресији ХЛА друге класе главног система ткивног подношења на тироцитима. Са овако великим бројем непознаница неминовно је да у литератури налазимо значајан број радова који се баве овом темом али са резултатима, тумачењима и интерпретацијама које се често веома разликују.

У овој тези коришћен је методолошки приступ који је веома сличан поступцима који се описују у литератури. Демографско епидемиолошки подаци су уједначени са светским критеријумима, резултати оцено метаболског статуса су комплементарни са сличним студијама. Иако на малом броју испитаника за поуздани закључак, занимљив је налаз значајно вишег титра пероксидазних антитела у лимфоматозној струми него у групи са лимфоцитним тироидитисом. Слично занимање привлачи и налаз тироглобулинских антитела у испитиваним субпопулацијама. Концентрација тироглобулина у циркулацији је очекивано дистрибуирана и у функцији је масе и активности жлезде. Кандидаткиња је пажљиво проценила значај методологије у валидацији тироиглобулина због дијаметрално супротног утицаја тироглобулинских аутоантитела из циркулације на измерену вредност тироглобулина зависно од коришћене методе.

Анализом података из литературе кандидаткиња је конфронтирала своје налазе; у овом погледу се посебно издваја студија Елжбјете Качмарек (Elzbieta Kaczmarek) и групе из Познања У студији објављеној почетком ове године у којој је коришћен методолошки приступ сличан приступу у овој тези (Changes of B and T lymphocytes and selected apoptosis markers in Hashimoto's thyroiditis) аутори налазе пораст маркера Т, Б и цитотоксичних Т лимфоцита и сматрају да овај налаз испољава прогресију промена у фокусима инфламације (герминалним језгрима) лимфоматозне струме. Слабија експресија Бцл2 и каспазе 3 у лимфоматозној струми (Хашимото тироидитису) по тумачењу ових аутора указује да апоптоза има значајну улогу у патогенези аутоимунске тироидне болести и да је основни патогенезни догађај у лезији тироидне фоликулске ћелије у Хашимото тироидитису.

Пошто је у овој тези као контролна група коришћено ткиво оперисане (поли)нодозне струме, кандидаткиња је потражила изворе у литератури на основу којих би могла да провери да ли је овакав приступ оправдан и могућ. Због тога су компаративно нарочито значајни резултати Емезе Мезоси (Emese Mezosi) и сарадника из 2002. године. Аутори су имали приближно исту групу као и ова студија, користили су нормално тироидно ткиво контралатералне стране од патолошког процеса (нодозне струме) због чега је операција урађена као и ткиво из области али и ткиво из области захваћене струмозним променама. Аутори подвлаче да је струмогенеза, за разлику од малигнитета спор процес.

Претпостављају да одсуство односно мањи степен апоптозе може бити узрок акумулацији ћелија у нодозној струми. Нормалне тироидне ћелије су резистентне на све познате смртне лиганде упркос конститутивној експресији њима одговарајућих рецептора смрти.

Проинфламаторни цитокини могу да сензибилишу ове рецепторе за везивање са коресподентним лигандима. Налаз да је највећа заступљеност апоптотских лимфоцита у лимфоматозној струми и потом лимфоцитном тироидитису је у сагласности са напред цитираном и другим студијама. Обрнуто, највећа заступљеност апоптотских лимфоцита у

простој струми у већој мери испољава методолошку мањкавост пошто, због значајно мањег броја лимфоцита у простој струми у поређењу са тироидитисима и врло мали број апоптотских лимфоцита представља несразмерно велику пропорцију. У исцрпној дискусији добијених налаза после поређења података из литературе о испитиваним групама са групама испитиваним у овој студији, као посебно занимљиви издвајају се подаци о експресији структурних корелата апоптозе у хроничном тироидитису са покушајем да се објективно утврди разлика између две форме тироидитиса, лимфоцитног и Хашимото тироидитиса.

Сумирајући наведено кандидаткиња је извукла закључке како следи:

1. Апоптоза тироцита у Хашимотовом тироидитису и лимфоцитном тироидитису је била статистички значајно већа у односу на контролу (нодозна струма), али разлика у процентуалној заступљености ових ћелија између испитаника са тироидитисима није била статистички значајна.
2. У групи испитаника са Хашимотовим тироидитисом проценат апоптотских инфилтришућих лимфоцита је био мањи у односу на контролну групу, али се није битније разликовао у поређењу са лимфоцитним тироидитисом.
3. Степен експресије Bcl2 и Bax молекула у тироцитима се није битније разликовао између испитиваних група са тироидитисима.
4. Степен експресије Bcl2 молекула у инфилтришућим лимфоцитима код испитаника са тироидитисима се није битније разликовао. Међутим, степен експресије Bax молекула у овим ћелијама код Хашимотовог тироидитиса је био статистички значајно већи у односу на лимфоцитни тироидитис.
5. У групи испитаника са Хашимотовим тироидитисом нађена је негативна корелација између процента апоптотских лимфоцита и Bax- позитивних лимфоцита, док је у испитаника са лимфоцитним тироидитисом нађена негативна корелација између процента апоптотских тироцита и процента Bcl2- позитивних тироцита. Остале корелације између степена апоптозе и експресије про- и анти- апоптотских молекула нису биле статистички значајне.
6. На основу добијених резултата може се претпоставити да је апоптоза тироцита један од значајних механизма у патогенези како Хашимотовог тако и лимфоцитног тироидитиса. На основу разлика у присуству, односно нивоу аутоантитела према антигеским компонентама штитасте жлезде, у хистопатолошким карактеристикама као и експресији про- и анти- апоптотских молекула, лимфоцитни тироидитис се највероватније разликује од Хашимотовог тироидитиса.

Г) Објављени и саопштени резултати који чине део тезе

У току израде тезе објављен је рад који садржи податке обрађене за потребе тезе.

Marković L, Todorović J, Stanković G, Radojević S, Gvozdenović E, Artonović J, Stupar N, Maglić GV. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in thyroid glands of rats in experimental thyroiditis. Folia Biol (Krakow). 2010;58(3-4):163-9.

Д) Закључак (образложење научног доприноса дисертације)

Имајући у виду наведене податке у приложеној докторској дисертацији ауторке мр сци др Јасне Тодоровић сматрамо да теза има потребан научни значај, да је изведена уз потпуно поштовање методологије у приступу и изради студије оваквог карактера, да обрађује савремен, занимљив и, у великој мери непознат или недовољно упознат проблем. Посебна предност и квалитет тезе је употреба савремених поступака обраде узорака хуманог ткива добијеног уз поштовање свих етичких кодекса у циљу испитивања маркера апоптозе. Ови поступци тиме постају прихватљиви за много ширу употребу чиме ће се значајно оснажити сада оскудна збирка поступака у испитивању сложених процеса настанка и развика

аутоимунских процеса најмање у ендокриним органима али вероватно и знатно шире у клиничкој медицини.

Комисија сматра да докторска дисертација под насловом „ПРОТЕИНИ АПОПТОЗЕ У ШТИТАСТОЈ ЖЛЕЗДИ ОБОЛЕЛИХ ОД ХАШИМОТОВОГ И ЛИМФОЦИТНОГ ТИРОИДИТИСА“ ауторке мр сци др Јасне Тодоровић представља оригинални научни допринос и предлаже Научном већу да ову тезу прихвати и да одобри њену јавну одбрану.

У Београду
12.12.2011.

Проф. др Љиљана Марковић, в. професор
Медицинског факултета у Београду, ментор

Академик Миодраг Чолић, професор
на ВМА у Београду, коментор

Проф др Божо Трбојевић, редовни професор Медицинског
факултета у Београду, председник

Проф. др Снежана Жунџић Божиновски, ванредни професор
Медицинског факултета у Београду

Проф др Новица Милићевић, редовни професор
Медицинског факултета у Београду

Проф др Светислав Татић, ванредни професор Медицинског
факултета у Београду

Доц. др Небојша Митић, Медицински факултет Косовска
Митровица