

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 28.04.2016. godine, određena je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije „**ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA ZA CD86, CTLA-4, TNF I IL-10 KOD BOLESNIKA SA PEMFIGUSOM U SRBIJI**“ kandidata **dr Srđana Tanasilovića, magistra medicinskih nauka**, u sastavu:

1. **Doc.dr Snežana Minić**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Miloš Marković**, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Ivana Binić**, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Mentor ove doktorske disertacije je **prof. dr Ljiljana Medenica**, a komentor **prof. Dr Dušan Popadić**.

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 „**Analiza polimorfizama gena za CD86, CTLA-4, TNF i IL-10 kod bolesnika sa pemfigusom u Srbiji**“ je napisana na 83 strane i podeljena je u sedam poglavlja: Uvod (14 strana), Ciljevi (1 strana), Materijal i metode (5 strana), Rezultati (24 strane), Diskusija (14 strana), Zaključci (1 strana) i Literatura (12 strana). Disertacija uključuje 1 ilustraciju, 35 tabela, 3 priloga, kao i 171 bibliografskih jedinica.

UVOD se sastoji od 8 celina i uključuje jednu ilustraciju. Uvod obuhvata definiciju pemphigusa i epidemiološke odlike, patogenezu, kliničku sliku i klasifikaciju ovog oboljenja, histopatološki nalaz kod pemphigusa, imunopatološki nalaz, ukratko terapiju, lokalnu i sistemsku i. Posebno je razmatrana genetska osnova pemfigusa sa posebnim osvrtom na polimorfizme pojedinačnih nukleotida (SNP) gena za molekule od značaja za patogenezu pemfigusa: CD86, CTLA-4, TNF, i IL-10.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA su jasno definisani i obuhvataju: 1. Ispitivanje učestalosti alela gena za molekule (CD86, CTLA-4, TNF, i IL-10) u populaciji zdravih osoba na teritoriji Republike Srbije (dobrovoljni davaoci krvi); 2. Određivanje distribucije alela gena za molekule (CD86, CTLA-4, TNF, i IL-10) u grupi pacijenata sa *Pemphigus vulgaris*om i *Pemphigus foliaceus*om; 3. Utvrđivanje da li je neki od polimorfizama gena za važne proinflamatorne molekule koji nastaju usled izmene pojedinačnih nukleotidnih baza faktor rizika za nastanak *Pemphigus vulgaris*/*Pemphigus foliaceus*; 4. Utvrđivanje da li se distribucije ispitivanih polimorfizama kod pacijenata sa *Pemphigus vulgaris*/*Pemphigus foliaceus*-om i dobrovoljnih davaoca krvi (kontrole) u našoj sredini razlikuju u odnosu na studije u kojima su ovi polimorfizmi ispitivani u drugim populacijama (različiti geografski regioni i etničko poreklo).

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** opisana je selekcija ispitanika, kriterijumi za postavljanje dijagnoze bili su klinička slika, pozitivan nalaz DIF testa kao i histopatološki nalaz koji potvrđuje postojanje intraepidermalnog rasepa. Takođe, detaljno i jasno su opisane metode izolacije DNK, određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK iz uzoraka krvi ispitanika i metode za određivanje polimorfizama gena za *CD86* (rs1129055), *CTLA4* (rs733618 i rs5742909), *TNF* (rs1800629 i rs361525), *IL-10* (rs1800896 i rs 18008), *TNF* (rs1800629).

U poglavlju **REZULTATI** sistematično i detaljno, kroz pet poglavlja, opisani su rezultati ispitivanja polimorfizama gena za *CD86* (rs1129055), *CTLA4* (rs733618 i rs5742909), *TNF* (rs1800629 i rs361525), *IL-10* (rs1800896 i rs 18008), *TNF* (rs1800629). kod kontrolnih, zdravih osoba i pacijenata sa *Pemphigus vulgaris*om i *Pemphigus foliaceus*om. Određivana je učestalost alela i genotipova ovih polimorfizama gena, testirana je distribucija genotipova u odnosu na Hardy-Weinberg 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 *Pemphigus vulgaris*om, *Pemphigus foliaceus*om i kontrola. Takođe, ispitivana je

povezanost pojedinih alela unutar različitih grupa oboljenja (*Pemphigus vulgaris*/*Pemphigus foliaceus*), kao i između određene forme pemfigusa i kontrola. Dobijeni rezultati su ilustrovani sa 35 tabela. Detaljan opis dobijenih rezultata dat je u odeljku B ovog izveštaja.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan način povezao rezultate ovog istraživanja sa rezultatima sličnih istraživanja objavljenih u međunarodnim naučnim časopisima. 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. 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** navedeni su najznačajniji zaključci koji su potpuno u skladu sa navedenim ciljevima istraživanja i dobijenim rezultatima.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 171 bibliografskih jedinica koje su navedene u doktorskoj disertaciji. Bibliografske jedinice su citirane vankuverskim stilom.

A. Kratak opis najvažnijih rezultata

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da se učestalost ispitivanih polimorfizama pojedinačnih nukleotida u genima za sledeće molekule: (CD86, CTLA-4, TNF, i IL-10) kod zdravih osoba u Srbiji visoko statistički značajno razlikuju u odnosu na populacije zdravih osoba na geografski udaljenim teritorijama i različitog etničkog porekla (Kina, Iran, Indija, Japan, Egipat, Meksiko, Tunis).

Frekvencija A alela u okviru rs1129055 polimorfizma gena za CD86 je značajno viša među obolelim od pemfigusa i to pemphigus vulgarisa nego među zdravim osobama. Saglasno tome, GG genotip je protektivan.

Nosioca T alela rs5742909 polimorfizma u genu za CTLA4 je značajno više u grupi pacijenata sa pemphigus foliaceusom u odnosu na grupu sa pemphigus vulgarisom.

Učestalosti alela i genotipova rs733618 u genu za CTLA4, rs1800629 i rs361525 u genu za TNF, i rs1800896 i rs 1800871 u genu za IL10 se ne razlikuju između pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih osoba, kao ni između pacijenata sa različitim formama pemfigusa.

B. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Mnogobrojni podaci iz savremene literature ukazuju da su određeni polimorfizmi pojedinačnih nukleotida gena za inflamatorne molekule udruženi sa većom podložnošću za nastanak pemfigusa i da imaju važnu ulogu u nastanku i održavanju autoimunskog odgovora u populacijama različitog etničkog porekla.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da postoji visoko statistički značajna razlika u učestalosti ispitivanih polimorfizama pojedinačnih nukleotida u genima za molekule: CD86, CTLA-4, TNF, i IL-10 kod zdravih osoba u Srbiji, u odnosu na populacije zdravih na geografski udaljenim teritorijama i različitog etničkog porekla.

CD86 je važan u aktivaciji naivnih T ćelija, a poznato je i potencijalno značajno da ligacija ovog molekula, makar pomoću monoklonskih antitela, može da omogući signale za sintezu IgG4 od strane humanih B ćelija. Zanimljivo je IgG4 često prisutan u serumu pacijenata sa autoimunskim buloznim bolestima kao i da ima sposobnost da dovodi do nastanka intraepidermalnih bula nezavisno od aktivacije komplementa. Poređenjem naših rezultata sa rezultatima malobrojnih studija u svetu koje su određivale rs1129055 polimorfizam u zdravoj populaciji ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela između zdrave populacije Srbije i populacija Kine i Irana za koje postoje objavljeni podaci. Udruženost ovog polimorfizama sa sklonošću ka razvoju autoimunskih buloznih bolesti veoma malo je ispitivana do sada. Udruženost CD86 rs1129055 sa sklonošću ka razvoju pemphigus foliaceusa pokazana je u jednoj studiji u kojoj je ustanovljena značajno niža frekvenciju CD86 rs1129055 A alela među pacijentima sa endemskom formom *Pemphigus foliaceus* (fogo selvagem) u poređenju sa kontrolama. U našem istraživanju za ovu disertaciju unutar grupe pacijenata sa pemphigus foliaceusom takva razlika nije ustanovljena. Ovakvi rezultati nisu iznenađujući jer endemski PF ima određene specifičnosti u odnosu na *Pemphigus foliaceus* u Evropi. Ne postoje podaci u dostupnoj literaturi o uticaju rs1129055 polimorfizma gena za CD86 na nastanak pemphigus vulgarisa. Ova doktorska disertacija predstavlja prvo istraživanje kojim je određena

frekvencija alela u genu za CD86 molekul na poziciji +1057 kod pacijenata obolelih od pemphigus vulgarisa.

CTLA-4 molekul eksprimiran je na aktivisanim CD4+ i CD8+ T ćelijama, posreduje u kasnoj fazi aktivacije T ćelija i samim tim učestvuje u održavanju periferne T-ćelijske tolerancije.

Udruženost polimorfizma rs5742909, koji je ispitivan u ovoj disertaciji, sa skološću ka razvoju autoimunskih buloznih bolesti veoma malo je ispitivana do sada. U dve studije je ispitivana povezanost CTLA4 rs5742909 sa podložnošću endemskom pemphigus foliaceusom. U jednoj studiji na uzorku od 118 pacijenata nije ustanovljena udruženost alela ili genotipova ovog polimorfizma sa sklonošću ka endemskom *Pemphigus foliaceus* dok je u drugoj studiji pokazano da je T alel ovog polimorfizma udružen sa sklonošću ka endemskom pemfigusu na većoj grupi od 269 pacijenata. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da su nosioci rs5742909 T alela, koji omogućava veću ekspresiju CTLA-4, ređi, odnosno manje zastupljeni među pacijentima sa *Pemphigus vulgaris* u odnosu na zdravu, kontrolnu populaciju međutim ustanovljena razlika nije statistički značajna. Pored toga, među pacijentima sa *Pemphigus foliaceus* rs5742909 nosioci T alela su značajno češći nego kod pacijenata sa *Pemphigus vulgaris*.

Objavljeni i/ili saopšteni rezultati koji čine deo teze

S. Tanasilović, Popadić, S., Medenica, Lj., and Popadić, D. Pemphigus Vulgaris and Pemphigus Foliaceus Determined by CD86 and CTLA4 Polymorphisms, Clinics in dermatology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.05.021>

C. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalan, aktuelan i značajan naučni doprinos ispitivanju povezanosti između pojedinih alelskih varijanti gena koji kodiraju molekule bitne za nastanak i održavanje autoimunskog odgovora, inflamacije i sklonosti ka nastanku pemfigusa. Po prvi put u Srbiji utvrđena je frekvencija alela molekula: CD86, CTLA-4, TNF, i IL-10 kod pacijenata obolelih od *Pemphigus vulgaris* i *Pemphigus foliaceus* što predstavlja osnovu za dalja istraživanja značaja ovih markera i kod pacijenata obolelih od drugih autoimunskih oboljenja u našoj zemlji i u svetu.

Ova doktorska disertacija predstavlja prvo istraživanje kojim je određena frekvencija alela u genu za CD86 molekul na poziciji +1057 u zdravoj populaciji Srbije i kod pacijenata obolelih od pemphigus vulgaris i pemphigus foliaceus. Prvi put, u svetu, u okviru istraživanja rađenih za ovu doktorsku disertaciju ustanovljeno je da osobe koje su nosioci barem jednog A alela na poziciji +1057 u CD86 imaju veći rizik od oboljevanja od pemfigusa i *Pemphigus vulgaris*. Frekvencija A alela u okviru rs1129055 polimorfizma gena za CD86 je značajno viša među obolelim od pemfigusa i to *Pemphigus vulgaris* nego među zdravim osobama. Saglasno tome, GG genotip je protektivan. Ovi nalazi predstavljaju doprinos boljem razumevanju uticaja genetske osnove za sklonost ka nastanku autoimunskih pemfigusa.

Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Stoga, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom „**Analiza polimorfizama gena za CD86, CTLA-4, TNF i IL-10 kod bolesnika sa pemfigusom u Srbiji**“ kandidata dr Srđana Tanasilovića, magistra medicinskih nauka, i odobri javnu odbranu.

Beograd, 10. jun 2016. godine

Mentor :

Prof. dr Ljiljana Medenica

Članovi komisije

Doc. dr Snežana Minić

Komentor

Prof. dr Dušan Popadić

Prof. dr Miloš Marković

Prof. dr Ivana Binić

