

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 13.06.2016. godine, određena je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije „**Značaj polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti creva**“ kandidata **Dr Dragane Mijač**, magistra medicinskih nauka, u sastavu:

1. **Prof. dr Miodrag Krstić**, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Vera Pravica**, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Srđan Đuranović**, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. **Prof. dr Dragan Popović**, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
5. **Prof. dr Njegica Jojić**, redovni profesor u penziji, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Mentor ove doktorske disertacije je **Prof. dr Miloš Marković**, a komentor **Prof. dr Đorđe Ćulafić**.

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom, komentorom i kandidatom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, članovi Komisije podnose Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

I Z V E Š T A J

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija „**Značaj polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti creva**“ je napisana na 137 strana i podeljena je u sledećih

sedam poglavlja: Uvod, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Disertacija uključuje 4 ilustracije, 40 tabela i 321 bibliografsku jedinicu.

UVOD se sastoji od 6 celina i uključuje 4 ilustracije i jednu tabelu. U njima su date definicije inflamatorne bolesti creva (IBC) i njenih kliničkih formi Kronove bolesti (KB) i ulceroznog kolitisa (UK). Opisana je etiopatogeneza IBC sa detaljnom analizom uloge citokina i drugih imunskih mehanizama, kao i drugih faktora (mikroorganizama, crevnog epitela i vaskularizacije) u nastanku bolesti. Takođe su opisane i klinička slika i klasifikacija IBC, kao i aktuelna terapija ovog oboljenja sa osvrtom na nove modalitete lečenja. Posebno je razmatrana genetska osnova IBC i uloga polimorfizama koji nastaju usled izmene pojedinačnih nukleotidnih baza (*engl.* Single nucleotide polymorphism, SNP) u genima koji kodiraju molekule od značaja za patogenezu IBC. Naročita pažnja je posvećena polimorfizmima u genima za citokine (*TNFA*, *IL10* i *IL12B*), njihove receptore (*IL23R*), odnosno molekule koji učestvuju u transportu lekova i drugih ksenobiotika (*MDR1*) koji su ispitivani u ovom istraživanju.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA su jasno definisani i iskazani kroz sledeća četiri cilja: 1. Ispitivanje učestalosti alela gena za molekule *IL10*, *IL12B* i *IL23R* u populaciji zdravih osoba na teritoriji Republike Srbije, odnosno kod dobrovoljnih davaoca krvi; 2. Određivanje distribucije alela gena za molekule *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* u grupi pacijenata sa KB ili UK, odnosno kod svih pacijenata sa IBC; 3. Utvrđivanje da li je neki od polimorfizama navedenih gena faktor rizika za nastanak KB i UK, odnosno da li koreliše sa nekom od kliničkih manifestacija bolesti i 4. Utvrđivanje da li se distribucije ispitivanih polimorfizama kod pacijenata sa KB i UK i dobrovoljnih davaoca krvi (kontrola) u našoj sredini razlikuju u odnosu na studije u kojima su ovi polimorfizmi ispitivani u drugim populacijama (odnosno u različitim geografskim regionima i različitog etničkog porekla).

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** opisana je selekcija ispitanika. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze bili su: anamnestički podaci, laboratorijski parametri, klinička slika, endoskopski nalaz za patohistološkom verifikacijom i dopunske vizuelizacione metode kada je to bilo potrebno. Detaljno i jasno su opisane metode izolacije DNK i određivanja koncentracije i čistoće izolovane DNK iz uzoraka krvi ispitanika i metode za određivanje polimorfizama gena za *TNFA* (rs1800629), *IL10* (rs1800896, rs1800871 i rs3024505), *IL12B* (rs6887695), *IL23R* (rs11209026) i *MDR1* (rs1128503, rs2032582 i rs1045642,). Takođe je opisana metodologija koja je korišćena u statističkoj analizi rezultata.

U poglavlju **REZULTATI** sistematično i detaljno, kroz 8 celina, opisani su rezultati ispitivanja polimorfizama gena za *TNFA* (rs1800629), *IL10* (rs1800896, rs1800871 i rs3024505), *IL12B* (rs6887695), *IL23R* (rs11209026) i *MDR1* (rs1045642, rs1128503 i rs2032582), kod kontrolnih, zdravih osoba, kao i pacijenata sa KB i UK. Određivana je učestalost alela i genotipova ovih polimorfizama gena, testirana je distribucija genotipova u odnosu na Hardy-Weinberg-ovu ravnotežu, poređena je raspodela alela između kontrola iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja kao i distribucija alela, genotipova i nosioca alela između pacijenata sa KB i UK i kontrolnih ispitanika. Takođe, ispitivana je povezanost pojedinih alela i genotipova ispitivanih polimorfizama u odnosu na kliničke karakteristike bolesti. Pošto je u slučaju gena *IL10* i *MDR1* ispitivan veći broj polimorfizama, za date gene su određivani i haplotipovi i diplotipovi (kombinacije haplotipova) i analizirana je njihova povezanost za sklonošću da se razvije bolest (KB ili UK), odnosno korelacija sa pojedinim kliničkim manifestacijama obe kliničke forme IBC. Svi dobijeni rezultati u ovoj disertaciji su prikazani u okviru 40 tabela.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan način analizirao rezultate ovog istraživanja i povezo ih sa rezultatima sličnih istraživanja koja su obavljena u drugim populacijama, kako u Evropi tako i širom sveta. Na osnovu toga, kandidat je izneo svoje zaključke i hipoteze koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u kontekstu rezultata drugih autora koji imaju isti naučni interes. I oni rezultati istraživanja koji su dobijeni po prvi put i o kojima ne postoje dostupni podaci u naučnoj literaturi, objašnjeni su na odgovarajući način.

U poglavlju **ZAKLJUČCI** su na jasan i koncizan način izneti najznačajniji zaključci koji se mogu izvesti iz rezultata prikazanih u ovoj disertaciji, pri čemu se navedeni zaključci u potpunom skladu sa postavljenim ciljevima ovog istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 321 bibliografska jedinica koje su korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji. Bibliografske jedinice su citirane vankuverskim stilom.

B. Kratak opis najvažnijih rezultata

U ovom istraživanju, ispitana je učestalost polimorfizama pojedinačnih nukleotida u *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* genima u populaciji zdravih osoba i u grupi pacijenata sa IBC u Srbiji. Analizirano je postojanje povezanosti KB, UK, i svih pacijenata sa IBC, sa nekim od 9 polimorfizama, i to rs1800629 (G-308A) u promotoru *TNFA* gena, rs1800896 (G-

1082A) i rs1800871 (C-819T) u promotorskom regionu i rs3024505 (C/T) na 3' kraju *IL10* gena, rs6887695 (G/C) u blizini *IL12B* gena, rs11209026 (G1142A) u genu za receptor za IL-23 (*IL23R*) i tri polimorfizma u *MDR1* genu koji kodira transporter P-glikoprotein (P-gp rs1128503 (C1236T), rs1045642 (C3435T) i trialelskim rs2032582 (G2677T/A). Genotipovi svih ispitanih polimorfizama su bili u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži kako kod zdravih ispitanika, tako i u grupi pacijenata sa UK, KB i IBC. Alel G i genotip GG polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena bili su značajno češće prisutni kod svih ispitivanih grupa pacijenata (sa KB, UK i IBC u celini) u odnosu na kontrolnu grupu, sugerišući moguću ulogu G alela i GG genotipa rs11209026 u nastanku obe forme IBC. Polimorfizam rs3024505 *IL10* gena (alel T i genotip CT) i polimorfizam rs6887695 *IL12B* gena (genotip CC) su bili značajno povezani sa nastankom KB sugerišući moguću ulogu tih alela/genotipova u nastanku KB, dok su neke varijante ovih polimorfizama bile povezane sa određenim fenotipskim karakteristikama bolesti (anemijom, prisustvom stenoza, fistula i/ili ekstrakrevnih manifestacija). Polimorfizmi rs1128503, rs2032582 i rs1045642 u *MDR1* genu su bili statistički značajno povezani sa nastankom UK (T alel sva tri SNP, kao i TT genotip rs1128503 i rs2032582) identifikujući T alele sva tri ispitivana polimorfizma kao potencijalne faktore rizika za razvoj UK. Genotipsko-fenotipska analiza je utvrdila povezanost nekih od *MDR1* polimorfizama sa pušenjem i rizikom od hirurškog lečenja. Takođe su i haplotipovi polimorfizama u *IL10* i *MDR1* genu povezani sa nastankom KB (haplotip GCCT *IL10* gena) i UK (haplotip TTT *MDR1* gena), što je potvrdilo važnu ulogu ispitivanih polimorfizama u nastanku IBC. U ovoj studiji nije uočena povezanost polimorfizma rs1800629 *TNFA* gena sa razvojem KB i UK. Ovakvi rezultati ovog istraživanja ukazuju na značaj polimorfizama *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kao potencijalnih biomarkera IBC u srpskoj populaciji. Takođe, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su distribucije ispitivanih polimorfizama *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kod zdravih ispitanika u Srbiji bile slične kao i kod većine drugih populacija u regionu i Evropi (sa izuzetkom rs1800896), dok su se značajno razlikovale u odnosu na populacije zdravih osoba na geografski udaljenim teritorijama i različitog etničkog porekla (Australija, Novi Zeland, Kina, Kanada itd.).

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Mnogobrojni podaci iz savremene literature ukazuju da su određeni polimorfizmi pojedinačnih nukleotida gena za citokine i druge molekule udruženi sa većom sklonošću za razvoj KB i/ili UK i da imaju važnu ulogu u nastanku i održavanju inflamatornog odgovora u

populacijama različitog etničkog porekla. Ova studija je prva studija iz Srbije koja se bavila ispitivanjem distribucije alela i genotipova polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kod pacijenata sa IBC, takođe prva u istočnoj Evropi koja je analizirala polimorfizme *IL12B* i *IL10* (rs3024505), dok je samo nekoliko studija u istočnom delu Evrope ispitivalo polimorfizme *MDR1* i *IL23R* gena u IBC. Polimorfizam rs11209026 *IL23R* gena je bio statistički značajno povezan sa nastankom KB i u manjem stepenu sa nastankom UK, dok nije uočena povezanost ispitivanog polimorfizma rs1800629 *TNFA* gena sa nastankom KB i UK. Dobijeni rezultati za rs11209026 u *IL23R* su u skladu sa rezultatima drugih studija koje su pokazale da taj polimorfizam, posle polimorfizama u genu za NOD2 (*NOD2*), ispoljava najjaču povezanost sa KB, i u nešto manjoj meri za UK. Podaci iz literature koji se odnose na rs1800629 su nekonzistentni, kako u regionu tako i u populacijama udaljenih geografskih područja tako da rezultati ove disertacije mogu da doprinesu razjašnjavanju uloge tog polimorfizma u patogenezi IBC. Polimorfizam rs3024505 *IL10* gena, kao i polimorfizam rs6887695 *IL12B* gena su bili značajno povezani sa nastankom KB kao i fenotipskim karakteristikama bolesti, što je u skladu sa istraživanjima brojnih autora iz zapadne Evrope. Polimorfizam rs3024505 *IL10* gena je takođe povezan i sa UK u nekim populacijama, ali to nije potvrđeno u ovoj disertaciji, moguće zbog ograničenog broja pacijenata. Ova doktorska disertacija je utvrdila i postojanje povezanosti sva tri ispitivana *MDR1* polimorfizma (C1236T, G2677T/A i C3435T) i njihovih haplotipova sa UK, što do sada u literaturi nije pokazano. Pojedinačno, sva tri *MDR1* polimorfizma su povezivani sa razvojem UK, ali ni u jednom istraživanju nije pronađena visoko statistički značajna udruženost sva tri *MDR1* polimorfizma istovremeno (i haplotipova izvedenih iz njih) sa UK.

D. Objavljeni i/ili saopšteni rezultati koji čine deo teze

Mijac D, Vukovic Petrovic I, Đuranovic S, Perovic V, Bojic D, Culafic Dj, Popovic D, Krstic M, Jankovic G, Djoric M, Pravica V, Markovic M. „The Polymorphism rs3024505 (C/T) Downstream of the *IL10* Gene Is Associated with Crohn's Disease in Serbian Patients with Inflammatory Bowel Disease” *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* (IF=1,287, M22). *U štampi* (Broj manuskripta: TJEM-20160409R1)

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Značaj polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti creva**“ Dr Dragane Mijač predstavlja originalan, aktuelan i značajan naučni doprinos u razumevanju povezanosti između pojedinih alelskih i genotipskih varijanti gena koji kodiraju molekule bitne za nastanak i održavanje hronične inflamacije i IBC, odnosno njenih glavnih kliničkih formi, KB i UK.

U ovoj doktorskoj disertaciji je u populaciji zdravih osoba u Srbiji i u grupi pacijenata sa IBC ispitana učestalost polimorfizama pojedinačnih nukleotida u genima koji kodiraju citokine TNF (*TNFA*), IL-10 (*IL10*) i IL-12B (*IL12B*) koji čini zajedničku komponentu IL-12 i IL-23, zatim genu koji kodira receptor za IL-23 (*IL23R*), kao i u *MDR1* genu koji kodira protein P-gp koji se nalazi eksprimiran na epitelnim ćelijama digestivnog trakta i učestvuje u transportu ksenobiotika i toksina, a dovodi se i u vezu sa nastankom IBC. Obzirom da u našoj zemlji do sada nije rađeno ovakvo istraživanje, rezultati ovog istraživanja o učestalosti alela gena koji kodiraju inflamatorne i druge molekule uključene u patogenezu IBC od velikog je značaja za populaciju pacijenata sa IBC iz Srbije. Ovo istraživanje predstavlja prvu genetsku studiju kojom se procenjivala udruženost alela i genotipova polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kod pacijenata sa IBC u Srbiji. Takođe su u ovom istraživanju po prvi put ispitani polimorfizmi rs3024505 *IL10* gena, rs6887695 *IL12B* gena i rs11209026 *IL23R* gena u zdravoj populaciji iz Srbije. U ovom istraživanju pokazana je značajna povezanost pojedinih polimorfizama svih ispitivanih gena (osim *TNFA*) sa UK i/ili KB. Takođe je utvrđena značajna povezanost pojedinih haplotipova u *IL10* genu sa KB, odnosno haplotipova i diplotipova u *MDR1* genu sa UK, što je do sada pokazano u malom broju studija u svetu. Poseban značaj ove studije je u rezultatima koji se odnose na utvrđivanje povezanosti između pojedinih polimorfizama i kliničkih manifestacija bolesti, kao što su povezanost sa težim formama bolesti, refraktarnošću na terapiju, povećanom riziku za operativnim lečenjem, kao i moguće postojanje udruženosti genetskih faktora sa faktorima sredine kao što je pušenje. U ovoj disertaciji utvrđene su razlike u distribuciji pojedinih alela i genotipova nekih od analiziranih polimorfizama između zdravih ispitanika iz Srbije i zdravih ispitanika iz drugih populacija, što ukazuje na postojanje određenih genskih specifičnosti naše populacije. U celini, rezultati prezentovani u ovoj disertaciji ukazuju na važnu ulogu polimorfizama *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u patogenezi IBC i potvrđuju njihov značaj kao potencijalnih biomarkera u IBC.

Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Na osnovu navedenog, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom „**Značaj polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti creva**“ kandidata Dr Dragane Mijač, magistra medicinskih nauka, i odobri javnu odbranu.

Beograd, 30. jun 2016. godine

Mentor

Prof. dr Miloš Marković

Komentor

Prof. dr Đorđe Ćulafić

Članovi komisije

Prof. dr Miodrag Krstić

Prof. dr Vera Pravica

Prof. dr Srđan Đuranović

Prof. dr Dragan Popović

Prof. dr Njegica Jojić