

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 26.11.2018. godine, broj 9700/01-A3, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Polimorfizam gena za interleukin 6 i monocitni hemoatraktantni protein 1 i nivoi interleukina 17 i interleukina 23 kod obolelih od sistemske skleroze u odnosu na zdrave osobe“**

kandidata dr Ane Zeković, zaposlenoj na Institutu za reumatologiju u Beogradu. Mentor je prof. dr Nemanja Damjanov.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Mirjana Šefik Bukilica, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. N. Sav. Dr Sonja Pavlović, Institut za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo, Beograd
3. Prof. dr Tatjana Ilić, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

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

## IZVEŠTAJ

### **A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije**

Doktorska disertacija dr Ane Zeković napisana je na ukupno 49 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 10 tabela i 4 grafikona. 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 to sistemska skleroza (SSc), koji tipovi SSc postoje i kakve smetnje imaju osobe koje boluju od ove bolesti. Navedeni su etiološki i patogenetski mehanizmi koji učestvuju u nastanku bolesti. Na adekvatan način su u potpunosti opisani

oštećenja kože, promene na plućima, oštećenje plućne funkcije, razvoj plućne arterijske hipertenzije i oštećenje gastrointestinalnog trakta koje se često javlja kod obolelih od sistemske skleroze. Opisane su osnovne karakteristike imunološkog odgovora na nivou interleukina 6 (IL-6), interleukina 17 (IL-17), interleukina 23 (IL-23) i monocitnog hemoatraktantnog proteina 1 (MCP-1) koji učestvuju u patogenezi sistemske skleroze.

Takođe je prikazan detaljan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za ulogu IL-6, IL-17, IL-23 i MCP-1 u razvoju određenih manifestacija bolesti i specifične kliničke slike. Pored merenja nivoa ekspresije IL-6, IL-17 i IL-23, jasno je apostrofirana značaj ispitivanja polimorfizma – 2518 A>G *MCP-1* i -174 G>C *IL-6* gena na predispoziciju za nastanak sistemske skleroze.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja razlike u učestalosti promotorskih varijanti rs1800795 (-174 G>C) *IL-6* gena i rs1024611 (-2518G/A) *MCP-1* gena, kao i razlike u ekspresiji *IL17A*, *IL17F* i *IL23* u ćelijama krvi obolelih od SSc u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Takođe, kao cilj rada navedeno je i ispitivanje povezanost promotorskih varijanti rs1800795 (-174 G>C) *IL-6* gena i rs1024611 (-2518G/A) *MCP-1* gena, kao i ekspresije *IL-17A*, *IL-17F* i *IL-23* u krvi obolelih od SSc sa kliničkom slikom bolesti.

U poglavlju materijal i metode je navedeno da se radi o opservacionoj studiji preseka, koja je sprovedena na Institutu za reumatologiju u Beogradu, u saradnji sa Institutom za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo u Beogradu. Detaljno je opisan način prikupljanja podataka o pacijentima, kao i kriterijumi za uključanje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje iz studije. Opisane su procedura vađenja krvi, procedura izolovanja DNK, RNK i monocita iz periferne krvi, detekcija polimorfizma *IL-6* i *MCP-1* gena, kao i merenje ekspresije *IL-17*, *IL-23* i *IL-6* gena. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključanja u studiju. Upitnik UCLA GIT 2.0 koji je korišćen u studiji za procenu oštećenja gastrointestinalnog trakta (GIT-a) detaljno je opisan, a pojašnjen je i način skorovanja. 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 97 referenci.

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

Na uzorku od 102 bolesnika i 93 zdravih dobrovoljaca, ispitivan je polimorfizam -174C/G IL-6 gena i -2518 G/A MCP-1 gena. Nije bilo značajnih razlika u učestalosti navedenih genskih varijanti između grupe obolelih od SSc i kontrolne grupe zdravih ispitanika. Merene su razlike u nivou ekspresije IL-6, IL-17 i IL-23 gena između obolelih i zdravih ispitanika. Nivoi ekspresije IL-6 gena bili su značajno viši kod obolelih od SSc u odnosu na zdrave ispitanike (66 vs. 3.2,  $p < 0.01$ ). Oboleli od SSc koji su C/C-homozigoti za -174 C/G IL-6, imali su viši nivo ekspresije IL-6, u odnosu na C/G-heterozigote i G/G-homozigote (97.4 i 85.3,  $p > 0.05$ ; 97.4 i 41.2,  $p < 0.05$ ). Ova razlika je bila posebno uočljiva upoređivanjem nivoa ekspresije IL-6 između nosilaca C-alela (C/C-homozigoti i C/G-heterozigoti) i G/G homozigota (95.8 vs. 41.2,  $p < 0.05$ ). Kada je grupa obolelih od SSc podeljena u podgrupe na osnovu razlike u dužini trajanja bolesti, uočeno je da oni koji boluju od 5 do 10 godina, kao i oni kod kojih bolest traje preko 15 godina, imaju statistički značajno više nivoe IL-17AmRNA u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih ( $6.1 \pm 7.8$  vs.  $1.2 \pm 1.7$ ,  $p < 0.05$ ). Niže vrednosti IL-17FmRNA, kao i IL-23 mRNA u odnosu na zdrave ispitanike, primećene su u podrupi kod koje je bolest trajala manje od 5 godina ( $0.9 \pm 1.1$  vs.  $1.2 \pm 0.7$  i  $0.73 \pm 0.6$  vs.  $1.1 \pm 0.4$ ,  $p < 0.05$ ). Uočena je pozitivna korelacija između dužine trajanja bolesti i nivoa IL-17A mRNA ( $r = 0.41$ ).

Ispitivana je udruženost polimorfizma -174C/G IL-6 gena i -2518 G/A MCP-1 gena sa kliničkim znacima bolesti. Primećena je udruženost -174 C/G IL-6 polimorfizma sa stepenom oštećenja GIT-a u SSc. Bolesnici koji su C/C-homozigoti za IL-6 gen, imali su značajno viši broj bodova u kategoriji ukupnog GIT oštećenja u poređenju sa C/G i G/G -heterozigotima ( $0.85$  vs.  $0.5$ ,  $p < 0.05$ ). Broj bodova u kategoriji nadutosti, značajno je viši kod C/C-homozigota za IL-6 gen, u poređenju sa ostalim obolelima od SSc ( $1.4 \pm 0.9$  vs.  $0.78 \pm 0.8$ ,  $p = 0.05$ ). Nije primećena povezanost -174 G/C IL-6 polimorfizma, kao ni -2518G/A MCP-1 polimorfizma ni sa jednim drugim kliničkim obeležjem bolesti.

Ispitivana je udruženost nivoa ekspresije IL-6, IL-17 i IL-23 sa obeležjima bolesti. U grupi obolelih sa difuznim oblikom bolesti, primećena je pozitivna korelacija između nivoa ekspresije IL-6 i stepena zahvaćenosti kože ( $r = 0.41, p < 0.05$ ). Uočena je negativna korelacija između serumskog nivoa IL-17 i vrednosti DLCO ( $r = -0.4, p < 0.05$ ) kod obolelih od SSc. Oboleli od SSc sa povišenim IL-23 u serumu imali su teže oštećenje GIT-a i značajno više bodova u kategorijama nadutost ( $p = 0.01$ ), konstipacija ( $p = 0.01$ ), fekalno prljanje ( $p < 0.05$ ), ukupno GIT oštećenje ( $p < 0.05$ ), emotivno blagostanje ( $p < 0.05$ ) i socijalno funkcionisanje ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa obolelima sa normalnim vrednostima serumskog IL-23. Bolesnici sa težim oštećenjima GIT-a imali su značajno više vrednosti IL-23 u serumu ( $r = 0.35, p < 0.05$ ). Najjača povezanost je primećena između nivoa IL-23 u serumu i broja bodova u kategoriji nadutosti ( $r = 0.5, p < 0.05$ ).

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

Trenutno u literaturi ne postoje podaci o povezanosti ekspresije IL-6 gena, genske varijante -174 C/G i oštećenja GIT-a kod obolelih od SSc. Bolesnici koji su nosioci C-alela za IL-6 gen imali su teže oštećenje GIT-a (značajno viši GIT ukupni skor i skor nadutosti) u poređenju sa ostalim bolesnicima sa SSc. Objavljeni radovi na temu oštećenja GIT-a kod bolesnika sa sistemskim zapaljenjskim odgovorom (*Tsay i sar. 2016*) pokazuju da prenaseljenost creva bakterijama, kao i povećana proizvodnja ekstraćelijskih proteina u zidu creva može biti uzrok poremećene funkcije GIT-a, što može biti slučaj i kod obolelih od SSc, kao to je ranije opisano. Rezultati ukazuju na pozitivnu korelaciju između nivoa ekspresije IL-6 i stepena oštećenja kože kod podgrupe bolesnika sa difuznim kutanim oblikom SSc, ali ne i u celoj grupi bolesnika. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodno objavljenim zapažanjima o povezanosti ekspresije IL-6 i stepena oštećenja kože u SSc, posebno u podrupi obolelih sa difuznim oblikom bolesti (*Khan i sar 2012, Cénit i sar. 2012, Hasegawa i sar. 2011*). Poznato je da na nivo ekspresije IL-6 značajan uticaj ima tip ćelije koja ga sekretuje (*Noss i sar. 2015*). U skladu sa tim, IL-6 se ne eksprimira podjednako u svim tkivima, što donekle može objasniti izostanak korelacije između nivoa ekspresije IL-6 i oštećenja pluća u odabranoj grupi pacijenata sa SSc. Rezultati pokazuju povećanu ekspresiju IL-6 gena kod obolelih od SSc u odnosu na zdrave ispitanike, što je u skladu sa rezultatima prethodno objavljenih istraživanja (*Ebert 2008, Christmann i sar. 2010, Hasegawa i sar. 2011*).

Promotorske varijante -2518 A/G MCP-1 gena dovode se u vezu sa povećanom ekspresijom MCP-1 u fibroblastima obolelih od SSc (*Karrer i sar. 2005*), ali trenutno nema objavljenih podataka o povezanosti -2518 A/G promotorskih varijanti MCP-1 gena i odlika bolesti u SSc. Istraživanje nije pokazalo povezanost -2518 A/G MCP-1 polimorfizma sa kliničkim odlikama bolesti i povećanim rizikom od oboljevanja od sistemske skleroze.

Nivoi ekspresije citokina i imunska ravnoteža podležu značajnim promenama u toku trajanja bolesti (*Gourh i sar. 2009*). Objavljena istraživanja sa kontradiktornim rezultatima ukazuju na izmene nivoa ekspresije IL-17 i IL-23 gena tokom trajanja bolesti, kao na razlike u nivou IL-17 i IL-23 između obolelih od SSc i zdravih ispitanika (*Redstake i sar. 2009, Baraut i sar. 2010, Komura i sar. 2000, Kurasawa i sar. 2008*). Nivoi ekspresije IL-17, IL-6 i IL-23 podležu značajnim promenama u toku trajanja bolesti (*Gourh i sar. 2009*). Nivo ekspresije IL-23 je niži kod obolelih sa kraćim trajanjem bolesti, što je u skladu sa objavljenim rezultatima (*Gourh i sar. 2009*).

Rezultati studije pokazuju da bolesnici sa višim serumskim nivoima IL-17 imaju teža oštećenja plućne funkcije, što je u skladu sa podacima iz literature (*Olewicz-Gawlik i sar. 2014*). Uzrok toga može biti povećano lučenje IL-17 od strane T ćelija koje se u povećanom broju nalaze u fibrotskim lezijama pluća kod SSc (*Gutcher i sar. 2011*). Dokazana je povezanost IL-23 i oštećenja creva u nekim autoimunskim bolestima, dok za sada nema objavljenih podataka o odnosu serumskog nivoa IL-23 i oštećenja GIT-a kod obolelih od sistemske skleroze. Istraživanje pokazuje da bolesnici sa višim serumskim nivoima IL-23 imaju teže oštećenje GIT-a. Najjača povezanost je primećena između nivoa IL-23 u serumu i broja bodova u kategoriji nadutosti, što može biti povezano sa prenaseljenošću creva bakterijama u kasnijim fazama bolesti, kako je ranije opisano (*Savarino i sar 2014, Eken i sar. 2014*). Ustekinumab, monoklonsko antitelo na p40 podjedinicu IL-12 i IL-23, predstavlja obećavajuću terapijsku mogućnost za bolesnike sa Kronovom bolešću (*Gisbert i sar 2017*), dok se o efektima anti-IL-23 terapije u SSc za sada malo zna.

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

1. **Zekovic A**, Vreca M, Spasovski V, Andjelkovic M, Pavlovic S, Damjanov N. Association between the -174 C/G polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene and gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2018 Sep;37(9):2447-2454. doi: 10.1007/s10067-018-4163-6. Epub 2018 Jun 8.
2. **Zekovic A**, Damjanov N. Validation of Serbian version of UCLA Scleroderma Clinical Trial Consortium Gastrointestinal Tract Instrument in 104 patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int*. 2017 May;37(5):735-741. doi: 10.1007/s00296-017-3680-y. Epub 2017 Mar 7.

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

Doktorska disertacija „Polimorfizam gena za interleukin 6 i monocitni hemoatraktantni protein 1 i nivoi interleukina 17 i interleukina 23 kod obolelih od sistemske skleroze u odnosu na zdrave osobe“ dr Ane Zeković, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja promotorskih varijanti -174 G>C IL-6 gena i -2518G/A MCP-1 gena, kao i razlike u ekspresiji IL-6, IL1-7 i IL-23 na rizik za oboljevanje od sistemske skleroze i kliničku sliku bolesti.

Nivoi ekspresije IL-17, IL-23 i IL-6 kod bolesnika sa SSc, značajno se razlikuju u zavisnosti od dužine trajanja bolesti. Promotorska varijanta -174 C/G (prisustvo C-alela) IL-6 gena povezana je sa višim nivoima ekspresije IL-6 gena što treba uzeti u obzir pri izboru adekvatne terapije za svakog obolelog od SSc. Nosioci C-alela u sklopu polimorfizam -174 C/G IL-6 gena češće su imali simptome oštećenja GIT-a, posebno stomačnu nadutost, u poređenju sa ostalim bolesnicima sa SSc. Povećani serumski nivoi IL-23 kod obolelih od SSc takođe su povezani sa težim stepenom oštećenja GIT-a, dok su viši nivoi IL-17 izmereni u serumu obolelih sa težim oštećenjem plućne funkcije. Određivanje nivoa IL-6, IL-23, IL-17 kao i testiranje polimorfizma -174 C/G IL-6 gena kod obolelih od SSc, mogu biti od pomoći pri individualnom pristupu izboru terapije.

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 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 Ane Zeković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 17.12.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Mirjana Šefik Bukilica

---

N. Sav. Dr Sonja Pavlović

---

Prof. dr Tatjana Ilić

---

Mentor:

Prof. dr Nemanja Damjanov

---