

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16-NJ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„POLIMORFIZMI U GENU ZA BETA-2 ADRENERGIČKI RECEPTOR KOD DECE  
SA ASTMOM U SRBIJI I NJIHOV KLINIČKI ZNAČAJ“**

kandidata dr Nevene Jovičić, zaposlene u Univerzitetnoj dečjoj klinici u Beogradu.

Mentor je Prof. dr Branimir Nestorović. Komentor je N. Sar. dr sc. Aleksandra Nikolić

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Branislava Milenković, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Dušica Simić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. N. Sav. dr Dragica Radojković, IMGGI

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija dr Nevene Jovičić napisana je na ukupno 81 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 18 tabela, 4 grafikona i pet slika.

Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **Uvodu** je definisano šta je astma, dat je detaljan pregled epidemioloških podataka, u potpunosti je opisan savremeni pristup u postavljanju dijagnoze astme kod dece i prikazana je precizna klasifikacija bazirana na stepenu težine bolesti kao i klasifikacija prema kontroli bolesti. Pregledno i detaljno su navedeni do sada poznati faktori rizika u nastanku astme kod dece, sa posebnim osvrtom na genetske faktore ali i perinatalne faktore i izloženost alergenima iz spoljašnje sredine. Na adekvatan način opisana je patofiziologija astme kod dece i uloga zapaljenja u etiopatogenezi i procesu remodelovanja bronha. Navedena su dosadašnja saznanja vezana za fenotipove i genotipove astme kod dece uz detaljno predstavljene postupke neophodne za postavljanje dijagnoze astme kod dece. U potpunosti su opisane indikacije i izbor terapijskog modaliteta kod dece prema težini i stepenu kontrole bolesti.

Farmakoterapija astme kod dece kao glavni vid lečenja detaljno je opisana, kao i mesto kratkodelujućih beta-2 agonista u terapijskom algoritmu. U uvodu je opisan beta-2 adrenergički receptor (ADRB2) i njegova normalna regulacija sa posebnim osvrtom na gen za beta-2 adrenergički receptor koji se nalazi na hromozomu 5q31-q32, u regionu koji je povezan sa astmom. U svetlu terapijskog značaja beta-2 agonista, opisana je njegova interakcija sa beta-2 adrenergičkim receptorom kao i način desinzibilizacije receptora.

U uvodu su predstavljani, do sada u literaturi opisani, polimorfizmi u genu za beta-2 adrenergički receptor koji menjaju ponašanje receptora posle ekspozicije agonistu. Do sada je identifikovano 9 polimorfizama a dva najčešća su + 46A> G (Arg16Gly, rs1042713) i + 79C> G (Gln27Glu; rs1042714). Za ove polimorfizme postoje dokazi da menjaju funkcionisanje receptora, što dovodi do poremećaja u regulaciji beta-2 adrenergičkog receptora i time indukuje otpornost na efekat beta-2 agonista i menja terapijski odgovor.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja učestalost polimorfizama +46A>C (Arg16Gly) i +79C>G (Gln27Glu) u genu za beta-2 adrenergički receptor kod dece sa astmom. Dobijeni rezultati su upoređeni sa objavljenim podacima za populaciju zdravih osoba mlađih od 50 godina u Srbiji. Dalje, ispitivan je uticaj ovih polimorfizama na težinu astme kod dece kao i uticaj polimorfizama na bronhodilatatorni odgovor na salbutamol. Pored toga, cilj istraživanja je bio da se kod dece sa astmom koja su bila predmet istraživanja ispita postojanje neke mutacije unutar analiziranog dela gena za beta-2 adrenergički receptor koje nisu prethodno opisane.

U poglavlju **Materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je sprovedena u Univerzitetnoj dečjoj klinici u Beogradu. Ispitivanu grupu činilo je ukupno 54 deteta uzrasta od 6 do 18 godina sa postavljenom dijagnozom astme unazad najmanje godinu dana u skladu sa GINA 2016 smernicama, koja su bolnički i ambulantno lečena u Službi za pulmologiju i alergologiju Univezitetne dečje klinike u Beogradu u periodu od oktobra 2016. do maja 2017. godine. Ispitanici su klasifikovani prema težini bolesti u skladu sa GINA 2016 smernicama u tri podgrupe: ispitanici sa blagom astmom, ispitanici sa umerenom astmom i ispitanici sa teškom astmom. Jasno su navedeni kriterijumi za uključenje u istraživanje kao i kriterijumi za isključenje iz istraživanja. Kontrolna grupa zdravih osoba sa kojom je učinjeno poređenje učestalosti polimorfizama kod dece sa astmom bila je grupa od 106 zdravih odraslih osoba oba pola, službenika na redovnom godišnjem sistematskom pregledu u Domu zdravlja „Stari grad“ u Beogradu, u periodu septembar–oktobar 2011. godine. Podaci o karakteristikama ispitanika kontrolne grupe preuzeti su iz istraživanja dr Nataše Petrović Stanojević i saradnika koje je objavljeno 2014. što je učinjeno u skladu sa potpisanom izjavom autora o korišćenju podataka prema odabranom tipu licence Kreativne zajednice u Beogradu 23.5.2016. godine. Detaljno je opisan način prikupljanja demografskih, kao i anamnestičkih podataka. Takođe je detaljno naveden način merenja izabranih laboratorijskih parametara. Precizno je naveden način izvođenja testova plućne funkcije kao i postupak merenja bronhodilatacijskog odgovora. Precizno je naveden postupak uzimanja i čuvanja uzoraka krvi, kao i način obrade primenjenim molekularno genetičkim testovima. Prisustvo +46A>G i +79C> G polimorfizama/varijanti određeno je direktnim sekvenciranjem DNK proizvoda PCR (engl. *Polymerase chain reaction*) reakcije dobijenih sledećim graničnicima: 5'- CTGAATGAGGCTTCCAGGCGT-3 'i 5'-ACAATCCACACCATCAGAAT-3'. Ovo istraživanje je sprovedeno u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji i odobreno je od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi roditelji ili zakonski staratelji dece od kojih je uziman biološki materijal koji je korišćen u studiji, kao i njihovi lični podaci, su dali pisani pristanak pre uključnja u studiju.

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. Svi rezultati su pažljivo interpretirani, uz prepoznavanje ograničenja studije.

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

Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 178 referenci.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Rezultati doktorske teze dr Nevene Jovičić su pokazali u ispitivanom uzorku dece sa astmom u Srbiji prisustvo polimorfizama +46A>G (Arg16Gly, rs1042713) i +79C>G (Gln27Glu, rs1042714) u genu za beta-2 adrenergički receptor. U analiziranom segmentu DNK nije otkriveno prisustvo drugih varijanti. Kod dece sa astmom najučestalija kombinacija alela za polimorfizam +46A>G (Arg16Gly) je bila GG (Gly16Gly) dok je najučestalija kombinacija alela za polimorfizam +79C>G (Gln27Glu) bila CC (Gln27Gln). Poređenjem razlike u učestalosti kombinacija alela za polimorfizam +46A>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom i kontrolne grupe zdravih osoba nije dobijena statistička značajnost. Statistički je značajna razlika u učestalosti genotipova za polimorfizam +79C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom i u kontrolnoj grupi zdravih osoba. Genotip +79GG (Glu27Glu) je češće pristan u kontrolnoj grupi zdravih osoba. Uočena je značajna razlika u učestalosti blage, umerene i teške astme između nosilaca različitih genotipova polimorfizma +46A>G u grupi dece sa astmom. Značajno češće se javlja umerena astma kod dece sa genotipom +46AA (Arg16Arg). Rezultati ispitivanja razlika učestalosti tipova astme prema težini između različitih genotipova polimorfizma +79C>G kod dece sa astmom nisu pokazali statističku značajnost. Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj tezi su pokazali da je statistički značajna razlika u bronhodilatatornom odgovoru kod dece sa astmom u odnosu na genotipske varijante +46A>G. Najbolji odgovor su imali nosioci +46GG genotipa. Razlika u bronhodilatatornom odgovoru kod dece sa astmom u odnosu na genotipske varijante +79C>G nije statistički značajna. Dalje, rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj tezi su pokazali da deca sa pozitivnom porodičnom anamnezom imaju, češće težak oblik astme u odnosu na decu sa astmom koja nemaju pozitivnu porodičnu anamnezu i to sa visokom statističkom značajnošću. Razlika u učestalosti tipova astme prema težini u odnosu na izloženost duvanskom dimu *in utero* nije statistički značajna.

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj tezi su pokazali da kod dece sa astmom razlika u učestalosti polimorfizama +46A>G i +79C>G u odnosu na prosečnu vrednost ukupnog IgE iz

seruma, prosečnu vrednost eozinofila iz periferne krvi, kao i prisustvo atopijskog dermatitisa nije statistički značajna.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Genetska varijacija u genu za beta-2 adrenergički receptor može imati značajan uticaj na modulaciju odgovora na inhalirane beta-2 agoniste kao glavnu terapiju astme. Prema do sada objavljenim podacima u literaturi, frekvencija dva najčešća polimorfizama +46A>G (Arg16Gly) i +79C>G (Gln27Glu) varira među različitim etničkim grupama (Xie HG i sar, 1999). U ovoj doktorskoj tezi, polimorfizmi +46A>G (Arg16Gly) i +79C>G (Gln27Glu) prvi put su ispitivani u populaciji srpske dece i rezultati su pokazali da je alel +46A detektovan sa učestalošću od 41,7%, dok je alel +79G otkriven sa učestalošću od 23,1% što je u skladu sa objavljenim podacima kod dece bele rase (de Paiva i sar, 2014). Rezultati ove doktorske teze nisu pokazali statistički značajnu razliku u distribuciji genotipova za polimorfizam +46G>A između dece sa astmom i kontrolne grupe zdravih odraslih osoba. Uočena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova u polimorfizmu +79C>G jer je genotip +79CC bio značajno zastupljeniji u grupi dece sa astmom. Ovakvi rezultati su u kontradiktornosti sa rezultatima studija kod Japanaca (Migita O i sar, 2004), Indijaca (Bhatnagar P i sar, 2005) Afroamerikanaca (Lima JJ i sar, 2006) ali su potvrdili rezultate istraživanja sprovedenih kod Britanaca (Hall IP i sar, 2006), Kineza (Yin KS i sar, 2006) kao i kod dece u Italiji (de Paiva i sar, 2014). Dosadašnja istraživanja povezanosti polimorfizama u genu ADRB2 kod dece sa astmom sa bronhodilatatornim odgovorom na inhalirane kratkodelujuće beta-2 agoniste pokazala su kontradiktorne rezultate saopštene u literaturi. U rezultatima ove doktorske teze je pokazano da je prisustvo alela +46G u beta-2 adrenergičkom genu povezano sa boljim bronhodilatatornim odgovorom na inhalacionu primenu kratkodelujućeg beta-2 agonista (salbutamol). Rezultate slične našim prikazali su autori u studijama čiji su rezultati pokazali bolji bronhodilatatorni odgovor kod dece sa genotipom +46GG (Palmer CAN i sar, 2006).

Rezultati ove doktorske teze su u skladu sa rezultatima dobijenim u studiji sprovedenoj kod dece sa astmom u pogoršanju a koji su pokazali da je + 46GG genotip povezan sa boljim bronhodilatatornim odgovorom na kratkodelujući agonist beta-2 adrenergičkog receptora (Carroll i sar, 2009). Postoje publikovane studije koje pokazuju suprotne rezultate od rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj tezi. Rezultati meta analize koja se bavila ispitivanjem povezanosti između polimorfizama u genu za beta-2 adrenergički receptor kod dece sa astmom i odgovora na inhalirani beta-2 agonist, su pokazali značajnu povezanost

između povoljnog terapijskog odgovora na inhalirani beta-2 agonist i genotip +46AA (Finkelstein i sar, 2009). Grupa istraživača iz Egipta je pokazala rezultate studije kod dece sa astmom u kojima je +46G alel (AG i GG genotipovi) bio je povezan sa lošijim bronhodilatatornim odgovorom na inhalirani kratkodjelujući beta-2 agonist (salbutamol) u poređenju sa +46AA genotipom (Salah K i sar, 2012). Jedina do sada sprovedena i objavljena studija u Srbiji bila je kod 171 odrasle osobe sa astmom i pokazala je bolji bronhodilatatorni odgovor kod astmatičara nosilaca alela + 79C (Petrović N i sar, 2014). Meta analiza kod dece iz 2016. godine, kod 4 226 dece iz Severne Evrope i Latinske Amerike ispitala je povezanost prisustva alela A (Arg16 amino kiselina) i pojave egzacerbacije astme kod dece (Turner i sar, 2016). Rezultati su pokazali da nosioci genotipa AA imaju veći rizik za akutno pogoršanje astme. U fokusu ove studije je bila primena beta-2 agonista sa prisustvom AA genotipa i pojavom pogoršanja bolesti. Razlike u bronhodilatatornom odgovoru dece i odraslih na beta-2 agonist su dobro prepoznate u dosadašnjim istraživanjima (Bleecker ER i sar, 2007; Wechsler ME i sar, 2009). Proces starenja utiče na odgovor na ADRB2 agoniste i druge bronhodilatatore što su dosadašnja istraživanja potvrdila pokazavši da je smanjenje reaktivnosti na kratkodjelujući beta-2 agonist (salbutamol) povezano je sa životnim dobom i izraženije je kod starije populacije (Santulli i sar, 2013). Međutim, pregledom literature dolazi se i do rezultata studija koje su pokazale odsustvo povezanosti genetske varijacije ADRB2 i bronhodilatatornog odgovora na inhalirani beta-2 agonist (Tsai HJ i sar, 2006; Fu WP i sar, 2011). Isti rezultati su publikovani i u studijama kod dece u Poljskoj i Kolumbiji (Szczepankiewicz i sar, 2009; Isaza i sar, 2012). Takođe, studija iz 2016. godine kod 120 dece uzrasta od 5 do 15 godina sa astmom u Indiji prikazala je rezultate u kojima nije pronađena značajna povezanost između genotipova beta-2 adrenergičkog receptora i odgovora na salbutamol (Sahi PK i sar, 2016).

Što se tiče uticaja polimorfizama na težinu astme, rezultati ove doktorske teze su pokazali postojanje povezanosti alela +46G u genu za beta-2 adrenergički receptor sa blagim oblikom astme. Ovakav nalaz je u korelaciji je sa nalazima drugih studija koje su do sada publikovane. U metaanalizi 28 studija, autori su zaključili da nosioci genotipa +46AA imaju veći rizik od razvoja teške i noćne astme nego nosioci genotipa +46GG (Contopoulos-Ioannidis DG i sar, 2005). Nije pronađena takva povezanost kod ispitanika koji su nosioci alela +79C. Autori iz Italije su 2016. godine prikazali rezultate studije kod odraslih kojima su pokazali povezanost prisustva genotipa +46AA sa teškom astmom (Scichilone i sar, 2016). S druge strane, Salah i sar su 2012. godine prikazali rezultate studije kod dece sa astmom u

Egiptu koji su pokazali povezanost AA genotipa sa blagom astmom u poređenju sa umerenom i teškom astmom. U do sada publikovanim rezultatima istraživanja uočavaju se razlike u uticaju ispitivanih polimorfizama u ADRB2 genu na težinu astme, kao i terapijski efekat primenjenih lekova u različitim etničkim grupama. Tako su prikazani rezultati istraživanja koje se bavilo ispitivanjem etničke razlike pokazali bolji odgovor salbutamola kod dece meksičke populacije, ali ne i portorikanske populacije, sa + 46AA genotipom (Choudhry i sar, 2005). Prema podacima do sada učinjenih istraživanja, nije postignut konsenzus o odnosu poznatih varijanti u ADRB2 genu i astme a dodatni problem u multikulturalnim sredinama je sve učestalije mešovito etničko poreklo (Ortega V i sar, 2014).

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

1. *Nevena Jovicic, Tamara Kovacevic, Sandra Dragicevic, Branimir Nestorovic, Aleksandra Nikolic. ADRB2 gene polymorphisms and salbutamol responsiveness in Serbian children with asthma. BJMG 2018, Vol.21: No 21(1).*

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija “ POLIMORFIZMI U GENU ZA BETA-2 ADRENERGIČKI RECEPTOR KOD DECE SA ASTMOM U SRBIJI I NJIHOV KLINIČKI ZNAČAJ” dr Nevene Jovičić kao prvi ovakav rad u našoj pedijatrijskoj populaciji, predstavlja originalni naučni doprinos u istraživanjima koja se odnose na na polimorfizme u genu za beta-2 adrenergički receptor kod dece sa astmom u Srbiji i njihov uticaj na težinu astme i bronhodilatatorni odgovor na salbutamol. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da prisustvo određenih polimorfizama u genu za beta-2 adrenergički receptor menjaju terapijski odgovor na primenjeni bronhodilatator (salbutamol) kod dece sa astmom. Takođe, ova doktorska disertacija pokazuje da su polimorfizmi u genu za beta-2 adrenergički receptor povezani sa stepenom težine astme. Rezultati dobijeni ovom studijom mogu poslužiti u planiranju daljih longitudinalnih istraživanja o značaju polimorfizama u genu za beta-2 adrenergički receptor i pronalaženju načina da se predvidi tok bolesti i sprovede personalizovani pristup terapiji prilagođen svakom detetu sa astmom.

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 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 Nevene Jovičić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 11.06.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Branislava Milenković, predsednik

---

Prof. dr Dušica Simić

---

Dr sc. Dragica Radojković

---

Mentor:

Prof. dr Branimir Nestorović

---

Komentor:

Dr sc. Aleksandra Nikolić

---