

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 13.06.2016. godine, broj 5940/05, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**“ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA eNOS GENA KAO FAKTORA RIZIKA ZA RAZVOJ
RETINOPATIJE
PREVREMENO ROĐENE DECE“**

kandidata mr.dr Jelice Pantelić, zaposlene u Kliničkom Centru Srbije na Klinici za očne bolesti. Mentor je Prof. dr Ivan Stefanović, a komentor Doc. dr Tatjana Damjanović.

Komisija za ocenu završne doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Nataša Cerovac, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Biljana Jekić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Ana Oros, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija mr sci Jelice Pantelić napisana je na ukupno 127 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, metodologija istraživanja, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 22 tabele, 16 slika i 14 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, spisak skraćenica korišćenih u tekstu, priloge i biografiju kandidata.

U **uvodu** je data definicija retinopatije prematuriteta (ROP), vreme javljanja oboljenja, način otkrivanja tj. oftalmološki skrining i terapija. Opisani su uzroci javljanja oboljenja. Prikazan je detaljan osvrt na dosadašnja saznanja o oboljenju, faktorima rizika kao i rasprostranjenosti bolesti. Date su osnove vaskulogeneze retine i patogeneze oboljenja. Navedena je precizna klasifikacija po anatomskim karakteristikama – Međunarodna klasifikacija premature retinopatije – International Classification for Retinopathy of Prematurity – (ICROP) čime je omogućeno da budu ujednačeni kriterijumi dijagnostike aktivne forme retinopatije, pravovremeno lečenje i praćenje rezultata lečenja. Ukazano je na najagresivniji oblik oboljenja – AP ROP koji se javlja vrlo rano kod najnezrelije dece. Na adekvatan način je opisan značaj oftalmološkog skrininga u otkrivanju oboljenja. Bez obzira na činjenicu da ROP predstavlja najčešći uzrok slepila danas, ovaj ishod može se pravovremenom prevencijom sprečiti. Detaljno je opisan značaj pojedinih faktora rizika. Dat je akcenat na genetičkim faktorima rizika sa pregledom literature i skrenuta pažnja na polimorfizme eNOS gena kao faktore rizika za retinopatiju prevremeno rođene dece.

Ciljevi rada su precizno definisani. Ispitivana je učestalost genotipova i alela polimorfizama T-786C i 4a/4b gena za endotelnu azot oksid sintetazu u populaciji prevremeno rođene dece kao i prisustvo povezanosti ispitivanih polimorfnih geneskih varijanti sa nastankom teškog stepena retinopatije. Takođe, studija je sprovedena sa ciljem da se ispituju klinički faktori rizika udruženi sa nastankom teškog stepena retinopatije prevremeno rođene dece.

U poglavlju **materijal i metode** ističe se da je ovo prospektivno klinička studija preseka koja uključuje 239-oro prevremeno rođene dece. Sprovedena je na Klinici za ginekologiju i akušerstvo KCS i Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Detaljno su opisani kriterijumi za uključanje u studiju. Na osnovu sprovedenog oftalmološkog skrininga prevremeno rođena deca podeljena su u dve grupe. ROP grupa je obuhvatila prevremeno rođenu decu kod kojih je stepen ROP-a zahtevao oftalmološku terapiju, a kontrolnu grupu su činila deca kod kojih terapija nije primenjena.

Prisustvo faktora rizika analizirano je korišćenjem medicinske dokumentacije. Za molekularno-genetičko ispitivanje izvršena je izolacija DNK iz bukalne sluznice prevremeno rođene dece. Detaljno je opisana metodologija izolacije DNK, kao i PCR metoda za detekciju ispitivanih polimorfizama. Etički komitet, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu je odobrio ovo istraživanje. Roditelji prevremeno rođene dece su obavešteni u pismenoj formi o oboljenju (ROP), načinu lečenja, mogućim posledicama, kao i ciljevima molekularno-genetičke studije u koju će njihova deca biti uključena. Roditelji su dali pismeni pristanak da se uzme bris bukalne sluznice njihovog deteta i da dete učestvuje u istraživanju.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani, tabelarno i grafički predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 166 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati ispitivanja polimorfizma T-786C pokazuju da je 39,1% dece homozigotno za češći alel T (genotip TT), 52,3% su heterozigoti i 8,6% homozigoti za ređi alel C (genotip CC). Učestalost alela C je 34,8%, a učestalost alela T 65,2%. Učestalost genotipova T-786C polimorfizma u grupi sa ROP-om je: 40,0% TT genotipa, 51,7% CT genotipa i CC genotipa 8,3%. U kontrolnoj grupi učestalost TT genotipa je 38,2%, CT genotipa 52,9% i CC genotipa 8,8%. Učestalost C alela u ROP grupi je 34,2% naspram C 35,3% u kontrolnoj grupi.

Ispitivanjem polimorfizma 4a/4b utvrđeno je da je 65,3% dece homozigotno za češći alel 4b (genotip bb), 31,2% su heterozigoti (genotip ab) i 3,5% homozigoti za ređi

alel 4a (genotip aa). Učestalost alela 4a je 19,1%, a učestalost alela 4b 80,9%. Učestalost 4a/4b polimorfizma u grupi sa ROP-om je: genotipa 4bb 60,2%, genotipa 4ba 34,9% i genotipa 4aa 4,9%. U kontrolnoj grupi učestalost genotipa 4bb je 70,1%, genotipa 4ba 27,6% i 4aa genotipa 2,3%. Učestalost 4a alela u ROP grupi je 22,3% naspram 4a 16,1% u kontrolnoj grupi. Nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela ispitivanih polimorfizama gena za endotelnu azot oksid sintetazu između ispitivanih grupa.

Statistički značajna razlika je uočena kod dece ženskog pola po dominantnom modelu (4bb/4ab+4aa). Deca ženskog pola sa ispoljenim ROP-om su češće nosioci 4ba i 4aa genotipova od dece ženskog pola u kontrolnoj grupi. Nosioци 4aa genotipa oba pola eNOS 4a/4b polimorfizma imali su nižu nedelju gestacije u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Ispitivana prevremeno rođena deca nosioci 4aa genotipa imaju nižu NG, TM i Apgar skor, a veći broj dana provedenih na terapiji kiseonikom u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Ispitivanjem srednje vrednosti NG statistički značajna razlika se uočava po recesivnom modelu tj., nosioci 4aa genotipa imaju značajno niže srednje vrednosti NG nego nosioci 4bb i 4ba genotipa. Multivarijantna linearna regresiona analiza sa polom, TM i Apgar skorom kao kovarijatama nije pokazala asocijaciju 4a/4b genotipa sa vrednostima NG kod ispitivane prevremeno rođene dece.

Rezultati univarijantne analize kliničkih faktora rizika između ROP i kontrolne grupe pokazuju da su: nedelja gestacije, telesna masa, Apgar skor, perinatalna asfiksija, broj dana na terapiji kiseonikom, mehanička ventilacija, respiratorni distres sindrom, bronhopulmonalna displazija, pneumonija, sepsa, anemija, intraventrikularna hemoragija i nekrotični enterokolitis statistički značajno češće ispoljeni u ROP grupi. Primenom multivarijantne regresione analize uočava se da su nezavisni faktori rizika za razvoj ROP-a: niska nedelja gestacije, niska telesna masa na rođenju, pneumonija, sepsa, intraventrikularna hemoragija i nekrotični enterokolitis.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Učestalost C alela u evropskim populacijama je od 29% do 49%. Najviša učestalost polimorfizma je uočena u Španiji. Najniže učestalosti su zabeležene u Skandinavskim zemljama. U australijskoj populaciji učestalost C alela je 37,8%. Učestalost alela u belackim van evropskim populacijama je vrlo slična učestalostima u Evropi. Najniža učestalost je u azijskoj populaciji gde je frekvencija alela C 21,2% (ALFRED database). Naše istraživanje je pokazalo učestalost C alela 34,8%, što je u skladu sa učestalostima u Evropi. Učestalost C alela u ROP grupi je 34,2% , a 35,3% u kontrolnoj grupi.

Učestalost CC genotipa u populaciji Kavkazoida (obuhvata sve etičke grupe) je 11%, a heterozigota 50%. U različitim etničkim evropskim grupama učestalost CC genotipa je 30%, a heterozigota 56%. U Italiji učestalost heterozigota je 49%. U populacijama Afrike i Azije predominantan je TT genotip (ALFRED database). U našem istraživanju učestalost CC homozigota je 8,6%, što je približno opisanoj učestalosti kod Kavkazoida.

Učestalost 4a alela 4a/4b polimorfizma u intronu 4 u evropskim populacijama je od 10% do 27%. Najniža učestalost polimorfnog alela je u Africi tj. u crnačkoj populaciji i iznosi 3,5% (ALFRED database). Naše ispitivanje je pokazalo učestalost 4a alela 19,1%. Učestalost redog 4a alela u ROP grupi je 22,3% prema 16,1% u kontrolnoj grupi. Frekvencija u našem istraživanju je u saglasnosti sa frekvencom dobijenom u Rusiji. Dakle, možemo reći da je učestalost 4a alela u našoj populaciji u skladu sa učestalostima opisanim u okruženju.

U našem ispitivanju učestalost heterozigota polimorfizma 4a/4b je 31% što je u saglasnosti sa opisanim rezultatima u evropskoj populaciji gde se učestalost 4a/4b genotipa kreće od 16% do 34%.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da ne postoje razlike u distribuciji genotipova i alela eNOS T-786C polimorfizma između ROP i kontrolne grupe. Ispitivanjem genotipova i alela eNOS 4a/4b polimorfizama uočena je razlika između ROP i kontrolne grupe prevremeno rođene dece, ali ova razlika nije statistički značajna.

Rusai i sar. na populaciji prevremeno rođene dece sa ROP-om ispitivali su polimorfizme eNOS gena (2008). Dobili su da je učestalost C alela 32% u grupi sa aktivnim oblikom ROP-a koji zahteva terapiju. Učestalost C alela u grupi dece koja nisu tretirana je 33%. Nije uočena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela T-786C. Učestalost ređeg 4a alela je 24% u ROP grupi, a učestalost u kontrolnoj grupi je 15%. U ovom radu istakli su da je eNOS 4aa genotip nezavisni faktor rizika za teži stepen ROP-a.

Pri ispitivanju prevremeno rođene dece ženskog pola primećen je razvoj ROP-a koji je zahtevao terapiju po dominantnom modelu (4bb/4ab+4aa). Devojčice u ROP grupi su češće nosioci 4ba i 4aa genotipova od devojčica u kontrolnoj grupi. Međutim, logistička regresiona analiza sa polom, nedeljom gestacije, telesnom masom, Apgar skorom i brojem dana na terapiji kiseonikom kao kovarijatama nije pokazala da je 4a alel faktor rizika za razvoj teških formi ROP-a kod devojčica.

U skladu sa literaturom u našem istraživanju genotip 4aa je deset puta češće ispoljen u grupi dece sa nedeljom gestacije manjom od 30 u poređenju sa grupom dece veće nedelje gestacije. Nosioci 4aa genotipa eNOS 4a/4b polimorfizma imali su nižu srednju vrednost nedelje gestacije u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Vrednosti nedelje gestacije analizirane po recesivnom modelu su bile značajno niže kod dece sa 4aa genotipom. Uočava se niža telesna masa i Apgar skor, kao i veći broj dana provedenih na terapiji kiseonikom kod dece sa 4aa genotipom u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Multivarijantna linearna regresiona analiza sa polom, telesnom masom i Apgar skorom kao kovarijatama nije pokazala asocijaciju 4a/4b genotipa sa vrednostima nedelje gestacije kod ispitivane prevremeno rođene dece.

U literaturi su navedeni brojni klinički faktori rizika: niska nedelja gestacije, niska telesna masa, perinatalna asfiksija, mehanička ventilacija, broj dana provedenih na terapiji kiseonikom, plućna oboljenja, sepsa, anemija, broj transfuzija, intraventrikularna hemoragija, nekrotični enterokolitis i drugi (Oros A., 2003, Kim T i sar., 2004, Gilbert C i sar., 2005, Darlow B. i sar., 2005, Brown MS i sar., 2006, Pinheiro AM I sar., 2009, Chen

M. I sar., 2011, Enomoto H i sar., 2015). U skladu sa literaturom, a na osnovu multivarijantne analize zaključeno je da su nezavisni faktori rizika za razvoj ROP-a kod prevremeno rođene dece obuhvaćene ovim ispitivanjem niska nedelja gestacije, niska telesna masa, sepsa, pneumonija, intraventrikularna hemoragija i nekrotični enterokolitis.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Pantelic J, Varljen T, Maksimovic N, Jekic B, Oros A, Nikolic T, Stefanovic I, Novakovic I and Damnjanovic T. **Analysis of T-786C and 4a/b endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in retinopathy of prematurity.** GENETIKA 2016; 48(3): u štampi.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija *“Ispitivanje polimorfizama eNOS gena kao faktora rizika za razvoj retinopatije prevremeno rođene dece”* dr Jelice Pantelić, je prvi rad sproveden na populaciji prevremeno rođene dece u našoj sredini. U cilju otkrivanja nasledne predispozicije za teže stadijume retinopatije prematuriteta poseban značaj imaju genetička ispitivanja koja omogućavaju otkrivanje gena odgovornih za razvoj ROP-a. Rano otkrivanje mogućeg genotipa sa predispozicijom za ROP omogućilo bi blagovremenu primenu odgovarajuće terapije. U svetu su genetička istraživanja na polju retinopatije prematuriteta veoma aktuelna. Ovakav pristup je od velikog značaja jer je ROP vodeći uzrok slepila dečije dobi.

Najveći uspeh Nacionalnih instituta u razvijenim zemljama sveta je formiranje baza evidencije premature retinopatije i njenog tretmana. Odnos prema rešavanju premature retinopatije merilo je zdravstvene kulture jedne zemlje i korespondira sa naporima koje ulažemo ka pridruživanju svetskim standardima. Sve do sada navedeno ukazuje da prematura retinopatija nije samo obaveza oftalmologa i porodice već predstavlja obavezu društva u celini.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je 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 klinički i naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Jelice Pantelić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 01.07.2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Nataša Cerovac

Doc. dr Biljana Jekić

Prof. dr Ana Oros

Mentor:

Prof. dr Ivan Stefanović

Komentor:

Doc. dr Tatjana Damnjanović
