

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, odlukom broj 5940/16 imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom: „**Ispitivanje značaja polimorfizama gena za citokine i proteine koji regulišu metabolizam i transport imunosupresivnih lekova u akutnom odbacivanju transplantiranog bubrega**” kandidata dr Vladimira Perovića,

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Višnja Ležaić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu**
2. **Prof. dr Miloš Marković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu**
3. **Prof. dr Danilo Vojvodić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije**

Mentor ove doktorske disertacije je **Prof. dr Vera Pravica**, a komentor **Prof. dr Radomir Naumović**.

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

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije:

Doktorska disertacija „**Ispitivanje značaja polimorfizama gena za citokine i proteine koji regulišu metabolizam i transport imunosupresivnih lekova u akutnom**

odbacivanju transplantiranog bubrega” je napisana na 85 strana (bez literature) i podeljena je u sedam poglavlja: Uvod (25 strana), Ciljevi (2 strane), Materijal i metode (6 strana), Rezultati (31 strana), Diskusija (18 strana), Zaključci (3 strane), Literatura (16 strana). Disertacija sadrži 4 slike i 37 tabela. Ona takođe sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, spisak skraćenica, biografiju autora i priloge.

U poglavlju **UVOD**, opisani su opšti i istorijski aspekti transplantacije bubrega. Ukratko je dat pregled najčešćih komplikacija u toku transplantacije sa posebnim osvrtom na akutno odbacivanje (AO) i odloženu funkciju kalema (DGF). Opisana su aktuelna saznanja o poznatim faktorima rizika za pojavu pomenutih komplikacija kao i imunološki mehanizmi koji dovode do oštećenja presađenog bubrega. Poseban akcenat dat je ulozi citokina kao i ulozi immunosupresivne terapije u modulaciji imunskog odgovora na alokalem. U daljem izlaganju, prikazani su genetski faktori koji funkcionalno menjaju ekspresiju citokina i proteina koji učestvuju u metabolizmu i transportu immunosupresivnih lekova. Među genetskim faktorima, posebno su izdvojeni polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP) u genima za sledeće citokine: TNF (*TNFA*), IL-6 (*IL6*), IFN-gama (*IFNG*), IL-10 (*IL10*) i IL-12p40, zajedničku komponentu IL-12 i IL-23 citokina (*IL12B*), odnosno SNP u genima *CYP3A5*, *IMPDH1* i *SLCO1B1* koji kodiraju proteine relevantne za farmakokinetiku i farmakodinamiku immunosupresivnih lekova (*CYP3A5*, *IMPDH1* i *OATP1B1*). Prikazani su i pretpostavljeni mehanizmi kojima ispitivani polimorfizmi mogu doprineti pojavi akutnog odbacivanja i odložene funkcije kalema, kao i dosadašnji rezultati istraživanja na tom polju.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA su jasno definisani i iskazani su kroz tri cilja: 1) odrediti distribucije alela i genotipova polimorfizama *TNFA*, *IL6*, *IFNG*, *IL10*, *IMPDH1* i *SLCO1B1* gena u grupi bolesnika sa transplantiranim bubregom kao i *IL10* i *IL6* gena kod zdravih kontrola, 2) ustanoviti da li je neki od polimorfizama ovih gena povezan sa biohemijskim parametrima funkcije bubrega, odnosno sa nastankom akutnog odbacivanja ili odložene funkcije bubrega 3) proceniti da li se distribucije genotipova ispitivanih polimorfizama kod bolesnika sa transplantiranim bubregom razlikuju u ovoj studiji u odnosu na studije u kojima su ovi polimorfizmi ispitivani u drugim populacijama.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** metodološki jasno i precizno su definisani kriterijumi za selekciju ispitanika i kriterijumi za postavljanje dijagnoze akutnog odbacivanja i odložene funkcije kalema. Izvor demografskih i kliničkih podataka je jasno naznačen u sekciji koja se odnosi na ispitanike. Takođe, detaljno i jasno su opisane metode izolacije DNK, metode detekcije i analize polimorfizama reakcijom lančanog umnožavanja DNK u

realnom vremenu (Real time PCR). Studija je izvedena u skladu sa pravilima Helsinške deklaracije i odobrena je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Takođe je opisana i metodologija korišćena u statističkoj analizi podataka.

U poglavlju **REZULTATI** sistematično i detaljno, kroz tri celine, opisani su i jasno predstavljeni rezultati istraživanja. U prvom delu predstavljeni su demografski podaci i kliničke karakteristike bolesnika. U drugom delu predstavljeni su rezultati ispitivanja polimorfizama *TNFA* (-308G/A, rs1800629), *IL6* (-174G/C, rs1800795), *IFNG* (+874T/A, rs2430561), *IL10* (-1082G/A i -819T/C, odnosno rs1800896 i rs1800871), *IL12B* (+1188A/C, rs3212227), *CYP3A5* (+6986A/G, rs776746), *IMPDH1* (-106G/A, rs2278294) i *SLCO1B1* (+388A/G i +521T/C, odnosno rs2306283 i rs4149056) u grupi bolesnika sa transplantiranim bubregom. Takođe su za navedene polimorfizme *CYP3A5*, *IL6* i *IL10* gena prikazani i rezultati kod zdravih kontrola. Određivana je učestalost alela i genotipova ovih polimorfizama gena, testirana je distribucija genotipova u odnosu na Hardy-Weinberg-ovu ravnotežu, poređena je raspodela genotipova između kohorte iz Srbije i kohorti sa drugih geografskih područja. Takođe, ispitivana je povezanost genotipova ispitivanih polimorfizama sa ranim komplikacijama transplantacije bubrega kao što su akutno odbacivanje i odložena funkcija kalema. Jedini genski lokus koji nije ispitivan u pomenutom kontekstu je *CYP3A5* (rs776746) zbog svoje ograničene polimorfnosti. U trećem delu predstavljeni su rezultati ispitivanja korelacije između genotipova pomenutih polimorfizama i parametara bubrežne funkcije kod bolesnika sa transplantiranim bubregom. Dobijeni rezultati su prikazani na 4 slike i 37 tabela.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan način povezoao 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. Takođe je ukazao na moguće smernice budućih istraživanja u cilju daljeg razjašnjavanja značaja ispitivanih polimorfizama gena u komplikacijama koje prate transplantaciju bubrega.

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

Korišćena **LITERATURA** sadrži spisak od 226 referenci.

B. Kratak opis najvažnijih rezultata

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da postoji povezanost između osoba sa AA genotipom unutar polimorfizma *IL12B* (+1188A/C) i manjeg rizika od nastanka odložene funkcije kalema. Takođe, istaknuto je da A alel može imati potencijalno protektivnu ulogu u patogenezi ove rane komplikacije. Takva asocijacija nije detektovana u vezi sa akutnim odbacivanjem transplantiranog bubrega. U okviru ove doktorske disertacije, utvrđeno je da nijedan drugi analizirani SNP u genima *TNFA* (-308G/A), *IL6* (-174G/C), *IFNG* (+874T/A), *IL10* (-1082G/A, -819T/C i -592C/A), *CYP3A5* (+6986A/G), *IMPDHI* (-106G/A) i *SLCO1B1* (+388A/G i +521T/C) nije udružen sa pojavom AO ili DGF. Takođe, u ovoj studiji nije pronađena ni povezanost između nijednog od analiziranih SNP i vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su distribucije genotipova ispitivanih polimorfizama kod bolesnika sa transplantiranim bubregom u Srbiji bile slične kao i kod većine drugih populacija u regionu i Evropi (sa izuzetkom rs1800795 i rs3212227), dok su se značajno razlikovale u odnosu na populacije zdravih osoba na geografski udaljenim teritorijama i različitog etničkog porekla (Kanada, Velika Britanija, Venecuela, Meksiko itd.). I na kraju, utvrđeno je da genska varijanta rs776746 u *CYP3A5* nema karakteristike polimorfizma u ispitivanoj populaciji s obzirom da je A alel detektovan samo kod jedne zdrave osobe u kontrolnoj grupi.

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 AO ili DGF. Ova studija je prva studija iz Srbije koja se bavila ispitivanjem distribucije alela i genotipova polimorfizama *TNFA* (-308G/A), *IL6* (-174G/C), *IFNG* (+874T/A), *IL10* (-1082G/A, -819T/C, -592C/A), *CYP3A5* (+6986A/G), *IMPDHI* (-106G/A) i *SLCO1B1* (+388A/G i +521T/C) u populaciji bolesnika sa transplantiranim bubregom. Polimorfizam +1188A/C u *IL12B* je po prvi put u ovoj studiji doveden u vezu sa povećanim rizikom od DGF. Rezultati studija iz Kanade, Velike Britanije, Poljske, Francuske i Italije nisu ustanovile ovi vrstu asocijacije. Prilikom ispitivanja polimorfizama u genima *TNF*, *IL6*, *IFNG*, *IL10*, *IMPDHI* i *SLCO1B1* nije utvrđena asocijacija sa AO ili DGF. Podaci iz literature koji se odnose na ispitivane polimorfizme su nekonzistentni, kako u populacijama

iz regiona tako i u populacijama udaljenih geografskih područja tako da rezultati ove disertacije mogu da doprinesu boljem razumevanju uloge ovih genetičkih markera u pojavi ranih komplikacija nakon transplantacije bubrega.

D. Objavljeni ili saopšteni rezultati koji čine deo teze

1. **Perovic V**, Markovic M, Kravljaca M, Milosevic E, Djoric M, Pravica V, Naumovic R. rs3212227 SNP in the IL12B Gene Prevents Delayed Graft Function after Kidney Transplantation. Arch Med Res. 2018 May 10. pii: S0188-4409(18)30155-3. doi: 10.1016/j.arcmed.2018.04.015.

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalan, aktuelan i značajan naučni doprinos u ispitivanju povezanosti između pojedinih alelskih varijanti gena koji kodiraju citokine i proteine koji vrše transport i metabolizam imunosupresivnih lekova sa AO i DGF, sa ciljem boljeg razumevanja uticaja genetske osnove za sklonost ka nastanku ovih ranih komplikacija nakon transplantacije bubrega. Naime, po prvi put u Srbiji je utvrđena frekvencija alela i geotipova *TNFA* (-308G/A), *IL6* (-174G/C), *IFNG* (+874T/A), *IL10* (-1082G/A, -819T/C i -592C/A), *IL12B* (+1188A/C), *CYP3A5* (+6986A/G), *IMPDH1* (-106G/A) i *SLCO1B1* (+388A/G i +521T/C) u populaciji bolesnika sa transplantiranim bubregom i upoređena sa parametrima funkcije i pojavom AO i DGF transplantiranog bubrega. Kao rezultat toga, u ovoj studiji je po prvi put u jednoj populaciji uočena udruženost između AA genotipa u polimorfizmu +1188A/C (rs3212227) u *IL12B* genu i manjeg rizika od nastanka odložene funkcije kalema, ukazujući na potencijalnu važnu protektivnu ulogu tog polimorfizma u patogenezi DGF i njegovu moguću upotrebu kao biomakera u proceni rizika za razvoj ove, ali i drugih ranih komplikacija nakon transplantacije bubrega. Na budućim studijama sa većim brojem ispitanika u našoj i drugim populacijama je da procene stvarni značaj i klinički potencijal ovakvog nalaza ove doktorske disertacije.

F. Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom „**Ispitivanje značaja polimorfizama gena za citokine i proteine koji regulišu metabolizam i transport imunosupresivnih lekova u akutnom odbacivanju transplantiranog bubrega**” kandidata dr Vladimira Perovića, urađena je uz poštovanje svih principa naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledni, sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Stoga, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom „**Ispitivanje značaja polimorfizama gena za citokine i proteine koji regulišu metabolizam i transport imunosupresivnih lekova u akutnom odbacivanju transplantiranog bubrega**” kandidata dr Vladimira Perovića, i odobri javnu odbranu.

Mentor:

Prof. dr Vera Pravica

Komentor:

Prof. dr Radomir Naumović.

Članovi Komisije

Prof. dr Višnja Ležaić

Prof. dr Miloš Marković

Prof. dr Danilo Vojvodić