

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.03.2020. godine, broj 9700/07-SD imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Intestinalna tkivna ekspresija *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* gena u zapaljenskim bolestima creva“

kandidata dr Sanje Dragašević, zaposlene u Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju, Kliničkog centra Srbije. Mentor je Prof. dr Dragan Popović, a komentor naučni savetnik Sonja Pavlović

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Srđan Đuranović, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Miodrag Krstić, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Aleksandra Sokić-Milutinović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
4. Prof.dr Tamara Milovanović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu.
3. Prof. dr Snežana Pajović, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Nišu.

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 Sanje Dragašević napisana je na ukupno 128 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 16 figura. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** disertacije definisane su zapaljenske bolesti creva (Kronova bolest i ulcerozni kolitis) i prikazan je istorijat istih. Najpre su opisane kliničke manifestacije i pristup pacijentima sa zapaljenskim bolestima creva uključujući i aktuelne dijagnostičke algoritme. Potom su prikazane epidemiološke karakteristike Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa. Nakon toga, jasno su prikazani najznačajniji prepoznati faktori rizika za nastanak zapaljenskih bolesti creva i njihovo mesto u

patogenezi bolesti. Detaljno su opisani poznati patofiziološki mehanizmi zapaljenskih bolesti creva, kao i uloga genetike i imunskog sistema u razvoju bolesti. Identifikovani su do sada prepoznati molekularni i biohemijski markeri koji imaju ulogu kako u nastanku tako i u ranom otkivanju i praćenju obolelih od zapaljenskih bolesti creva. Na adekvatan način opisan je značaj T-helper(h)17 ćelija i njihovog citokinskog profila u patofiziološkim mehanizmima Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa. Takođe je detaljno objašnjen značaj proinflamatornog citokina interleukina (IL)-23 i signalnog puta IL-23/Th17 ćelija. S tim u vezi, opisana je i uloga IL-17A i IL17-F u nastanku i toku zapaljenskih bolesti creva. Nakon toga, prikazana su dosadašnja saznanja vezana za transmembranske receptore TLR (*toll-like receptors*), istraživanja o prisustvu varijanti u *TLR* genima kao i značaj poremećaja funkcije ili ekspresije ovih receptora povezan sa razvojem ili pogoršanjem zapaljenske bolesti creva. Kroz opis karakteristika i uloge TLR9 u povezivanju mikrobijalne i imunološke osnove Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa vrlo se jasno ukazalo na vezu TLR9, IL-23 i IL-17 sa nastankom zapaljenske bolesti creva.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u optimizaciji metode za određivanje nivoa ekspresije gena *TLR9*: dizajn prajmera i probe za TaqMan tehnologiju, izbor endogene kontrole, validacija metode i kriva efikasnosti. Cilj ovog istraživanja bio je i ispitivanje razlika u ekspresiji gena *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* između zapaljenjem zahvaćene i nezahvaćene mukoze creva (kolon i ileum) kod pacijenata sa endoskopski aktivnom Kronovom bolesti i ulceroznim kolitisom. Pored navedenog, cilj istraživanja bio je ispitivanje korelacija ekspresije gena *IL17A*, *IL17F*, *IL23* i *TLR9* sa kliničkom i endoskopskom prezentacijom Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa. Takođe, jedan od ciljeva doktorske disertacije bio je i određivanje međusobnog odnosa ekspresije gena *IL17A* i *IL17F* u zapaljenjem zahvaćenoj i nezahvaćenoj mukozi intestinuma kod pacijenata sa endoskopski aktivnom Kronovom bolesti i ulceroznim kolitisom.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o studiji preseka koja je sprovedena na Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu u saradnji sa Institutom za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Detaljno su navedeni kriterijumi za uključnje u istraživanje kao i kriterijumi za isključenje iz istraživanja. Adekvatno i informativno su prikazani klinički parametri koji su u okviru istraživanja ispitani. Prikazana je procedura istraživanja, metode uzorkovanja, a takođe su detaljno prikazane metode ispitivanja ekspresije odabranih gena u uzorcima intestinalnog tkiva. Opisane su statističke metode korišćene pri obradi podataka. Ovo istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobreno je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu kao i Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključnja u studiju.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati kroz tabelarni, grafikonski i tekstualni prikaz.

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 302 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Grupu ispitanika sa zapaljenskim bolestima creva činilo je 104 novodijagnostikovana pacijenta, od kojih je 50 obolelo od Kronove bolesti, a 54 od ulceroznog kolitisa. Pacijenti su klasifikovani prema Montrealskoj klasifikaciji. U grupi pacijenta sa Kronovom bolesti, 26 je imalo dominantno endoskopski aktivnu bolest u predelu ileuma, dok je 19 ispitanika imalo endoskopski aktivan kolitis. Kod 9 pacijenta dijagnoza Kronove bolesti postavljena je postoperativno. Prema dobijenim anamnestičkim podacima, pacijenti sa ilealnom lokalizacijom Kronove bolesti su imali više porodičnih slučajeva zapaljenskih bolesti creva (23.1%) u odnosu na ostale ispitanike. Iako se pušenje smatra značajnim faktorom rizika za Kronovu bolest, pušački status je bio uniforman između pacijenata sa Kronovom bolesti i ulceroznim kolitisom. Upotreba nesteroidnih inflamatornih lekova bila je češća u grupi pacijenata sa ulceroznim kolitisom (33.3%) u odnosu na ispitanike sa Kronovom bolesti. Razlika u učestalosti pojave ekstraintestinalnih manifestacija između ispitanika nije detektovana.

U cilju validacije metode za kvantifikaciju *TLR9* ekspresije, podaci su analizirani i konstruisana je kriva efikasnosti primenom 7500 System SDS softvera v.1.3.1 (Applied Biosystems). Izvršen je prikaz amplifikacione krive koje odgovaraju razblaženjima cDNK (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ng) sintetisane iz totalne RNK poreklom iz intestinalne mukoze, kao i standardne kriva koja opisuje Ct vrednosti u zavisnosti od merenih razblaženja. Parametri standardne krive su bili optimalni, a metoda validirana za dalje korišćenje prilikom merenja genske ekspresije *TLR9* u intestinalnom tkivu poreklom od pacijenata sa zapaljenskim bolestima creva.

Prilikom ispitivanja razlike u nivoima ekspresije gena *IL17A*, *IL17F*, *IL23A*, *TLR9* između inflamirane i neinflamirane mukoze intestinuma dobijeni su interesantni rezultati. Ekspresiona analiza ukazala je na značajno više nivoe ekspresije *IL17A* i *IL17F* u inflamiranoj mukozi intestinuma zapaljenskih bolesti creva. Inflamirana mukoza ileuma u Kronovoj bolesti i mukoza kod ulceroznog kolitisa pokazale su povišenu ekspresiju *IL23A*, dok su inflamirani uzorci ileuma kod KB imali povišen nivo *TLR9*. Rezultati sprovedene analize ukazuju na postojanje diferencijalne ekspresije gena *IL17A* i *IL17F* u inflamiranoj mukozi u odnosu na neinflamiranu mukoza kod pacijenata sa Kronovom bolesti i ulceroznim kolitisom. Takođe, može se pretpostaviti da ekspresija gena *IL23A* ima veći značaj za nastanak hronične inflamacije kod ulceroznog kolitisa u odnosu na Kronovu bolest sa dominantno koloničnom lokalizacijom. U cilju definisanja inflamatornog profila u mukozi kod

Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa, sprovedena je korelaciona analiza ekspresije ispitivanih gena. Pozitivna korelacija registrovana je između nivoa ekspresije gena *IL17A* i *IL17F* ($rs=0.745$, $p<0.001$ i $rs=0.813$, $p<0.001$ kod ilealne Kronove bolesti; $rs=0.923$, $p<0.001$ i $rs=0.834$, $p<0.001$ kod kolonične Kronove bolesti; $rs=0.771$, $p<0.001$ i $rs=0.871$, $p<0.001$ kod ulceroznog kolitisa) kao i između nivoa ekspresije *IL23A* i *TLR9* ($rs=0.815$, $p<0.001$ i $rs=0.751$, $p<0.001$ kod ilealne Kronove bolesti; $rs=0.786$, $p<0.001$ i $rs=0.820$, $p<0.001$ kod kolonične Kronove bolesti; $rs=0.686$, $p<0.001$ i $rs=0.771$, $p<0.001$ kod ulceroznog kolitisa) u svim analiziranim tipovima mukoze zapaljenskih bolesti creva. Nivoi ekspresije *IL17A* i *IL17F* su korelisali sa *IL23A* ($rs=0.370$, $p=0.006$ u svim analiziranim uzorcima; $rs=0.311$, $p=0.022$ u inflamiranoj sluznici i $rs=0.332$, $p=0.014$ u neinflamiranoj sluznici) kod ulceroznog kolitisa. Rezultati sprovedene analize sugerišu na pozitivnu ko-regulaciju ekspresije *TLR9* i *IL23*, kao sinergiju ekspresije *IL17A* i *IL17F* u patogenezi zapaljenskih bolesti creva. Pozitivna korelacija između nivoa ekspresije *IL17A* i *IL17F* sa nivoom ekspresije *IL23A* kod ulceroznog kolitisa može ukazivati na direktnu vezu između *TLR9-IL23A-IL17*, dok kod Kronove bolesti regulacija verovatno uključuje i druge medijatore.

Nadalje, ispitivana je korelacija ekspresionih profila *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* sa kliničkom i endoskopskom prezentacijom zapaljenskih bolesti creva. Rezultati su ukazali da je indeks kliničke aktivnosti Kronove bolesti pozitivno korelisao sa nivoom ekspresije *IL17A* i *IL17F*, a negativno sa nivoom *IL23* i *TLR9* u inflamiranoj sluznici kolona. U ulceroznom kolitisu registrovana je pozitivna korelacija između endoskopske i kliničke aktivnosti prema vrednostima Mayo skora i nivoa kolonične ekspresije *IL17A* u svim analiziranim uzorcima mukoze, *IL17F* u neinflamiranoj mukozi i *IL23* u inflamiranoj sluznici intestinuma. Inflamirana mukoza ileuma kod stenozantne/penetrantne forme Kronove bolesti ukazala je na viši nivo ekspresije *IL17F* i *IL23A* u poređenju sa inflamatornom formom, dok kod kolonične lokalizacije nivo ekspresije *IL17A* je bio značajno niži u poređenju sa inflamatornom (nestenozantnom/nepenetrantnom) formom bolesti. Takođe, pacijenti sa umerenom i teškom formom ulceroznog kolitisa su imali značajno više nivoe ekspresije *IL17A* i *IL17F* u zdravoj mukozi i viši nivo ekspresije *IL23A* u zdravoj i oboleloj mukozi kolona u poređenju sa blagom formom ulceroznog kolitisa. U slučaju pacijenata sa Kronovom bolesti koji su operisani na dijagnozi, registrovan je značajno viši nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* u zdravoj mukozi ileuma u poređenju sa onima koji nisu bili podvrgnuti operativnom tretmanu. Takođe, operisani pacijenti su imali povišene nivoe *IL23A* i *TLR9* u oboleloj sluznici kolona u odnosu na neoperisane.

U ovom istraživanju pokazano je da postoji je značajna razlika u nivou odnosa ekspresije *IL17A/IL17F* između bolesne i zdrave mukoze kod UK

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Uloga gena udruženih sa Th17 inflamatornom kaskadom uključujući *IL23A*, *IL17A* i *IL17F* i *TLR9* u procesu imunopatogeneze zapaljenskih bolesti creva je idalje predmet brojnih istraživanja. U ovoj doktorskoj disertaciji analizirani su profili iRNK u uparenim uzorcima inflamirane i neinflamirane mukoze ileuma i kolona kod Kronove bolesti, kao i kolona kod ulceroznog kolitisa, za gene udružene sa Th17 inflamatornom kaskadom. Rezultati su ukazali na povišen nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* u bolesnoj mukozi svih analiziranih fenotipova zapaljenskih bolesti creva, ukazujući na značaj Th17 efektorskih ćelija u patogenezi bolesti, što je i u saglasnosti sa drugim podacima iz literature (Kobayashi i sar, 2008, Iboshi i sar, 2017, Bogaert i sar, 2010, Olsen i sar, 2011). Međutim, postoje indikacije da IL-17 pored neregulisane inflamacije može doprineti i anti-zapaljenskim procesima u intestinumu (Giles i sar, 2013, Pappu i sar, 2011). Naime, neravnoteža između IL-17A i IL-17F može imati važnu ulogu u imunopatogenezi zapaljenskih bolesti creva. Potencijalno protektivni efekat IL-17A i patogena uloga IL-17F je detektovana u eksperimentalnim studijama DSS indukovnog kolitisa i utvrđen je značaj IL-17A u modulaciji Th1 polarizacije (Yang i sar, 2008; O'Conner i sar, 2009). Tang i saradnici (2018) su tokom proučavanja eksperimentalnog kolitisa kod miševa deficijentnih za IL-17A, IL-17F ili oba citokina ukazali na protektivnu ulogu IL-17A koja je dovedena u vezu sa porastom frekvencije intestinalnih regulatornih T ćelija, dok je IL-17F uticao na promociju kolitisa. Rezultati našeg istraživanja potvrđuju postavljenu hipotezu, obzirom da smo pokazali povišen nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* u bolesnoj mukozi ileuma i kolona kod Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa. Detektovana pozitivna korelacija nivoa ekspresije *IL17A* i *IL17F* ukazuje na njihovu udruženu regulaciju transkripcije u zapaljenskim bolestima creva i može se objasniti i postojanjem IL-17A/F heterodimera (Goepfert i sar, 2017, Giles i sar, 2013, Chang i sar, 2007). Adamik i saradnici (2013) su ukazali da je transkripcija *IL17A* i *IL17F* najverovatnije koordinisana, ali sugerise se da ekspresija navedenih gena može biti različito regulisana u zavisnosti od proinflamatornog okruženja osnovne bolesti. Kao potencijalni modulatori sekrecije IL-17 od strane Th17 ćelija identifikovani su prostaglandin E2 (PGE2), IL-23 i IL-1 β (Adamik i sar, 2013). Međutim, rezultati drugih studija ukazuju na veći proinflamatorni uticaj IL-17A u odnosu na IL-17F i heterodimer IL17-A/F (Iboshi i sar, 2017, Pappu i sar, 2011, Wright i sar, 2007). Ekspresioni profili *IL17* gena su varirali u zavisnosti od tipa zapaljenske bolesti creva i njene lokalizacije. Seiderer i saradnici (2008) su detektovali značajno povišenu ekspresiju *IL17F* u koloničnoj oboleloj mukozi u poređenju sa zdravom kod Kronove bolesti, ali ne i kod ulceroznog kolitisa. Takođe, Nemeth i saradnici (2017) su registrovali povišenu ekspresiju *IL17* u bolesnoj sluznici kod Kronove bolesti, dok je ista izostala kod ulceroznog kolitisa, ukazujući na veći značaj Th17 imunog odgovora u nastanku Kronove bolesti. Međutim, naši rezultati kod ulceroznog kolitisa su u suprotnosti sa prethodnim istraživanjima i ukazali su na značajno viši nivo ekspresije *IL17A* u oboleloj mukozi, kao i značajno viši nivo u odnosu ekspresije *IL17A/IL17F* između bolesne i zdrave sluznice intestinuma.

U našem istraživanju ekspresioni profili *IL23A* i *TLR9* nisu bili podjednako izraženi u ispitivanim fenotipskim podtipovima zapaljenske bolesti creva. Obolela ilealna sluznica kod Kronove bolesti je ukazala na značajan porast nivoa ekspresije *TLR9* u poređenju sa zdravom mukozom, dok navedeno nije uočeno kod kolonične lokalizacije. Iako nije detektovana značajnost, obolela mukoza kolona je imala viši nivo ekspresije *IL23A* u odnosu na zdravu kod Kronove bolesti. U našem istraživanju pacijenti sa ulceroznim kolitisom su imali značajno povišen nivo ekspresije *IL23A* u inflamiranoj sluznici u odnosu na zdravu mukožu, dok se ekspresija *TLR9* nije značajno razlikovala. Rumio i saradnici (2004) su ukazali da izrazito povišena ekspresija *TLR9* u oboleloj sluznici ileuma može biti udružena sa postojanjem Panetovih ćelija koje ekspresiraju *TLR9* i čija aktivacija dovodi do predominantne sekrecije citokina Th1 imunskog odgovora. U nekoliko eksperimentalnih modela kolitisa, aktivacija *TLR9* je doprinela prevenciji mukozne inflamacije i zaceljenju sluznice (Obermeier i sar, 2005, Weber i sar, 2010). Povišen nivo ekspresije *TLR9* u zapaljenkim bolestima creva udružen je sa postojanjem polimorfne sekvence u promotoru *TLR9* pacijenata, neutrofilnim infiltratom u obolelom intestinumu i disbiozom kod ulceroznog kolitisa (Kordjazy i sar, 2018, Tan i sar, 2014). Sánchez-Muñoz i saradnici (2010) detektovali su povišen ekspresioni profil *TLR9* u mukozi kolona aktivnog ulceroznog kolitisa u poređenju sa pacijentima koji su bili u remisivnoj fazi bolesti. Međutim, neke studije su imale suprotne rezultate, bez ustanovljene značajnosti u nivou ekspresije *TLR9* iRNK između mukoze kolona kod ulceroznog kolitisa i zdravih kontrola, kao i u slučaju zapaljenjskih bolesti creva u aktivnoj i remisivnoj fazi (Fernandes i sar, 2016, Pedersen i sar, 2005).

Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz postojeće literature, verovatno je postojanje pozitivne sprege toll-like receptora (TLR) u indukciji *IL23/Th17* signalizacije, iako ona nije u potpunosti razjašnjena (Nadorp i sar, 2015, Khader i sar, 2009, Happel i sar, 2003). Bhan i saradnici (2013) su sproveli studiju na dendritskim ćelijama eksperimentalnih miševa i ukazali na *TLR9*-zavistan *IL-23/IL-17* imunski odgovor u toku granulomatozne infekcije u plućima i aktivaciju ekspresije *IL23A* nakon stimulacije *TLR9* antigenom preko *NF-κB* signalnog puta. Međutim, neophodno je naglasiti da se Th17 ćelijski odgovor može pokrenuti nezavisno od *TLR* aktivacije (Ivanov i sar 2008, Atarashi i sar, 2008). U našoj studiji, nivo ekspresije *TLR9* nije korelisao sa nivoima *IL17A* i *IL17F*, osim u oboleloj mukozi kolona kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom.

Detektovan je značajno viši nivo ekspresije *IL17A* u svim tipovima mukoze pacijenata sa ulceroznim kolitisom u odnosu na Kronovu bolest, dok su u proseku više vrednosti nivoa ekspresije *IL23A* i *IL17F* identifikovane u oboleloj mukozi ulceroznog kolitisa, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih studija (Kobayashi i sar, 2008, Olsen i sar, 2011). U meta-analizi transkriptoma Granlund i saradnika (2012) pokazano je da je ekspresija gena asociраних sa Th1 i Th17 ćelijskim odgovorom vrlo slična između Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa, osim kod nivoa ekspresije *IL23A* koja je bila značajno viša u mukozi sa ulceroznim kolitisom. Kobayashi i saradnici (2008) sugerisali su da *IL-23* može usmeravati produkciju različitih citokina u zapaljenjskim bolestima creva, uključujući Th17

imunski odgovor značajan za patogenezu ulceroznog kolitisa, kao i Th1/Th17 koji je dominantan u nastanku Kronove bolesti. Rezultati naše studije su u saglasnosti sa navedenom hipotezom.

U cilju analize značaja nivoa analiziranih iRNK kao potencijalnih markera toka bolesti i fenotipskih podtipova, u uzorcima kolona sa Kronovom bolesti, nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* u neinflamiranoj mukozi pozitivno je korelisao sa vrednostima indeksa kliničke aktivnosti CDAI, dok je nivo ekspresije *IL23A* i *TLR9* u oboleloj mukozi kolona negativno korelisao. Nasuprot kliničkoj aktivnosti, kod pacijenata sa Kronovom bolesti nije detektovana korelacija nivoa iRNK analiziranih gena sa indeksima za endoskopsku aktivnost bolesti, što je u saglasnosti sa podacima iz literature (Minderhoud i sar, 2007). Kod ulceroznog kolitisa, nivoi ekspresije *IL17A* i *IL17F* u zdravoj mukozi, kao i *IL17A* i *IL23A* u oboleloj mukozi pozitivno su korelisali sa endoskopskim i ukupnim Mayo skorom. U saglasnosti sa našim istraživanjem, Roman i saradnici (2013) su analizom transkriptoma identifikovali brojne transkripte u mukozi pacijenata sa ulceroznim kolitisom koji su korelisali sa ukupnim Mayo skorom, uključujući iRNK *IL17A* i *IL23A*. Takođe, Olsen i saradnici (2011) su ukazali na pozitivnu korelaciju nivoa ekspresije *IL17A* i *IL23A* u inflamiranoj mukozi sa indeksom kliničke i endoskopske aktivnosti kod ulceroznog kolitisa, a u slučaju Kronove bolesti sa vrednostima CDAI. U našoj studiji nije nađena korelacija između skorova aktivnosti ulceroznog kolitisa i intestinalne ekspresije *TLR9* iRNA, iako su neke studije su pokazale pozitivnu korelaciju između ekspresije *TLR9* i stepena endoskopske i histološke aktivnosti bolesti (Tan i sar, 2014, Sánchez-Muñoz i sar, 2010).

Analizirajući kliniču težinu zapaljenskih bolesti creva, u našem istraživanju identifikovali smo značajno više nivoe intestinalne ekspresije *IL17F* i *IL23A* u zdravoj mukozi ileuma kod strikturirajućim/penetrirajuće forme Kronove bolesti u poređenju sa inflamatornim fenotipom. S druge strane, zdrava mukoza kolona kod strikturirajućim/penetrirajuće forme je imala značajno niže nivoe ekspresije *IL17A* u poređenju sa inflamatornom formom. Kerami i saradnici (2014) su ukazali na IL-17 kao modulatora intestinalne fibroze, čija povišena ekspresija kod Kronove bolesti indukuje ekspresiju proinflamatornog hemokina CXCL1 i transkripcionog faktora NFKBIZ kod intestinalnih fibroblasta. Izolacijom intestinalnih fibroblasta poreklom od pacijenata sa Kronovom bolesti, detektovana je značajno viša ekspresija IL-17 receptora na ovim ćelijama (Kerami i sar, 2014).

Verma R i saradnici (2013) su opisali povišenu ekspresiju *IL17A* u mukozi kolona umerene i teške aktivnosti ulceroznog kolitisa, u poređenju sa remisivnom fazom bolesti i zdravim kontrolama. Povišen nivo iRNA *IL17A* je detektovan u oboleloj sluznici kolona kod umerenog i teškog ulceroznog kolitisa (Nielsen i sar, 2003). Ohman i saradnici (2013) su pokazali prediktivni značaj nivoa seroloških vrednosti IL-17A za klinički tok ulceroznog kolitisa, dok povišen nivo ekspresije *IL17A* u oboleloj mukozi nije korelisao sa težinom ulceroznog kolitisa. Rezultati naše studije su pokazali da kod ulceroznog kolitisa postoji značajno viši nivo ekspresije *IL17A* i *IL17F* kod pacijenata sa umerenom i teškom u poređenju sa blagom formom bolesti, ali samo na nivou mukoze kolona koja nije

inflamirana. Takođe, viši nivo intestinalne ekspresije *IL23A* u oboleloj i zdravoj mukozi kolona kod pacijenata sa umerenom i teškom formom ulceroznog kolitisa u odnosu na blagu formu detektovan u našem istraživanju se može objasniti ulogom IL-23 u regulisanju intestinalne inflamacije, od redukcije Treg ćelijske aktivnosti do indukcije ekspresije drugih Th17 proinflamatornih citokina (Morrison i sar 2011)

Operativno lečenje kod zapaljenskih bolesti creva je indikovano u slučaju agresivnog toka osnovne bolesti (Belmelman i sar, 2018). Rezultati ove studije ukazali su na udruženost operativnog lečenja i povišenog nivoa ekspresije *IL17A* i *IL17F* u zdravoj mukozi ileuma, kao i povišene ekspresije *IL23A* i *TLR9* u inflamiranoj mukozi kolona kod Kronove bolesti.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, interesantno je zapažanje vezano za merenje potencijalnih markera bolesti u sluznici koja u momentu biopsije nije bila zahvaćena inflamacijom. Nivo analizirane iRNK u aktuelno zdravoj sluznici kod zapaljenskih bolesti creva je bio specifičniji za fenotip i težinu bolesti u poređenju sa nivoima iRNK u mukozi koja je već zahvaćena inflamacijom. León AJ i saradnici (2009) su ukazali na povišenu ekspresiju određenog seta citokina u zdravoj sluznici kod zapaljenskih bolesti creva uključujući IFN- γ , TNF- α , IL-23, IL-6, IL-15 i IL-18 i predočili aktivan imunološki proces u njoj koji još nije doveo do tkivnog oštećenja. Analizirajući učestalo nepoklapanje endoskopske slike i kliničke slike pacijenata sa zapaljenskim bolestima creva, Xu L i saradnici (2016) su pokazali da pacijenti sa umerenom formom zapaljenske bolesti creva pokazuju izmenjenu gensku ekspresiju zdrave mukoze kolona u odnosu na zdrave kontrole, kao i povišen nivo ekspresije *IL17*. Na osnovu navedenog može se zaključiti da genski ekspresioni profili sluznice koja aktuelno nije zahvaćena zapaljenjem može biti potencijalni prediktor daljeg toka bolesti. Međutim, potrebno je sprovesti još istraživanja sa praćenjem pacijenata sa Kronovom bolesti i ulceroznim kolitisom kako bi se ova pretpostavka potvrdila.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Dragašević Sanja**, Stanković Biljana, Milutinović-Sokić Aleksandra, Milosavljević Tomica, Milovanović Tamara, Lukic Snežana, Srzentić Drazilov Sanja, Klaassen Kristel, Kotur Nikola, Pavlović Sonja, Popović Dragan. Importance of *TLR9-IL23-IL17* axis in inflammatory bowel disease development: Gene expression profiling study. Clin Immunol. 2018;197:86-95. doi: 10.1016/j.clim.2018.09.001

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Intestinalna tkivna ekspresija *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* gena u zapaljenskim bolestima creva**“ kandidata dr Sanje Dragašević, predstavlja originalni naučni doprinos jer se po prvi put istražuje zajednička signalna kaskada *IL17A*, *IL17F*, *IL23A* i *TLR9* gena u

nastanku zapaljenskih bolesti creva i njihova veza sa različitim podtipovima bolesti i kliničkim parametrima. Takođe, prikazan je značaj molekularne klasifikacije ulceroznog kolitisa i Kronove bolesti u cilju buduće primene personalizovanog pristupa u lečenju pacijenata obolelih od zapaljenskih bolesti creva.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji mogu poslužiti boljem razumevanju mehanizama koji se nalaze u osnovi nastanka i toka zapaljenskih bolesti creva i mogu biti od koristi u daljim istraživanjima u ovoj oblasti.

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 Sanje Dragašević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 22.05.2020.

Članovi Komisije:

Prof. dr Srđan Đuranović

Mentor:

Prof. dr Dragan Popović

Komentor:

Prof. dr Miodrag Krstić

Naučni savetnik Sonja Pavlović

Prof. dr Aleksandra Sokić-Milutinović

Prof. dr Tamara Milovanović

Prof. dr Snežana Pajović
