

## NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu od 14.04.2013. godine za ocenu doktorske disertacije pod nazivom „Značaj ekspresije i polimorfizama receptora sličnih Toll-u 2 i 4 u zapaljenskim oboljenjima srednjeg uva i njihovim komplikacijama“, kandidata dr Ane Jotić, određena je komisija u sastavu:

1. Prof. Dr Vojko Đukić, Klinika za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju KCS, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. Dr Rade Kosanović, KBC Zvezdara, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. Dr Jovica Milovanović, Klinika za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu hirurgiju KCS, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. Prof. Dr Milan Jovanović, KBC Zemun, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
5. Doc. Dr Nada Tomanović, Institut za patologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Mentor doktorske disertacije je Prof. Dr Snežana Ješić, a komentor Aleksandra Stanković, naučni savetnik

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

### IZVEŠTAJ

#### A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom „Značaj ekspresije i polimorfizama receptora sličnih Toll-u 2 i 4 u zapaljenskim oboljenjima srednjeg uva i njihovim komplikacijama“ sadrži sedam poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Metode istraživanja, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Disertacija je napisana na 98 strana, na kojima je prikazano 28 tabela i 16 slika. U

poslednjem poglavlju je iznet pregled literature koja je citirana u doktorskoj disertaciji i sadrži 119 navoda.

**UVOD** se sastoji iz pet delova. U prvom delu uvoda kandidat pruža uvid u problem javljanja hroničnih otitisa i njegovih komplikacija, opisuje koncept početnog imuniteta, proces aktivacije Toll-u sličnih receptora (TLR) i pokretanja imunskog odgovora. U drugom delu daje se pregled koji ligandi dovode do aktivacije TLR receptora. U trećem delu pažnja se obraća na bakterijske agense koji aktiviraju ispitivane TLR 2 i 4 receptore, njihove U četvrtom delu opisuje se uloga TLR receptora u javljanju infekcija srednjeg uva prikazanih na animalnim modelima, opisuju reakcije eksperimentalnih životinja na dokazane najčešće uzročnike hroničnih otitisa i pretpostavlja mehanizam patogeneze otitisa kod eksperimentalno postavljenih modela bolesti. U petom delu navode se podaci koji istuču značajnost početnog imuniteta kod javljanja otitisa kod ljudi. Ovde se postavlja pretpostavka da deficijencije u početnom imunitetu izazvane polimorfizmom gena mogu izazvati izmenjenu ekspresiju TLR na sluznici srednjeg uva, čija posledica može biti povećana incidencija otitisa, teža klinička slika zapaljenja, njegovo povećano trajanje i javljanje otogenih komplikacija

**CILJEVI RADA** su jasno definisani i obuhvataju pre svega rasvetljavanje povezanosti javljanja hroničnih otitisa i otogenih komplikacija sa polimorfizmom u genima za TLR i njihove ekspresije na sluznici srednjeg uva. Ciljevi obuhvataju ispitivanje ekspresije TLR 2 i TLR 4 na sluznici srednjeg uva dece i odraslih sa hroničnim supurativnim otitisom sa i bez hlosteatoma i korelacija sa intenzitetom inflamatornih promena na sluznici i pojavom komplikacija, utvrđivanje zavisnosti ekspresije TLR 2 i 4 od prisustva infekcije bakterijskim uzročnicima i ispitivanje uticaja postojanja polimorfizma gena za TLR 2 i 4 na nastanak, progresiju i oštećenje tkiva tokom hronične inflamacije srednjeg uva.

**MATERIJAL I METODE** U ovom poglavlju detaljno su opisane sve metode koje su korišćene u eksperimentalnom radu i objašnjene su posebnim poglavljima: imunohistohemijska analiza tkivnih uzoraka na ekspresiju TLR 2 i 4 korišćenjem poliklonalnih antitela za TLR 2 i 4; detekcija i analiza polimorfizma DNK u genima za TLR 2 i 4 analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) i

mikrobiološka analiza uzimanjem briseva sekreta srednjeg uva i zasejavanjem na odgovarajuće podloge sa identifikacijom uzročnika.

Za statističku analizu bio je korišćen program SPSS v20. Podaci koji su imali kontinualnu vrednost bili su izraženi kao srednje vrednosti i standardne devijacije srednjih vrednosti, sa maksimalnim i minimalnim vrednostima u grupama. Za ispitivanje razlika između ispitivanih grupa korišćen je Pirsonov  $\chi^2$  test, Studentov t test, Man-Vitnijev (Mann-Whitney) test. Za određivanje prognostičkih vrednosti pojedinih analiziranih faktora korišćene su logistička regresija, jednosmerna analiza varijanse (ANOVA) i multivarijantna analiza varijanse (MANOVA). U svim testovima vrednosti verovatnoće, p vrednosti manje od 0,05 smatraće se značajnima, a manje od 0,01 visoko značajnim.

**REZULTATI** su prikazani u vidu 36 priloga tj. 16 slika i 28 tabela uz propratni tekst, čiji sadržaj u potpunosti odgovara sadržaju priloga.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan način povezao svoje rezultate sa rezultatima drugih autora. Na osnovu toga, kandidat je izneo svoje zaključke i hipoteze, koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u skladu sa rezultatima većine drugih autora koji imaju isti naučni interes. Značajan doprinos predstavlja definisanje veze frekvence polimorfizma u genima ispitivanih TLR i javljanja različitih formi hroničnog otitisa sa njihovim otogenih komplikacijama što do sada nije objavljivano u literaturi. Takođe utvrđivanje ekspresije TLR2 i 4 receptora na patološki izmenjenoj sluznici različitih nivoa zapaljenja važan je povezujući faktor koji nesumnjivo ukazuje na početni imunski odgovor kao bitan u patogenezi hroničnog otitisa.

U poglavlju **ZAKLJUČCI** navedeni su najznačajniji zaključci koji su potpuno u skladu sa dobijenim rezultatima i navedenim ciljevima istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 119 bibliografskih jedinica iz stranih i domaćih publikacija, koje su citirane vankuverskim stilom.

## B. Opis postignutih rezultata

Rezultati ove doktorske disertacije su podeljeni u četiri celine. U prvom delu se prikazuju osnovni demografski podaci o pacijentima uključenih u studiju, kao i vrsta patologije kod ispitanika. U drugom delu dati su rezultati mikrobioloških ispitivanja sekreta uzetog iz srednjeg uva, i raspodela bakterijskih agenasa nađenih kod različitih formi patloški izmenjene sluznice i otogenih komplikacija. Treća celina se odnosi na prikazivanje rezultata detekcije i analize polimorfizma u genima za TLR2 i TLR4. Četvrta celina se odnosi na imunohistohemijsku analizu tkivnih uzoraka pacijenata sa različitim formama hroničnog otitisa na ekspresiju TLR 2 i 4 antitela.

Svi naši pacijenti su bili bele rase. Što se tiče polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2, u eksperimentalnog grupi su preovlađivali G/G homozigoti, kao i u kontrolnoj grupi. Statistički značajna razlika između grupa je postojala. Frekvencija genotipova polimorfizma Arg753Gln u genu za TLR2 je bila značajno različita kod pacijenata sa granuliranom sluznicom u odnosu na polipoznu sluznicu i na perimatriks holesteatoma. Ispitivani polimorfizam Arg753Gln u genu za TLR 2 se nije pokazao kao statistički značajan faktor za javljanje bilo koje vrste patološkog procesa sluznice u pacijentima sa HOM. Takođe, nije bio statistički značajan prognostički faktor za javljanje komplikacija kod pacijenata sa HOM. Što se tiče polimorfizma Thr399Ile u genu za TLR 4, u eksperimentalnoj grupi je većina ispitanika su bili C/C homozigota, u odnosu na kontrolnu grupu gde su svi C/C homozigoti. Statistički značajna razlika između grupa je postojala. Razlika između pojedinih podgrupa pacijenata sa različitim patološkim promenama sluznice je postojala, ali samo između uzoraka sa perimatriksom i matriksom holesteatoma. Ispitivani polimorfizam Thr399Ile u genu za TLR 4 se nije pokazao kao statistički značajan faktor za javljanje bilo koje vrste patološkog procesa sluznice u pacijentima sa HOM. Takođe, nije bio statistički značajan prognostički faktor za javljanje komplikacija kod pacijenata sa HOM, niti za podložnost infekciji različitim bakterijskim agensima.

Imunohistohemijski dokazana ekspresija TLR2 na sluznici pacijenata eksperimentalne grupe je bila značajno različita u odnosu na kontrolnu grupu, gde ekspresije nije ni bilo. Što se tiče edematozne sluznice, pretežno je pokazala negativnu

ekspresiju i ekspresiju lakog stepena. Polipozna sluznica je pokazala u najvećem broju slučajeva ekspresiju lakog stepena, dok je granulirana sluznica pokazala isključivo ekspresiju umerenog i jakog stepena. Matriks holesteatoma je pokazao negativnu ekspresiju i ekspresiju lakog stepena, dok je perimatriks holesteatoma pokazao ekspresiju umerenog i jakog stepena. Poređenja među grupama su otkrila da postoji statistički značajna razlika između pojedinih ispitivanih grupa. Imunohistohemijski dokazana ekspresija TLR 4 na sluznici pacijenata eksperimentalne grupe je bila značajno različita u odnosu na kontrolnu grupu, gde ekspresije nije ni bilo. Što se tiče edematozne sluznice, pokazala je negativnu ekspresiju, ali i ekspresiju lakog i umerenog stepena. Polipozna sluznica je pokazala u najvećem broju slučajeva ekspresiju lakog stepena, dok je granulirana sluznica pokazala isključivo ekspresiju jakog stepena. Matriks holesteatoma je pokazao negativnu ekspresiju i ekspresiju lakog stepena, dok je perimatriks holesteatoma pokazao ekspresiju umerenog i jakog stepena. Poređenja među grupama su otkrila da postoji statistički značajna razlika. Pokazalo se da imunohistohemijska ekspresija TLR 2 i 4 na patološki izmenjenoj sluznici srednjeg uva nije statistički predviđajući faktor za javljanje komplikacija hroničnih otitisa.

### **C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima literature**

Polimorfizmi u genima za TLR mogu imati ulogu u podložnosti hroničnim inflamatornim bolestima. Procenat ovih polimorfizama može značajno varirati u različitim rasama. Dva pojedinačna nukleotidna polimorfizma (SNP) u genu za TLR 2, Arg 677Trp i Arg753Gln, i dva u genu za TLR 4, Asp299Gly i Thr399Ile su povezana sa podložnosti infekciji patogenim bakterijama, zbog njihove sposobnosti da slabije vezuju aktivirajuće ligande. Polimorfizam Asp299Glyu genu za TLR 2 i Thr399Ile u genu sa TLR4 su povezani sa smanjenim odgovorom na LPS i povećanim rizikom od gram-negativnih infekcija. nižom sposobnošću ćelija da prepoznaju komponente bakterijskog ćelijskog zida. U literaturi su nađeni navodi ispitivanja ovih polimorfizama kod pedijatrijskih pacijenata na formama akutnog otitisa ili sekretornog otitisa, ali ne i kod pacijenata sa različitim formama hroničnog otitisa. Neki autori smatraju da je različit

obrazac ekspresije TLR 2 i TLR 4 na raznim anatomskim lokalizacijama rezultat adaptacije početnog imunskog odgovora na bakterijsku floru (koja je specifična za datu anatomsku lokalizaciju). Izbor TLR-a u ovoj studiji je bio baziran na rezultatima i dokumentovanoj aktivnosti TLR 2 i 4 nakon izloženosti gram-negativnim bakterijama u literaturi. Povećana ekspresija TLR u srednjem uvu može igrati ulogu u obezbeđivanju sterilnih uslova, i istovremeno odbranu od bakterijske infekcije. Početni imunitet stvara visoko efektivnu barijeru protiv patogena i pomaže u održavanju sterilnosti srednjeg uva.

TLR 2 i 4 na sluznici i inflamatornim ćelijama u hroničnom otitisu sa i bez holesteatoma. Značajno veća ekspresija TLR2 i 4 je zapažena kod holesteatoma, nego kod kontrolnih uzoraka sluznice. Pozitivna ekspresija TLR4 je zapažena u ćelijama epitela, inflamatornim ćelijama i makrofagima, dok je ekspresija TLR2 zapažena u ćelijama epitela i inflamatornim ćelijama. Dokazano je da je srednje uvo imunološki dinamična lokalizacija, i da je početni imunitet ključan u zaštiti od bakterijske infekcije i održavanju funkcije srednjeg uva. Ove tvrdnje su delimično potvrđene i ovoj studiji. Početni imunski odgovor je zavisio od tipa i težine patoloških promena sluznice. Jaka reakcija sluznice sa visokom ekspresijom TLR 2 i 4 je zabeležena kod uzoraka perimatriksa holesteatoma i granulirane sluznice. Drugi autori su mišljenja da HOM ima infektivno poreklo, bez obzira na klinički izgled promena i individualnu genetičku nesposobnost ekspresije TLR, što rezultati ove studije podržavaju i govore u prilog tome da je HOM multifaktorijalna bolest o kojoj i dalje učimo.

Ovom studijom dat je doprinos teoriji postojanja genetske komponente početnog imunskog odgovora u patogenezi hroničnog otitisa, i dokazano da je stepen patohistološke izmenjenosti sluznice srednjeg uva inflamacijom u različitim formama hroničnog otitisa indikator aktivnosti TLR-a. Ova saznanja mogu pokrenuti druga istraživanja u oblasti početnog imuniteta, a u cilju bližeg objašnjavanja patogeneze hroničnog otitisa, kao kompleksne multifaktorijalne bolesti.

#### **D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo teze:**

##### Objavljeni rad:

1. Jesic S, **Jotic A**, Tomanovic N, Zivkovic M, Kolakovic A, Stankovic A. Expression of Toll-Like Receptors 2, 4 and Nuclear Factor Kappa B in Mucosal Lesions of Human Otitis: Pattern and Relationship in a Clinical Immunohistochemical Study. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2014; 123(6):434-41

##### Saopštenja:

1. Jesic S. Comparison of TLR2, 4 and nuclear factor kappa b expression between mucosal lesions of chronic otitis in children. 7th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media; 12 - 16 June, 2013, Stockholm, Sweden. Abstract book: P1-17

## **E. ZAKLJUČAK** (Obrazloženje naučnog doprinosa disertacije):

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos i pružaju nova saznanja o postojanju genetske komponente u patogenezi hroničnog otitisa, Dokazano je da je stepen promene sluznice srednjeg uva u različitim formama hroničnog otitisa indikator aktivnosti TLR-a. Ova saznanja mogu pokrenuti druga istraživanja u oblasti početnog imuniteta, a u cilju bližeg objašnjavanja patogeneze hroničnog otitisa, kao kompleksne multifaktorijalne bolesti



## F. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom „Značaj ekspresije i polimorfizama receptora sličnih Toll-u 2 i 4 u zapaljenskim oboljenjima srednjeg uva i njihovim komplikacijama“, kandidata dr Ane Jotić, po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, dobro osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima ispunjava sve kriterijume dobro napisanog naučnog rada pa Komisija sa zadovoljstvom predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom „Značaj ekspresije i polimorfizama receptora sličnih Toll-u 2 i 4 u zapaljenskim oboljenjima srednjeg uva i njihovim komplikacijama“, kandidata dr Ane Jotić i odobri javnu odbranu.

**Mentor:**

**Prof. Dr Snežana Ješić**

**Komentor:**

**Aleksandra Stanković, <sup>SAUJETNIK</sup> viši naučni saradnik**

**Članovi Komisije**

**Prof. Dr Vojko Đukić**

**Prof. Dr Rade Kosanović**

**Prof. Dr Jovica Milovanović**

**Prof. Dr Milan Jovanović**

**Doc. Dr Nada Tomanović**

Beograd, 29. maj 2014. godine