

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.06.2020. godine, broj 9700/08-MC, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Značaj određivanja serumskog vitamina 25(OH)D i polimorfizmi gena *CYP2R1*, *CYP27B1*, *DBP* i *VDR* kod obolelih od sarkoidoze“

kandidata dr Mihaila Stjepanovića, zaposlenog u Klinici za pulmologiju, Klinički centar Srbije. Mentor je Prof. Dr Violeta Mihailović-Vučinić, komentor Dr Sonja Pavlović, Naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Branislava Milenković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. Dr Vesna Škodrić-Trifunović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. Dr Zorica Lazić, profesor Medicinskog fakulteta 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 doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Mihaila Stjepanovića napisana je na ukupno 46 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 22 tabele i 10 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, kao i podatke o komisiji.

U **uvodu** je definisano šta je to sarkoidoza, epidemiološki podaci za ovu bolest kao i etiologija i patogeneza sarkoidoze. Navedena je detaljna klasifikacija sarkoidoze, kao i kakve su sve njene kliničke manifestacije. Na adekvatan način je u potpunosti opisano kako se postavlja dijagnoza sarkoidoze i koji biomarkeri se koriste za ovu bolest. Posebno je istaknut značaj vitamina D. I na kraju ovog poglavlja data su preporuke kako se sarkoidoza leči.

Ciljevi rada su precizno definisani. Imajući u vidu značaj uloge vitamina D u sarkoidozi, ova studija je postavila nekoliko ciljeva. Uporediti nivoe serumskog vitamina 25(OH)D među pacijentima obolelim od sarkoidoze. Zatim, ispitati vezu nivoa vitamina D sa različitim kliničkim tokom bolesti. Potom, ispitati vezu između varijanti u genima DBP (rs7041; rs4588), CYP2R1 (rs10741657), CYP27B1 (rs10877012), i VDR (rs2228570) i sarkoidoze,. I na kraju ispitati veze između navedenih polimorfizama i serumskih nivoa 25(OH)D kod pacijenata sa sarkoidozom.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da je ovo istraživanje je odobrio Etički odbor Kliničkog centra Srbije i Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, a studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Svi učesnici su obavješteni o zahtevima i ciljevima studije i dali su informisani pristanak. Za pacijente sa sarkoidozom, uključujući kriterijumi su bili postavljena dijagnoza sarkoidoze, uzeta je detaljna anamneza o znacima i simptomima bolesti, rendgenografija grudnog koša, i kod svih pacijenata su učinjena funkcionalna ispitivanja pluća. Svi slučajevi su imali patohistološki verifikovanu sarkoidozu, definisana kao oblik koji ima simptome i znake bolesti, kao i parametre aktivnosti, prisutne bar dve godine. Kriterijumi za isključivanje iz studije su bili: dijabetes melitus, ishemijska bolest srca, hronična bubrežna slabost, žutica ili seropozitivnost na HBs antigen, HCV ili HIV. Kontrolu su činili zdravi pojedinci koji su pristali da učestvuju u studiji. U studiji je učestvovalo 86 pacijenata sa sarkoidozom (64 osobe ženskog i 22 osobe muškog pola). Svi ispitanici su regrutovani u periodu od januara 2015. do decembra 2016. godine, na Klinici za pulmologiju Kliničkog centra Srbije. Na dan kad je uzeta krv za genotipizaciju i određivanje 25(OH)D, uzeta je i detaljna anamneza o toku i trajanju bolesti

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.

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

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 116 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U studiju je bilo uključeno ukupno 86 pacijenata prosečne starosti 48.6 ± 10.2 godina, od kojih je najmlađi pacijent imao 27 godina, a najstariji pacijent je imao 66 godina. Srednja vrednost za godine kod kontrolne grupe bila je 39.2 ± 11.3 (15-83), i postojala je statistički značajna razlika u ovom parametru između grupa ($p < 0.001$). Stoga je u statističkoj obradi podataka korišćena korekcija za godine. Prosečno trajanje bolesti bilo je 5.9 ± 5.2 godina sa medijanom 4 (2-9). Akutni oblik bolesti imalo je 27 pacijenata (31.4%), dok je hronični oblik bio zabeležen kod 59 pacijenata (68.6%). Plućni oblik sarkoidoze najzastupljeniji, prisutan je kod 84 (97,7%), a vanplućni oblik kod 36 (41,9%) pacijenata. Najčešće zahvaćen organ kod vanplućnog oblika sarkoidoze je bio CNS, a najređe zahvaćeni organi su bili jetra, želudac, koštana srž i parotidna žlezda. U grupi pacijenata sa vanplućnim oblikom sarkoidoze nije bilo pacijenata manifestacijom bolesti na srcu, štitastoj žlezdi i nosu. Većina pacijenata je bila na terapiji pronizonom (66.3%), manji deo na terapiji metotreksatom, a petina pacijenata je bila bez terapije. Približno jednako su bili zastupljeni Ro-0, Ro-1 i Ro-2 stadijum bolesti, dok je najmanji broj pacijenata imao Ro-3 stadijum. Prosečne vrednosti parametara plućne funkcije su iznosili $6,91 \pm 2,18$ za difuzni kapacitet za ugljen monoksid je iznosila, $1,55 \pm 0,73$ za KCo i $90,76 \pm 15,15$ za KcoP. Najučestaliji simptom sarkoidoze je bio kašalj, a najređe su se javljale simptomi oštećenja kranijalnih nerava.

U daljim analizama ispitivana je povezanost vitamina D sa opštim karakteristikama pacijenata, simptomatologijom, stadijumom i trajanjem bolesti, lokalizacijom sakroidoze. Nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji vitamin D kod pacijenta koji su imali lokalizovanu bolest na plućima, CNS-u, koži, očima, sklezini i limfnim nodusima u poređenju sa pacijentima koji nisu imali lokalizovanu bolest na ovim organima.

Ispitivana je korelacija vitamina D sa parametrima plućne funkcije. Koncentracija vitamina D je značajno korelirala sa DcoP, i ta korelacije je slaba i pozitivnog smera.

Ispitivanje korelacije koncentracije vitamin D sa biohemijskim parametrima pokazalo je da postoji statistički značajna korelacija nivoa Ca ($p=0,018$) sa koncentracijom vitamin D.

Učinjena je korelacija koncentracije vitamin D sa skalom zamora i depresije. Pokazano je da postoji negativna statistički značajna korelacija FAS ($p=0.023$) i CESd skale ($p=0.033$) sa koncentracijom vitamin D.

U cilju utvrđivanja uticaja genotipa u genima metaboličkog puta vitamina D učinjeno je poređenje nivoa serumskog vitamina D i prisustva određenog genotipa. Medijana serumskog nivoa vitamina D u ispitivanoj kohorti pacijenata sa sarkoidozom je bila 10.8mg/l, a 44% pacijenata je imalo izrazitu deficijenciju (serumski nivo vitamina 25(OH)D < 10 mg/l). Šta više, nosioci genotipa AA *DBP* rs4588 imali su najniže vrednosti vitamina D od 5.7mg/l, ukazujući da alel A predisponira za nizak nivo vitamin D. Zatim je urađena analiza između određenih genotipova i serumskog nivoa vitamina D. Rezultati su pokazali da su nosioci genotipa CA+AA rs4588 *DBP* gena imali niži nivo serumskog 25(OH)D (9.8 mg/l) u poređenju sa nosiocima CC genotipa (12.3 mg/l) i da je ova razlika statistički značajna ($p=0.046$).

Ispitivan je uticaj genotipa na trajanje bolesti i ustanovljeno da genotip utiče na trajanje bolesti. Naime, trajanje bolesti je duže ukoliko je prisutan mutirani alel za gene *VDR* i *CYP2R1*, a kod gena *VDR* ukoliko su oba mutirana alela pristuna, trajanje bolesti je 2 puta duže.

Sa ciljem da se utvrdi predisponirajući uticaj genotipa na nastanak sarkoidoze, ispitivana je distribucija mutiranih alela u grupi obelilih od sarkoidoze i kontrolnoj grupi, i određivan je OR za mutirane gene. Rezultati su pokazali da su geni *CYP27B1* i *DBP* faktori koji imaju ulogu u nastanku sarkoidoze. Uočava se da je genotip CC *CYP27B1* gena statistički značajano učestaliji u kontrolnoj grupi u odnosu na grupu bolesnika, dakle CC genotip ima protektivno dejstvo u smislu oboljevanja od sarkoidoze i smanjuje rizik za oboljevanje deset puta.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Prema brojnim studijama, vitamin D i sarkoidoza su u bliskoj vezi. Sarkoidoza se najčešće javlja u zimskim mesecima kada je nivo vitamina D nizak (Sharma O., 2010). Većina pacijenata sa sarkoidozom ima simptome u vezi sa nedostatkom vitamina D kao što su: simptomatična osteomalacija sa bolom u kostima, osećaj zamora i iscrpljenosti. Studija Burka i sar., 2010 procenio je nivo vitamina D kod pacijenata sa sarkoidozom. Oni su otkrili da je 49% pacijenata imalo nivo vitamina 25(OH)D ispod 10mg/l. Rezultati ovog doktorata su pokazali da je 44% pacijenata imalo izrazitu deficijenciju, odnosno serumski nivo vitamina 25(OH)D manji od 10 mg/l.

U publikovanoj studiji (Mihailovic-Vucinic V. i sar., 2012) koja je obuhvatila 226 bolesnika sa patohistološki potvrđenom dijagnozom sarkoidoze, klinički oblik sarkoidoze bio je pretežno hronična forma bolest (63,7%) sa niskim nivoima vitamina 25(OH)D u serumu; kod

pacijenata sa serumom 25(OH)D ispod 10 mg/L (117 pacijenata) svi su imali hroničnu bolest. Većina pacijenata sa visokim nivoom kalcijuma u uzorku 24h urina bili su pacijenti sa teškim nedostatkom vitamina 25(OH)D. Korelacija je bila statistički značajna, pokazujući dve činjenice: a) bolesnici sa hiperkalciurijom imaju aktivnu sarkoidozu; tako da je aktivni oblik bolesti očigledno povezan sa niskim nivoom vitamina 25(OH)D; b) većina pacijenata sa hiperkalciurijom ima aktivni sarkoidozu i preporučuje se da se izbegne sunčeva svetlost, a suplementacija vitamina D ili dijetetskog unosa takođe nije predložena. Prethodne studije potvrdile su indeks telesne mase (BMI) > 25, koji je pronađen u ovoj grupi pacijenata sa sarkoidozom, kod više od 30% pacijenata. Gojaznost je povezana sa niskim serumskim nivoima vitamina D. Logično objašnjenje za takvo posmatranje je verovatno stil života osoba sa BMI > 25 (sedentarni, zatvoreni, ne izloženi sunčevoj svetlosti da bi sakrili prekomernu težinu). Osim toga, postoji činjenica da je vitamin D liposolubilna te da se unosi u masno tkivo. Utvrđeno je da nivo vitamina 25(OH)D u serumu ima statistički značajnu ulogu kao prediktor zamora i depresije kod obolelih od sarkoidoze. Insuficijencija 25(OH)D vitamina pokazala se kao važan faktor u predviđanju toka hronične bolesti, značajnih oštećenja plućne funkcije i kognitivnih poremećaja kao što su zamor i depresija. Činjenica da većina analiziranih bolesnika sa sarkoidozom ima potpuni nedostatak 25(OH)D u serumu upravo to i čini takav nalaz još značajnijim (Mihailovic-Vucinic V. i sar., 2012). U prikazanoj studiji ispitivanje korelacije koncentracije vitamin D sa biohemijskim parametrima pokazalo je da postoji statistički značajna korelacija nivoa kalcijuma sa koncentracijom vitamin D. Ispitivanje parametara plućne funkcije je pokazalo da koncentracija vitamina D značajno korelira sa DcoP. Dodatno, pokazano je da postoji negativna statistički značajna korelacija FAS i CESd skale sa koncentracijom vitamin D.

Sadejstvo ekspozicije faktorima rizika, deficita vitamina D i podložnosti pojedinca je pokazalo bitnu ulogu genetičkih faktora u patogenezi sarkoidoze (Iannuzzi M, isar., 2007) Smatra se da na sarkoidozu utiču brojni geni koji imaju ulogu u metabolizmu i signalnim putevima vitamina D. Proteini koje kodiraju CYP2R1, DBP, CYP27B1 i VDR geni igraju značajnu ulogu u metabolizmu vitamina D i u njegovoj konverziji u aktivan oblik.

CYP2R1 gen, sa genima CYP3A4 i CYP27A1, kodira 25-hidroksilazu koji pripada grupi citohorma P450. Varijanta rs10741657, analizirana u ovom radu, izučavana je u smislu uticaja na serumski nivo vitamina D, kao i u asocijativnim studijama kao faktor rizika za brojne bolesti. Pokazano je da alel G doprinosi nižem serumskom nivou vitamina D (Wang T i sar.,2010).

DBP (vitamin D-vezujuću protein) je odgovoran za sintezu glavnog nosača vitamina D. DBP je kodiran visoko polimorfnim DBP genom u kome je pronađeno preko 120 polimorfizama. Najbolje izučene su dve varijante u kodonima 416 (GAT>GAG, Asp>Glu) i 420 (ACG>AAG, Thr>Lis) u egzonu 11 DBP gena (definisane prisustvom restrikcionih mesta za endonukleazu HaeIII i StyI). Ove varijante daju tri glavne elektroforetske varijante DBP, nazvane group-specific component 1 fast (Gc1F), Gc1 slow (Gc1S) i Gc2. Ove varijante se razlikuju po svojim funkcionalnim karakteristikama: varijante Gc1F i Gc1S imaju veći afinitet za 25(OH)D u odnosu na Gc2 varijantu (Arnaud J i sar., 1993). To potencijalno dovodi do efikasnijeg transporta 25(OH)D do ciljnih tkiva, dok je Gc2 varijanta povezana sa smanjenom koncentracijom 25(OH)D, 1,25(OH)₂D i DBP u cirkulaciji (Abbas S i sar., 2008).

CYP27B1 kodira citohrom P450 koji 1 α -hidroksilizuje 25(OH)D u 1,25(OH)₂D oblik.

Genetičke varijante proučavane u ovoj studiji su ukazale na značajan uticaj koji one imaju kako na kliničku sliku pacijenata, tako i na predispoziciju za dobijanje sarkoidoze. Pokazano je da *DBP* gen utiče na nivo vitamina D u smislu da su nosioci genotipa CA+AA rs4588 *DBP* gena u našoj kohorti ispitanika imali statistički značajno niži nivo serumskog 25(OH)D u poređenju sa nosiocima CC genotipa. Šta više, nosioci genotipa AA *DBP* rs4588 imali su najniže vrednosti vitamina D od 5.7mg/l, ukazujući da alel A predisponira za nizak nivo vitamin D. Ovo je u skladu sa rezultatima koji su prisutni u literaturi (Jolliffe D i sar., 2015)

Kada se uporede grupe pacijenata i zdravih ispitanika uočava se da je genotip AA rs4588 *DBP* gena statistički značajno više prisutan kod obolelih i povećava 8 puta šansu od oboljevanja.

Kao još jedan značajan faktor koji igra ulogu protektnog faktora za sarkoidozu pokazao se u našoj kohorti ispitanika *CYP27B1* gen. Naime, genotip CC rs10877012 *CYP27B1* gena je bio statistički značajno učestaliji u kontrolnoj grupi, dakle CC genotip ima protektivno dejstvo u smislu oboljevanja od sarkoidoze.

Ispitivanje ostalih genetičkih varijanti ukazalo je na to da ovi polimorfizmi utiču na dužinu trajanja bolesti. Naime, trajanje bolesti duže ukoliko je prisutan mutirani alel za gene *VDR* i *CYP2R1*, a kod gena *VDR* ukoliko su oba mutirana alela pristuna, trajanje bolesti je 2 puta duže. Proučavanje međusobne povezanosti sarkoidoze, nivoa vitamina D u serumu i gena za put vitamina D može pružiti dragoceni doprinos razumevanju, kao i prevenciji i lečenju ove bolesti. Naši rezultati su istakli važne asocijacije između obolevanja od sarkoidoze i SNV-a u genima rs10877012*CYP27B1* i rs4588 *DBP*, kao i nivoa vitamina D u serumu i SNV-a rs4588 *DBP*, koji mogu predstavljati važne aspekte koji se trebaju uzeti u obzir u praćenju, merenju i supstituciji u lečenju pacijenata sa sarkoidozom u budućnosti. Kada se govori o efikasnosti

suplementacije vitamina D u opštoj populaciji, geni *DBP* i *CYP2R1*, koji su povezani sa bazalnim nivoima 25(OH)D, nisu modifikovali odgovor na suplementaciju (Fu L i sar., 2009).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Stjepanovic MI, Mihailovic-Vucinic V, Spasovski V, Milin-Lazovic J, Skodric-Trifunovic V, Stankovic S, Andjelkovic M, Komazec J, Momcilovic A, Santric-Milicevic M, Pavlovic S.

Genes and metabolic pathway of sarcoidosis: identification of key players and risk modifiers. Arch Med Sci. 2019 Sep;15(5):1138-1146. M21, IF 2.380

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Značaj određivanja serumskog vitamina 25(OH)D i polimorfizmi gena *CYP2R1*, *CYP27B1*, *DBP* i *VDR* kod obolelih od sarkoidoze“ dr Mihaila Stjepanovića, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja vitamina D njegovih genetskih polimorfizama kod obolelih od sarkoidoze. Rezultati su pokazali da je 44% naših pacijenata imalo izrazitu deficijenciju, odnosno serumski nivo vitamina 25(OH)D manji od 10 mg/l. Ispitivanje parametara plućne funkcije je pokazalo da koncentracija vitamina D značajno korelira sa difuzijskim kapacitetom (DcoP). *DBP* gen utiče na nivo vitamina D u smislu da su nosioci genotipa CA+AA rs4588 *DBP* gena u našoj kohorti ispitanika imali statistički značajno niži nivo serumskog 25(OH)D u poređenju sa nosiocima CC genotipa.

Nosioci genotipa AA *DBP* rs4588 imali su najniže vrednosti vitamina D od 5.7mg/l , ukazujući da alel A predisponira za nizak nivo vitamin D. Genotip AA rs4588 *DBP* gena statistički značajno više prisutan kod obolelih u odnosu n kontrolnu grupu i povećava 8 puta šansu od oboljevanja. Genotip CC rs10877012 *CYP27B1* gena je bio statistički značajano učestaliji u kontrolnoj grupi, dakle CC genotip ima protektivno dejstvo u smislu oboljevanja od sarkoidoze. OR je pokazao da individue koje nose CC genotip imaju 10 puta manju šansu za obolevanje od sarkoidoze. Trajanje bolesti duže ukoliko je prisutan mutirani alel za gene *VDR* i *CYP2R1*, a kod gena *VDR* ukoliko su oba mutirana alela pristuna, trajanje bolesti je 2 puta duže.

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 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 Mihaila Stjepanovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 06.07.2020.

Članovi Komisije:

Prof. Dr Branislava Milenković

Prof. Dr Vesna Škodrić-Trifunović

Prof. Dr Zorica Lazić

Mentor:

Prof. Dr Violeta Mihailović-Vučinić

Komentor:

Naučni savetnik Dr Sonja Pavlović
