

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Odlukom Nau nog ve a Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 28.04.2016. godine, odre ena 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 Sr ana Tanasilovi a**, **magistra medicinskih nauka**, u sastavu:

1. **Doc.dr Snežana Mini** , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Miloš Markovi** , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Ivana Bini** , Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

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

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom, komentorom i kandidatom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, lanovi Komisije podnose Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu slede i

**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), Zaklju ci (1 strana) i Literatura (12 strana). Disertacija uklju uje 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. Posebno je razmatrana genetska osnova pemphigusa sa posebnim osvrtom na polimorfizme pojedina njih nukleotida (SNP) gena za molekule od značaja za patogenezu pemphigusa: CD86, CTLA-4, TNF, i IL-10.

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA** su jasno definisani i obuhvataju: 1. Ispitivanje uestalosti 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 pojedina njih 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 istođe 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 rs18008), *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 rs18008), *TNF* (rs1800629). kod kontrolnih, zdravih osoba i pacijenata sa *Pemphigus vulgaris*om i *Pemphigus foliaceus*om. Određivana je uestalost 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 izmeđ u 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 povezo 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 najvažniji 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.

Uestalosti 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 izme u pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih osoba, kao ni izme u pacijenata sa razli itim formama pemfigusa.

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

Mnogobrojni podaci iz savremene literature ukazuju da su odre eni polimorfizmi pojedina nih nukleotida gena za inflamatorne molekule udruženi sa ve om podložnoš u za nastanak pemfigusa i da imaju važnu ulogu u nastanku i održavanju autoimunskog odgovora u populacijama razli itog etni kog porekla.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da postoji visoko statisti ki zna ajna razlika u ustalosti ispitivanih polimorfizama pojedina nih 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 razli itog etni kog porekla.

CD86 je važan u aktivaciji naivnih T elija, a poznato je i potencijalno zna ajno da ligacija ovog molekula, makar pomo u monoklonskih antitela, može da omogu i signale za sintezu IgG4 od strane humanih B elija. Zanimljivo je IgG4 esto prisutan u serumu pacijenata sa autoimunskim buloznim bolestima kao i da ima sposobnost da dovodi do nastanka intraepidermalnih bula nezavisno od aktivacije komplementa. Pore enjem naših rezultata sa rezultatima malobrojnih studija u svetu koje su odre ivale rs1129055 polimorfizam u zdravoj populaciji ustanovljena je visoko statisti ki zna ajna razlika u frekvenciji G i A alela izme u zdrave populacije Srbije i populacija Kine i Irana za koje postoje objavljeni podaci. Udruženost ovog polimorfizama sa sklonoš u ka razvoju autoimunskih buloznih bolesti veoma malo je ispitivana do sada. Udruženost CD86 rs1129055 sa sklonoš u ka razvoju pemphigus foliaceusa pokazana je u jednoj studiji u kojoj je ustanovljena zna ajno niža frekvenciju *CD86* rs1129055 A alela me u pacijentima sa endemskom formom *Pemphigus foliaceusa* (fogo selvagem) u pore enju sa kontrolama. U našem istraživanju za ovu disertaciju unutar grupe pacijenata sa pemphigus foliaceusom takva razlika nije ustanovljena. Ovakvi rezultati nisu iznena uju i jer endemski PF ima odre ene specifi nosti u odnosu na *Pemphigus foliaceusa* 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 odre ena

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 elijama, posreduje u kasnoj fazi aktivacije T elija i samim tim u estvuje u održavanju periferne T- elijske tolerancije.

Udruženost polimorfizma rs5742909, koji je ispitivan u ovoj disertaciji, sa skološ u ka razvoju autoimunskih bulozniih bolesti veoma malo je ispitivana do sada. U dve studije je ispitivana povezanost CTLA4 rs5742909 sa podložnoš u endemskom pemphigus foliaceusom U jednoj studiji na uzorku od 118 pacijenata nije ustanovljena udruženost alela ili genotipova ovog polimorfizma sa sklonoš u ka endemskom *Pemphigus foliaceusu* dok je u drugoj studiji pokazano da je T alel ovog polimorfizma udružen sa sklonoš u ka endemskom pemfigusu na ve o j grupi od 269 pacijenata. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da su nosioci rs5742909 T alela, koji omogu ava ve u ekspresiju CTLA-4, re i, odnosno manje zastupljani me u pacijentima sa *Pemphigus vulgarisom* u odnosu na zdravu, kontrolnu populaciju me utim ustanovljena razlika nije statisti ki zna ajna. Pored toga, me u pacijentima sa *Pemphigus foliaceusom* rs5742909 nosioci T alela su zna ajno eš i nego kod pacijenata sa *Pemphigus vulgarisom*.

### **Objavljeni i/ili saopšteni rezultati koji ine deo teze**

S. Tanasilovi , Popadi , S., Medenica, Lj., and Popadi , 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 u pojedinim alelskim 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 razlika između ovih grupa 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 autoimunskog pemfigusa.

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

Stoga, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Naukom ve u 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 Sr ana Tanasilovi a, magistra medicinskih nauka, i odobri javnu odbranu.

Beograd, 10. jun 2016. godine

**Mentor** :

lanovi komisije

---

Prof. dr Ljiljana Medenica

---

Doc. dr Snežana Mini

**Komentor**

---

Prof. dr Miloš Markovi

---

Prof. dr Dušan Popadi

---

Prof. dr Ivana Bini

