

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.09.2015. godine, broj 4600/16, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Zna aj genetskih i faktora sredine u nastanku idiopatskih bronhiektazija kod dece “

kandidata mr dr Katarine Miloševi , zaposlene na Univerzitetnoj de ijoj u Beogradu kao pedijatra – alergologa u Službi za pulmologiju i alergologiju. Mentor je Prof. dr Branimir Nestorovi , komentor je N. Saradnik Aleksandra Nikoli .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vesna Škodri -Trifunovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Ljudmila Nagorni- Obradovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. N. Savetnik Dragica Radojkovi , Institut za molekularnu genetiku i geneti ko inženjerstvo u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicnskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Katarine Miloševi napisana je na 96 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i

literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 15 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korištenih u tekstu.

U **uvodu** su definisana sva patološka stanja u kojima dolazi do dilatacije bronhijalnog stabla a obuhvaćena su pojmom bronhiektazija. Navedeni su patofiziološki procesi koji dovode do oštećenja disajnih puteva što je rezultat postojanja inflamacije kao centralnog procesa. Detaljno je opisana patogeneza bolesti gde je najšire prihvaćena hipoteza za krug: inicijalno oštećenje epitela praćeno infekcijom i nedovoljno regulisanom inflamatornim procesom koji omogućava nastanak novih infekcija.

Opisan je karakterističan neutrofilni inflamatorni odgovor sa povećanom koncentracijom neutrofilne elastaze i mijeloperoksidaze u bronhijalnom stablu. Dat je dosadašnji pregled literature u vezi proinflamatornih medijatora IL-8, interleukina 1 i TNF- α koji su najverovatnije uključeni u migraciju neutrofila kroz zid bronhija u lumen, na šta ukazuje jasna pozitivna korelacija između koncentracija ovih faktora i količine patogenih mikroorganizama koji se mogu izolovati iz pluća obolelih.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju prevalencije mutacija u CFTR i ELANE genu u populaciji dece sa idiopatskim bronhiektazijama i ispitivanju uticaja faktora sredine (sekundarno pušenje, uslovi stanovanja i socijeekonomski status) na razvoj dečijih idiopatskih bronhiektazija. Kao cilj rada navedeno je i ispitivanje uticaja ELANE genotipa na terapijski odgovor u dečijim idiopatskim bronhiektazijama.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da su pacijenti pregledani i dijagnosticirani na Univerzitetskoj dečijoj klinici u Beogradu i da je ispitivanje sprovedeno u in vivo u laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Opisane su smernice na osnovu kojih kliničkih kriterijuma je postavljena dijagnoza bronhiektazija i koji su bili kriterijumi za uključivanje pacijenata u istraživanje. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa etičkim principima i smernicama za brigu o deci odobrenim od etičkog komiteta Univerzitetske dečije klinike u Beogradu i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Detaljno je opisana metodologija ispitivanja

koja podrazumeva skener visoke rezolucije pluća, uzorkovanje indukovanog sputuma, merenje izdahnutog azot monoksida, merenje plućnih funkcija i određivanje krvne slike, CRP-a i na in izolacije DNK-a. Za analizu gena CFTR i ELANE korišćena je DNK izolovana iz uzorka venske krvi, a analiza je vršena metodologijom zasnovanom na PCR (polymerase chain reaction) tehnici. Prisustvo promena u odabranim segmentima gena CFTR i ELANE vršeno je direktnim sekvenciranjem DNK. Kod svih ispitanika je analizirano prisustvo mutacija u pet segmenata gena CFTR (egzoni 3,10, 11 i intron8) i regulatornom regionu gena ELANE.

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 323 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo je jedna od malobrojnih studija koja se bavi ulogom CFTR gena u dečijim idiopatskim bronhiektazijama. Prva studija u svetu uloge mutacija u genu ELANE u idiopatskim bronhiektazijama obuhvaćena je ovim istraživanjem. Ova studija je takođe razmatrala uticaj socioekonomskih faktora i sekundarnog pušenja na razvoj idiopatskih bronhiektazija. Ovo istraživanje je pokazalo da u pogledu terapijskog efekta merenog preko izdahnutog azot monoksida (NO) postoji visoko statistički značajna razlika sa smanjenjem vrednosti NO-a nakon terapije idiopatskih bronhiektazija što je pokazatelj da primenjena terapija ima značajan antiinflamatorni efekat. Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju na moguće uloge dve specifične varijante u CFTR genu, c.1210-12T(5) i c.1408A u idiopatskim bronhiektazijama kod dece. Ovo istraživanje je pokazalo da je najzastupljeniji genotip sa predviđenom visokom aktivnošću ELANE promotora u ispitivanoj populaciji dece sa idiopatskim bronhiektazijama. Ispitanici sa ELANE genotipovima sa predviđenom visokom

aktivnoš u imaju značajno bolji odgovor na terapiju od ispitanika sa ELANE genotipovima sa predviđenom niskom i srednjom aktivnoš u, što ukazuje na potencijalnu ulogu polimorfizama u genu ELANE u modulaciji odgovora na terapiju u bronhiektazijama.

Pošto je studija obuhvatila relativno mali broj uzoraka, uočenu korelaciju između određenih ELANE genotipova i odgovora na terapiju trebalo bi istražiti u većim studijama za analizu drugih genetičkih i negenetičkih faktora. Istraživanja koja bi obuhvatila druge plućne bolesti tako e bi doprinela razjašnjenju uloge neutrofilne elastaze u odgovoru na antimikrobijalnu terapiju.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Relativno mali broj radova je ispitivao ulogu CFTR gena u dečijim idiopatskim bronhiektazijama. Prva studija u svetu uloge mutacija u genu ELANE u idiopatskim bronhiektazijama obuhvaćena je ovim istraživanjem.

Postavljanje dijagnoze u navedenim studijama bilo je prvenstveno na osnovu skenera visoke rezolucije, jedino je u studiji Karakoc-a u dijagnostičkim metodama koje su sprovođene značajno mesto zauzimala i klinička slika ispitanika. Vodeći dijagnostički parametar za postavljanje dijagnoze idiopatskih bronhiektazija u našoj studiji bio je skener visoke rezolucije što ujedno i predstavlja zlatni standard u svim vodičima. Rezultati naše studije koji se odnose na forsirani vitalni kapacitet pluća bio je snižen, što je u skladu sa studijama Bahalija i Pifferija. U ovoj studiji sekundarno pušenje nije bilo povezano sa pojavom bronhiektazija što je u skladu sa studijom objavljenom 2014 godine. U ovoj disertaciji potvrđena je značajna dominacija neutrofila u odnosu na limfocite, monocite i eozinofile u bronhoalveolarnom lavatu što je u skladu sa studijom Kapura i saradnika iz 2012. godine. U studiji Chang-a iz 2013. godine vidi se da postoji statistički značajno povećanje IL-6, koji predstavlja neutrofilni marker inflamacije. Ustanovljeno je da pacijenti sa bronhiektazijama u stabilnoj fazi imaju povišen nivo sistemskih markera inflamacije u studiji Hsieh-a. U našem ispitivanju deca sa idiopatskim bronhiektazijama utvrđivali smo mikrobiološke karakteristike bronhoalveolarne lavaže. Najveći procenat zastupljenosti imali

su *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* i *H. influenzae*, što je u skladu sa studijom Bergena i Kapura i saradnika.

Veliki broj studija u toku predhodne decenije bio je posvećen istraživanju genetičke osnove idiopatskih bronhiektazija, ali njihovi rezultati nisu konzistentni i genetička osnova ove bolesti još uvek nije poznata. Rezultati ove studije su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima za adultne pacijente sa bronhiektazijama, koji ukazuju na relativno visoku učestalost CFTR varijanti c.1210-12T(5) i c.1408A u ovom oboljenju. S druge strane, podaci o mutacijama u genu CFTR u pedijatrijskoj populaciji sa idiopatskim bronhiektazijama praktično ne postoje i nije bilo drugih studija ovog tipa. Istraživanja rađena na adultnim pacijentima ukazuju da heterozigotnost za mutacije u CFTR genu najverovatnije ima patološke posledice i doprinosi razvoju bronhiektazija u kombinaciji sa drugim genetičkim i epigenetičkim faktorima.

Ovo je prva studija koja je obuhvatila analizu ELANE genotipova u bronhiektazijama. Distribucija ELANE genotipova u grupi ispitanika u ovoj studiji nije se značajno razlikovala u odnosu na druge studije. Nivo NO-a u izdahnutom vazduhu u pacijenata sa bronhiektazijama je bio povišen u odnosu na zdrave ispitanike, dok u drugim studijama nije nađena značajna razlika. Najverovatniji razlog za nekonzistentnost rezultata su razlike u metodološkim pristupima i kriterijumima za selekciju pacijenata, od kojih je najznačajnije prisustvo infekcije. U ovoj studiji ispitanici sa ELANE genotipovima sa predviđenom visokom aktivnošću imali su značajno viši nivo NO-a nego ispitanici sa srednjom i niskom aktivnošću. Neutrofilna elastaza može da naruši normalnu funkciju plućnog tkiva i izazove prekomerno oslobađanje proinflammatoryh medijatora. Nepoznato je šta dovodi do razlike nivoa NO između grupa sa različitim ELANE genotipovima. Pošto i na antibiotsku terapiju i aktivnost neutrofilne elastaze utiče veliki broj faktora, učen fenomen je najverovatnije posledica kompleksne interakcije genetičkih i negenetičkih faktora u plućima.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Milosevic K**, Nikolic A, Divac Rankov A, Ljujic M, Nestorovic B, Radojkovic D. Analysis of CFTR gene variants in idiopathic bronchiectasis in Serbian children. Pediatric Allergy, Immunology and Pulmonology 2013;26(2):93-98.
2. Nikolic A, **Milosevic K**, Boskovic S, Nestorovic B. Neutrophil Elastase Gene Polymorphisms: Modulators of Response to therapy in childhood Bronchiectasis? Lung. 2014 Aug;192(4):595-9.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Značaj genetskih i faktora sredine u nastanku idiopatskih bronhiektazija kod dece**“ dr Katarine Milošević predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uloge CFTR gena u dečjim idiopatskim bronhiektazijama. Ovo je prva studija u svetu uloge mutacija u genu ELANE u idiopatskim bronhiektazijama koja je obuhvaćena ovim istraživanjem. Rezultati ove doktorske disertacije bi mogli da pomognu razjašnjenju potencijalne uloge polimorfizama u genu ELANE u modulaciji odgovora na terapiju u bronhiektazijama.

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 i zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadadašnji nau ni rad kandidata,
komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati
doktorsku disertaciju dr Katarine Miloševi i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja
akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 08.10.2015.

lanovi Komisije:

Prof. Dr Vesna Škodri - Trifunovi

Prof. DrLjudmila Nagorni-Obradovi

N. Savetnik Dragica Radojkovi

Mentor:

Prof.dr Branimir Nestorovi

Komentor:

N. Saradnik Aleksandra Nikoli