

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.06.2019. godine, broj 9700/04-TV, imenovana je komisija za ocenu završne doktorske disertacije pod naslovom:

„Ispitivanje učestalosti polimorfizama gena za faktor nekroze tumora α , interleukin 6 i interleukin 1 β kod prevremeno rođene dece kao faktora rizika za nastanak sepse“

kandidata Tatjane Varljen, zaposlene na Institutu za sudsku medicinu, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor je Prof. dr Tatjana Damnjanović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu, a komentor Prof. dr Vesna Vujić redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završne doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vera Pravica, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Miloš Ješić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Snežana Pavlekić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Doc. dr Nela Maksimović, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
5. Doc. dr Danijela Todorović, docent Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu

Članovi Komisije za ocenu završene doktorske disertacije su detaljno proučili priloženu tezu i jednoglasno podnose Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija Tatjane Varljen napisana je na ukupno 120 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, ispitanici i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 30 tabela, 10 grafikona i 9 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o mentoru, komentoru i članovima komisije.

U **uvodu** je definisano prevremeno rođenje (prematurnitet), navedena epidemiologija i faktori rizika za prematurnitet, kao i komorbiditet udružen sa prematurnitetom. Nadalje, navedena je savremena definicija, epidemiologija i kriterijumi za utvrđivanje sepse. Poseban akcenat stavljen je na neonatalnu sepsu sa faktorima rizika za razvoj sepse kod neonatusa. Detaljno su opisani potencijalni patogeni agensi koji dovode do neonatalne

sepsa, kao i patogeneza, molekularna i genetička osnova neonatalne sepsa. Navedeni su geni kandidati koji su povezani sa nastankom sepsa. Detaljno su opisane karakteristike gena koji su ispitivani, kao i uticaj polimorfizama ovih gena na njihovu ekspresiju. Jasno su navedene osobine i funkcije genskih produkata u procesu inflamacije.

Ciljevi rada bili su utvrđivanje učestalosti genotipova i alela *TNF α -308 G/A*, *IL6 -174 G/C* i *IL1 β -511 G/A* polimorfizama, kao i ispitivanje njihove povezanosti sa nastankom sepsa i ishodom bolesti. Cilj rada je obuhvatio i ispitivanje povezanosti pomenutih polimorfizama sa kliničkim karakteristikama i laboratorijskim pokazateljima neonatalne sepsa. Ciljevi su jasno definisani.

Poglavlje **ispitanici i metode** precizno opisuje kriterijume za uključivanje ispitanika u studiju i kliničke i laboratorijske parametre koji su prikupljeni za svakog ispitanika. Detaljno je opisan proces obrade uzoraka i molekularna osnova izvršenih ispitivanja genskih polimorfizama. Sprovedenje studije je odobrio Etički odbor Instituta za neonatologiju i Etički komitet Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Roditelji svakog ispitanika obavješteni su o cilju studije i dali su pismeni pristanak za učestvovanje u njoj.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

U **diskusiji** su pregledno predstavljeni dobijeni rezultati doktorske disertacije uz uporedni prikaz podataka drugih istraživanja.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 200 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Studijom je utvrđeno da su prematurusi sa ranom sepsom u proseku ranije rođeni, imaju manju porođajnu telesnu masu (PTM) i manji Apgar skor u 5' života. Prematurusi sa sepsom statistički značajno češće su rođeni iz spontano začetih trudnoća koje su završene vaginalnim porođajem. Majke prematurusa sa sepsom statistički značajno ređe su primale kortikosteroidnu i antihipertenzivnu terapiju tokom trudnoće. Terapija antibioticima tokom trudnoće nije uticala na nastanak rane sepsa kod prematurusa. Najčešći uzročnik rane sepsa kod prenaturlusa bile su vrste roda *Acinetobacter*. Letalan ishod je statistički značajno češći kod prematurusa sa sepsom.

Istraživanje je pokazalo da A alel *TNF α -308 G/A* polimorfizma predstavlja faktor rizika za nastanak rane neonatalne sepsa, ali ne i za ishod bolesti. Logističkom regresionom analizom potvrđena je povezanost GA i AA genotipova ovog polimorfizma sa hemokulturom potvrđenom i kliničkom sepsom. Takođe, utvrđeno je da AA genotip *TNF α -308 G/A* polimorfizma predstavlja faktor rizika za nastanak bronhopulmonalne displazije kod prematurusa. Prematurusi nosioci AA genotipa su statistički značajno češće imali trombocitopeniju, a nosioci GA i AA genotipova su statistički značajno češće imali povišene vrednosti CRP-a.

Ispitivanje *IL6 -174 G/C* polimorfizma u ovoj studiji pokazalo je da nema asocijacije ovog polimorfizma nastankom i ishodom rane sepse kod prematurusa. Takođe, polimorfizam nije udružen sa pojavom respiratornog distress sindroma, bronhopulmonalne displazije, intraventrikularne hemoragije, ni metaboličke acidoze. Toksične strukture u polimorfonuklearima češće se uočavaju kod prematurusa nosioca CC genotipa *IL6 -174 G/C* polimorfizma.

Ispitivanje *IL1 β -511 G/A* polimorfizma je pokazalo da AA genotip predstavlja faktor rizika za nastanak rane sepse, kao i faktor rizika za letalni ishod od sepse kod prematurusa. Logističkom regresionom analizom, nakon uključenja PTM i GN kao kovarijata, potvrđen je uticaj AA genotipa na ishod bolesti. AA genotip *IL1 β -511 G/A* polimorfizma povezan je sa nastankom metaboličke acidoze kod prematurusa.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Istraživanja uticaja polimorfizama gena koji imaju značajnu ulogu u akutnoj fazi inflamatornog odgovora kod prevremeno rođene dece su malobrojna i vrlo često kontradiktorna, što je posledica razlika u dizajnu studija, etničkoj pripadnosti i malom broju ispitanika.

Meta analiza Wang i saradnika (Wang i sar., 2017.) u kojoj su objedinjeni rezultati 34 publikacije sa ukupno 12284 ispitanika ukazala je da genotipovi *TNF α -308 G/A* polimorfizma doprinose riziku od sepse i seprtičkog šoka kod kavkazoidnih ispitanika. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja ove doktorske disertacije. Härtel i saradnici (Härtel i sar., 2011.) su ispitivanjem dve velike studije koje su obuhvatile 2870 prematurusa veoma male težine na rođenju pokazali da ne postoji povezanost *TNF α -308 G/A* polimorfizma sa hemokulturom potvrđenom sepsom kod prematurusa, što je suprotno rezultatima naše studije. Ispitivanje Allama i saradnika (Allam i sar., 2011.) pokazalo je da je G alel ovog polimorfizma povezan sa ranom sepsom neonatusa rođenih u terminu. Srinivasan sa saradnicima (Srinivasan i sar., 2017.) dolazi do sličnog rezultata, ukazavši da povećan rizik za nastanak sepse postoji kod neonatusa sa GG genotipom *TNF α -308 G/A* polimorfizma. Rezultati ispitivanja uticaja *TNF α -308 G/A* polimorfizma na smrtnost prematurusa od rane sepse (hemokulturom potvrđene i kliničke) su pokazali da ovaj polimorfizam ne predstavlja faktor rizika za letalan ishod u ovoj studiji. Do istog zaključka došli su i Wang sa saradnicima u svojoj meta analizi. Suprotno navedenim rezultatima, Hedberg sa saradnicima pokazao je u svom istraživanju jaku povezanost GA i AA genotipova *TNF α -308 G/A* polimorfizma sa smrtnošću od neonatalne sepse (Hedberg i sar., 2004.).

Nije uočena povezanost *IL6 -174 G/C* polimorfizma sa nastankom rane neonatalne sepse u ovom istraživanju. IL6 je važan medijator akutne faze infekcije i glavni induktor sinteze CRP u jetri. Veoma rano dostiže visoke serumske vrednosti što ga čini dobrim markerom (Machado i sar., 2014.). Brojna istraživanja na pedijatrijskoj i neonatalnoj populaciji ukazuju na povezanost ovog polimorfizma sa nastankom, tokom i ishodom sepse (Harding i sar., 2003., Ahrens i sar., 2004., Baier i sar., 2006., Wynn i sar., 2010., Jabandzie i sar., 2014.) što je suprotno našim rezultatima. Ipak, u dve meta analize koje su istraživale značaj ovog polimorfizma za nastanak rane neonatalne sepse (EONS), povezanost nije uočena što

je u skladu sa našim rezultatima (Chauhan i McGuire, 2008., Machado i sar., 2014.). Nije pronađena veza *IL6 -174 G/C* polimorfizma sa letalnim ishodom prematurusa od sepsa. Suprotno našim rezultatima, meta analiza koja obuhvata 20 studija, od kojih je 9 sa pedijatrijskim pacijentima, utvrdila je da postoji moguća povezanost između *IL6 -174 G/C* polimorfizma i mortaliteta izazvanog sepsom (Gao i sar., 2015.).

Rezultati ove studije su pokazali da *IL1 β -511 G/A* polimorfizam utiče na nastanak sepsa kod pretermeno rođene dece. Nosioci genotipa AA statistički značajno češće razvijaju sepsu od nosioca GG i GA genotipa. Razlika u učestalosti AA genotipa izraženija je između grupe prematurusa sa kliničkom sepsom i kontrolne grupe nego grupe prematurusa sa hemokulturom potvrđenom sepsom i kontrolne grupe prematurusa. Brojne studije koje su ispitivale *IL1 β -511 G/A* polimorfizam nisu pronašle vezu između ovog polimorfizma i neonatalne sepsa (Carvalho i sar., 2013., Chen i sar., 2002., Ma i sar., 2002., Esposito i sar., 2014.). Međutim, u studiji Jiménez-Sousa i saradnika, sa odraslim pacijentima koji su bili podvrgnuti operativnom zahvatu, uočena je asocijacija AA genotipa *IL1 β -511 G/A* polimorfizma sa nastankom septičnog šoka i smrtnog ishoda kod ovih pacijenata (Jiménez-Sousa i sar., 2016.). Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima ovog istraživanja kod prematurusa u kome je uočena povezanost genotipa AA sa nastankom EONS-a, kao i sa letalnim ishodom. Druge studije koje su se bavile ispitivanjem uticaja *IL1 β -511 G/A* polimorfizma na ishod sepsa kod prematurusa nisu dale ovakve rezultate.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Varljen T, Rakic O, Sekulovic G, Jekic B, Maksimovic N, Janevski MR, Novakovic I, Damjanovic T. **Association between Tumor Necrosis Factor- α Promoter -308 G/A Polymorphism and Early Onset Sepsis in Preterm Infants.** *Tohoku J Exp Med.* 2019;247(4):259-264. doi: 10.1620/tjem.247.259.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Brz napredak u molekularnoj medicini doveo je do razvoja metoda i tehnika koje omogućavaju brzu i preciznu dijagnozu infekcije i utvrđivanje individualnih varijabilnosti imunološkog odgovora na infekciju koje se javljaju među pacijentima, a pomoću kojih bi se u budućnosti mogla personalizovanim pristupom izabrati adekvatna terapijska intervencija i omogućiti lakše praćenje odgovora pacijenata na određeni tretman.

Od velikog značaja za razumevanje molekularno genetičke osnove neonatalne sepsa jeste utvrđivanje polimorfničkih genskih lokusa koji kodiraju citokine uključene u inflamatorni odgovor, razvoj i ishod sepsa. Značajno je da se u genetičko – epidemiološkoj studiji utvrdi da li se distribucija analiziranih markera kod neonatusa obolelih od sepsa statistički razlikuje od distribucije u kontrolnoj grupi, odnosno da li oboleli neonatusi sa smrtnim ishodom i oni koji su preživeli septično stanje imaju statistički značajnu razliku u distribuciji genetičkih markera. S obzirom da su brojne genetičko – epidemiološke studije pokazale da učestalosti polimorfizama variraju između etničkih grupa, utvrđivanje učestalosti alela i genotipova analiziranih polimorfizama gena za faktor nekroze tumora α , interleukin 6 i interleukin 1 β kod prematurusa daje značajan naučni doprinos. Ovo je prvo istraživanje polimorfizama gena za faktor nekroze tumora α , interleukin 6 i interleukin 1 β u

populaciji prematurusa u Srbiji. Ono daje preliminarni uvid u značaj ovih polimorfizama za naredna ispitivanja o njihovom uticaju na nastanak, razvoj i ishod sepse.

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 Tatjane Varljen i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 11.07.2019.

MENTOR: Prof. dr Tatjana Damnjanović

vanredni profesor MFUB _____

KOMENTOR: Prof. dr Vesna Vujić

redovni profesor MFUB _____

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Vera Pravica

redovni profesor MFUB _____

2. Prof. dr Miloš Ješić

vanredni profesor MFUB _____

3. Prof. dr Snežana Pavlekić

vanredni profesor MFUB _____

4. Doc. dr Nela Maksimović

docent MFUB _____

5. Doc. dr Danijela Todorović

docent FMNUK _____