

**NAUČNOM VEŠTAČENJE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Odlukom Naučnog veštača Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 13.06.2016. godine, određena je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije „**Značaj polimorfizama *TNFA, IL10, IL12B, IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti creva**“ kandidata **Dr Dragane Mija**, magistra medicinskih nauka, u sastavu:

1. **Prof. dr Miodrag Krsti**, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Vera Pravica**, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Srđan Čuranović**, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. **Prof. dr Dragan Popović**, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
5. **Prof. dr Njegica Jojić**, redovni profesor u penziji, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Mentor ove doktorske disertacije je **Prof. dr Miloš Marković**, a komentor **Prof. dr Goran Čulafić**.

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom, komentorom i kandidatom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, članovi Komisije podnose Naučnom veštaču u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeće:

**IZVEŠTAJ**

**A. Prikaz sadržaja disertacije**

Doktorska disertacija „**Značaj polimorfizama *TNFA, IL10, IL12B, IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti creva**“ je napisana na 137 strana i podeljena je u sledeće:

sedam poglavlja: Uvod, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Disertacija uključuje 4 ilustracije, 40 tabela i 321 bibliografsku jedinicu.

**UVOD** se sastoji od 6 celina i uključuje 4 ilustracije i jednu tabelu. U njima su date definicije inflamatorne bolesti creva (IBC) i njenih kliničkih formi Kronove bolesti (KB) i ulceroznog kolitisa (UK). Opisana je etiopatogeneza IBC sa detaljnom analizom uloge citokina i drugih imunskih mehanizama, kao i drugih faktora (mikroorganizama, crevnog epitela i vaskularizacije) u nastanku bolesti. Tako se su opisane i klinička slika i klasifikacija IBC, kao i aktuelna terapija ovog oboljenja sa osvrtom na nove modalitete lečenja. Posebno je razmatrana genetska osnova IBC i uloga polimorfizama koji nastaju usled izmene pojedinačnih nukleotidnih baza (*engl.* Single nucleotide polymorphism, SNP) u genima koji kodiraju molekule od značaja za patogenezu IBC. Naročita pažnja je posvećena polimorfizmima u genima za citokine (*TNFA*, *IL10* i *IL12B*), njihove receptore (*IL23R*), odnosno molekule koji učestvuju u transportu lekova i drugih ksenobiotika (*MDR1*) koji su ispitivani u ovom istraživanju.

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA** su jasno definisani i iskazani kroz sledeće četiri cilja: 1. Ispitivanje uestalosti alela gena za molekule *IL10*, *IL12B* i *IL23R* u populaciji zdravih osoba na teritoriji Republike Srbije, odnosno kod dobrovoljnih davaoca krvi; 2. Određivanje distribucije alela gena za molekule *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* u grupi pacijenata sa KB ili UK, odnosno kod svih pacijenata sa IBC; 3. Utvrđivanje da li je neki od polimorfizama navedenih gena faktor rizika za nastanak KB i UK, odnosno da li koreliše sa nekom od kliničkih manifestacija bolesti i 4. Utvrđivanje da li se distribucije ispitivanih polimorfizama kod pacijenata sa KB i UK i dobrovoljnih davaoca krvi (kontrola) u našoj sredini razlikuju u odnosu na studije u kojima su ovi polimorfizmi ispitivani u drugim populacijama (odnosno u različitim geografskim regionima i različitim etničkim poreklom).

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** opisana je selekcija ispitanika. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze bili su: anamnestički podaci, laboratorijski parametri, klinička slika, endoskopski nalaz za patohistološkom verifikacijom i dopunske vizuelizacione metode kada je to bilo potrebno. Detaljno i jasno su opisane metode izolacije DNK i određivanja koncentracije i isto se izolovane DNK iz uzoraka krvi ispitanika i metode za određivanje polimorfizama gena za *TNFA* (rs1800629), *IL10* (rs1800896, rs1800871 i rs3024505), *IL12B* (rs6887695), *IL23R* (rs11209026) i *MDR1* (rs1128503, rs2032582 i rs1045642.). Tako se je opisana metodologija koja je korišćena u statističkoj analizi rezultata.

U poglavlju **REZULTATI** sistematično i detaljno, kroz 8 celina, opisani su rezultati ispitivanja polimorfizama gena za *TNFA* (rs1800629), *IL10* (rs1800896, rs1800871 i rs3024505), *IL12B* (rs6887695), *IL23R* (rs11209026) i *MDR1* (rs1045642, rs1128503 i rs2032582), kod kontrolnih, zdravih osoba, kao i pacijenata sa KB i UK. Određivana je učestalost alela i genotipova ovih polimorfizama gena, testirana je distribucija genotipova u odnosu na Hardy-Weinberg-ovu 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 KB i UK i kontrolnih ispitanika. Takođe, ispitivana je povezanost pojedinih alela i genotipova ispitivanih polimorfizama u odnosu na kliničke karakteristike bolesti. Pošto je u slučaju gena *IL10* i *MDR1* ispitivan veći broj polimorfizama, za date gene su određivani i haplotipovi i diplotipovi (kombinacije haplotipova) i analizirana je njihova povezanost za sklonost da se razvije bolest (KB ili UK), odnosno korelacija sa pojedinim kliničkim manifestacijama obe kliničke forme IBC. Svi dobijeni rezultati u ovoj disertaciji su prikazani u okviru 40 tabela.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan način analizirao rezultate ovog istraživanja i povezo ih sa rezultatima sličnih istraživanja koja su obavljena u drugim populacijama, kako u Evropi tako i širom sveta. 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. I oni 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** su na jasan i koncizan način izneti najvažniji zaključci koji se mogu izvesti iz rezultata prikazanih u ovoj disertaciji, pri čemu se navedeni zaključci u potpunom skladu sa postavljenim ciljevima ovog istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 321 bibliografska jedinica koje su korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji. Bibliografske jedinice su citirane vankuverskim stilom.

## **B. Kratak opis najvažnijih rezultata**

U ovom istraživanju, ispitana je učestalost polimorfizama pojedinih nukleotida u *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* genima u populaciji zdravih osoba i u grupi pacijenata sa IBC u Srbiji. Analizirano je postojanje povezanosti KB, UK, i svih pacijenata sa IBC, sa nekim od 9 polimorfizama, i to rs1800629 (G-308A) u promotoru *TNFA* gena, rs1800896 (G-

1082A) i rs1800871 (C-819T) u promotorskom regionu i rs3024505 (C/T) na 3' kraju *IL10* gena, rs6887695 (G/C) u blizini *IL12B* gena, rs11209026 (G1142A) u genu za receptor za IL-23 (*IL23R*) i tri polimorfizma u *MDR1* genu koji kodira transporter P-glikoprotein (P-gp rs1128503 (C1236T), rs1045642 (C3435T) i trialelskim rs2032582 (G2677T/A)). Genotipovi svih ispitanih polimorfizama su bili u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži kako kod zdravih ispitanika, tako i u grupi pacijenata sa UK, KB i IBC. Alel G i genotip GG polimorfizma rs11209026 *IL23R* gena bili su značajno prisutni kod svih ispitivanih grupa pacijenata (sa KB, UK i IBC u celini) u odnosu na kontrolnu grupu, sugerišu i mogu u ulogu G alela i GG genotipa rs11209026 u nastanku obe forme IBC. Polimorfizam rs3024505 *IL10* gena (alel T i genotip CT) i polimorfizam rs6887695 *IL12B* gena (genotip CC) su bili značajno povezani sa nastankom KB sugerišu i mogu u ulogu tih alela/genotipova u nastanku KB, dok su neke varijante ovih polimorfizama bile povezane sa određenim fenotipskim karakteristikama bolesti (anemijom, prisustvom stenoza, fistula i/ili ekstrakrevnih manifestacija). Polimorfizmi rs1128503, rs2032582 i rs1045642 u *MDR1* genu su bili statistički značajno povezani sa nastankom UK (T alel sva tri SNP, kao i TT genotip rs1128503 i rs2032582) identifikuju i T alele sva tri ispitivana polimorfizma kao potencijalne faktore rizika za razvoj UK. Genotipsko-fenotipska analiza je utvrdila povezanost nekih od *MDR1* polimorfizama sa pušenjem i rizikom od hirurškog lečenja. Takođe su i haplotipovi polimorfizama u *IL10* i *MDR1* genu povezani sa nastankom KB (haplotip GCCT *IL10* gena) i UK (haplotip TTT *MDR1* gena), što je potvrdilo važnu ulogu ispitivanih polimorfizama u nastanku IBC. U ovoj studiji nije uočena povezanost polimorfizma rs1800629 *TNFA* gena sa razvojem KB i UK. Ovakvi rezultati ovog istraživanja ukazuju na značaj polimorfizama *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kao potencijalnih biomarkera IBC u srpskoj populaciji. Takođe, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su distribucije ispitivanih polimorfizama *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kod zdravih ispitanika u Srbiji bile slične kao i kod većine drugih populacija u regionu i Evropi (sa izuzetkom rs1800896), dok su se značajno razlikovale u odnosu na populacije zdravih osoba na geografski udaljenim teritorijama i različitog etničkog porekla (Australija, Novi Zeland, Kina, Kanada itd.).

### **C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature**

Mnogobrojni podaci iz savremene literature ukazuju da su određeni polimorfizmi pojedinačnih nukleotida gena za citokine i druge molekule udruženi sa većom sklonošću za razvoj KB i/ili UK i da imaju važnu ulogu u nastanku i održavanju inflamatornog odgovora u

populacijama različitog etničkog porekla. Ova studija je prva studija iz Srbije koja se bavila ispitivanjem distribucije alela i genotipova polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kod pacijenata sa IBC, takođe prva u istočnoj Evropi koja je analizirala polimorfizme *IL12B* i *IL10* (rs3024505), dok je samo nekoliko studija u istočnom delu Evrope ispitivalo polimorfizme *MDR1* i *IL23R* gena u IBC. Polimorfizam rs11209026 *IL23R* gena je bio statistički značajno povezan sa nastankom KB i u manjem stepenu sa nastankom UK, dok nije uopšte povezana povezanost ispitivanog polimorfizma rs1800629 *TNFA* gena sa nastankom KB i UK. Dobijeni rezultati za rs11209026 u *IL23R* su u skladu sa rezultatima drugih studija koje su pokazale da taj polimorfizam, posle polimorfizama u genu za NOD2 (*NOD2*), ispoljava najjaču povezanost sa KB, i u nešto manjoj meri za UK. Podaci iz literature koji se odnose na rs1800629 su nekonzistentni, kako u regionu tako i u populacijama udaljenih geografskih područja tako da rezultati ove disertacije mogu da doprinesu razjašnjenju uloge tog polimorfizma u patogenezi IBC. Polimorfizam rs3024505 *IL10* gena, kao i polimorfizam rs6887695 *IL12B* gena su bili značajno povezani sa nastankom KB kao i fenotipskim karakteristikama bolesti, što je u skladu sa istraživanjima brojnih autora iz zapadne Evrope. Polimorfizam rs3024505 *IL10* gena je takođe povezan i sa UK u nekim populacijama, ali to nije potvrđeno u ovoj disertaciji, moguće zbog ograničenog broja pacijenata. Ova doktorska disertacija je utvrdila i postojanje povezanosti sva tri ispitivana *MDR1* polimorfizma (C1236T, G2677T/A i C3435T) i njihovih haplotipova sa UK, što do sada u literaturi nije pokazano. Pojedinačno, sva tri *MDR1* polimorfizma su povezivani sa razvojem UK, ali ni u jednom istraživanju nije pronađena visoko statistički značajna udruženost sva tri *MDR1* polimorfizma istovremeno (i haplotipova izvedenih iz njih) sa UK.

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

**Mijac D**, Vukovic Petrovic I, Sturanovic S, Perovic V, Bojic D, Culafic Dj, Popovic D, Krstic M, Jankovic G, Djoric M, Pravica V, Markovic M. „The Polymorphism rs3024505 (C/T) Downstream of the *IL10* Gene Is Associated with Crohn's Disease in Serbian Patients with Inflammatory Bowel Disease” *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* (IF=1,287, M22). *U štampi* (Broj manuskripta: TJEM-20160409R1)

## E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Značaj polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti creva**“ Dr Dragane Mija predstavlja originalan, aktuelan i značajan naučni doprinos u razumevanju povezanosti između pojedinih alelskih i genotipskih varijanti gena koji kodiraju molekule bitne za nastanak i održavanje hronične inflamacije i IBC, odnosno njenih glavnih kliničkih formi, KB i UK.

U ovoj doktorskoj disertaciji je u populaciji zdravih osoba u Srbiji i u grupi pacijenata sa IBC ispitana uestalost polimorfizama pojedinih nukleotida u genima koji kodiraju citokine TNF (*TNFA*), IL-10 (*IL10*) i IL-12B (*IL12B*) koji čine zajedničku komponentu IL-12 i IL-23, zatim genu koji kodira receptor za IL-23 (*IL23R*), kao i u *MDR1* genu koji kodira protein P-gp koji se nalazi eksprimiran na epitelnim ćelijama digestivnog trakta i učestvuje u transportu ksenobiotika i toksina, a dovodi se i u vezu sa nastankom IBC. Obzirom da u našoj zemlji do sada nije rađeno ovakvo istraživanje, rezultati ovog istraživanja o uestalosti alela gena koji kodiraju inflamatorne i druge molekule uključene u patogenezu IBC od velikog je značaja za populaciju pacijenata sa IBC iz Srbije. Ovo istraživanje predstavlja prvu genetsku studiju kojom se procenjivala udruženost alela i genotipova polimorfizama *TNFA*, *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena kod pacijenata sa IBC u Srbiji. Takođe su u ovom istraživanju po prvi put ispitani polimorfizmi rs3024505 *IL10* gena, rs6887695 *IL12B* gena i rs11209026 *IL23R* gena u zdravoj populaciji iz Srbije. U ovom istraživanju pokazana je značajna povezanost pojedinih polimorfizama svih ispitivanih gena (osim *TNFA*) sa UK i/ili KB. Takođe je utvrđena značajna povezanost pojedinih haplotipova u *IL10* genu sa KB, odnosno haplotipova i diplotipova u *MDR1* genu sa UK, što je do sada pokazano u malom broju studija u svetu. Poseban značaj ove studije je u rezultatima koji se odnose na utvrđivanje povezanosti između pojedinih polimorfizama i kliničkih manifestacija bolesti, kao što su povezanost sa težim formama bolesti, refraktarnošću na terapiju, povećanom riziku za operativnim lečenjem, kao i moguće postojanje udruženosti genetskih faktora sa faktorima sredine kao što je pušenje. U ovoj disertaciji utvrđene su razlike u distribuciji pojedinih alela i genotipova nekih od analiziranih polimorfizama između zdravih ispitanika iz Srbije i zdravih ispitanika iz drugih populacija, što ukazuje na postojanje određenskih genskih specifičnosti naše populacije. U celini, rezultati prezentovani u ovoj disertaciji ukazuju na važnu ulogu polimorfizama *IL10*, *IL12B*, *IL23R* i *MDR1* gena u patogenezi IBC i potvrđuju njihov značaj kao potencijalnih biomarkera u IBC.

## **Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije**

Na osnovu navedenog, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Naukom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom „**Značaj polimorfizama *TNFA, IL10, IL12B, IL23R* i *MDR1* gena u inflamatornoj bolesti creva**“ kandidata Dr Dragane Mija, magistra medicinskih nauka, i odobri javnu odbranu.

Beograd, 30. jun 2016. godine

### **Mentor**

---

Prof. dr Miloš Markovi

### **Komentor**

---

Prof. dr Goran Čulafi

### **Članovi komisije**

---

Prof. dr Miodrag Krsti

---

Prof. dr Vera Pravica

---

Prof. dr Srđan Čuranovi

---

Prof. dr Dragan Popovi

---

Prof. dr Njegica Joji