

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.02.2019. godine, broj 9700/02-SD, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Utvrdjivanje stepene genetičke homozigotnosti i varijabilnosti i učestalost polimorfizama *TRPV1* i *KCC2* gena kod osoba sa febrilnim napadima“**

kandidata dr Sanje Dimitrijević, zaposlenoj u Specijalnoj bolnici za cerebralnu paralizu i razvojnu neurologiju u Beogradu. Mentor je prof. dr Dimitrije Nikolić, komentor prof. Suzana Cvjetičanin

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivana Novaković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Biljana Jekić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Stojko Vidović, profesor Medicinskog fakulteta u Banja Luci

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 Sanja Dimitrijević napisana je na ukupno 102 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 28 tabela, 17 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 febrilni napad (FN), koji tipovi febrilnih napada postoje i detaljno opisana njihova klinička slika, kao i pojava mogućih komplikacija. Na adekvatan način su u potpunosti opisani patofiziološki mehanizmi nastanka febrilnih napada.

Takođe je prikazan detaljan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za ulogu genetičkih faktora rizika za pojavu febrilnih napada. Pored toga detaljno je opisano mesto i uloga populaciono-genetičkih istraživanja kao mogućeg pristupa proučavanju febrilnih napada.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se od ispitivanja polimorfizama: *rs2297201 KCC2* i *rs222747 TRPV1* gena u kontrolnoj grupi ispitanika i kod dece sa febrilnim napadima, kao i postojanje razlike u učestalosti polimorfizama između ovih grupa. Takođe kao cilj rada navedeno je utvrđivanje stepena genetičke homozigotnosti i varijabilnosti kod dece sa febrilnim napadom i kontrolnoj grupi ispitanika.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o randomizovanoj studiji preseka koja je sprovedena na Univerzitetској dečijој klinici i na Institutu za humanu genetiku

Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Detaljno je opisan način intervjuisanja pacijenata, kao i kriterijumi za uključenje u studiju i za isključenje iz studije.

Ispitanici su podeljeni u podgrupe na osnovu kliničke slike febrilnog napada ili prisustva komorbiditeta kao što je epilepsija na: grupu pacijenata sa jednostavnim febrilnim napadom (JFN), grupu pacijenata sa složenim febrilnim napadom (SFN), grupu pacijenata sa epilepsijom (EPI), grupu pacijenata bez epilepsije (BFN). Za potrebe molekularno-genetičkih istraživanja DNK pacijenata je izolovana iz leukocita periferne krv ili bukalne sluznice. Detaljno je opisan način utvrđivanja stepena genetičke homozigotnosti i varijabilnosti korišćenjem HRO-testa, originalne populaciono-genetičke metode (Marinković i Cvjetičanin 2013) koja omogućava da se na brz i jednostavan način stekne uvid u postojanje određenih genetičkih razlika u testiranim grupama ispitanika. Sve molekularno-genetičke metode korišćene tokom izolacije DNK i određivanja genotipova polimorfizama *KCC2* i *TRPV1* gena su detaljno opisani. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti ili njihovi roditelji/staratelji su dali pisani pristanak pre uključenja 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.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 174 reference.

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

Analizom polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena utvrđena je značajna razlika u učestalosti sve tri vrste genotipa između grupe dece sa FN i kontrolne grupe ispitanika ( $\chi^2 = 8.557$ ;  $p = 0.003$ ). Posebno snažna korelacija je uočena za genotip CC polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena koji je u grupi dece sa febrilnim napadom (69.64%) značajno manje zastupljen nego u kontrolnoj grupi (86.92%). Genotip CT i TT značajno češće imaju deca sa febrilnim napadom (30.36%) u odnosu na zdravu dece (13.08%). Detektovana je takođe snažna Spirmanova korelacija između podgrupe dece sa složenim febrilnim napadom (podtipom febrilnih napada) u odnosu na kontrolnu grupu ( $\chi^2 = 12.836$ ;  $p = 0.000$ ). U kontrolnoj grupi uočeno je značajno češća zastupljenost genotipa CC *rs2297201* polimorfizma *KCC2* gena (86.9%) u odnosu na grupu dece sa složenim febrilnim napadom (59.1%). Dok je za genotip CT i TT detektovana značajno češća zastupljenost u grupi dece sa složenim febrilnim napadom (40.9%) u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika (13.1%).

Analizirana je takođe korelacija polimorfizma *rs222747 TRPV1* gena sa pojavom febrilnih napada, ali ona nije pokazala značajnu razliku u učestalosti genotipova i alela *rs222747* polimorfizma gena *TRPV1* ( $\chi^2=2.759$ ;  $p=0.252$ ).

Različiti genotipovi i aleli analiziranog polimorfizma *TRPV1* gena nisu značajno asocirani sa pojavom febrilnog napada niti epilepsije, a takođe nisu asocirani ni sa određenim tipom febrilnog napada. Pored molekularno-genetičkih analiza rađena je i populaciono-genetičko ispitivanje pomoću HRO testa na nešto većem uzorku od 150 pacijenata. HRO testom detektovano je značajno postojanje razlike između populacije dece sa febrilnim napadom i kontrolne grupe (KN=3.2 ± 0.2, FN=4.3 ± 0.14,  $t=5.023$ ,  $p<0.001$ ). Uočeno je značajno uvećan stepen recesivne homozigotnosti i smanjene varijabilnosti za testirane genske lokuse ne samo u grupi pacijenata sa febrilnim napadom u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika, već i u svim ispitivanim podgrupama obolelih (SFN, JFN, EPI, BFN) (KN=3.2 ± 0.2; JFN: 4.1±0.2; SFN: 4.7±0.3,  $p<0.001$ ); (KN=3.2 ± 0.2; EPI:4.6±0.4; BFN: 4.3±0.2;  $p<0.001$ ). Sa porastom stepena težine ispoljenosti febrilnog napada utvrđeno je kako povećanje u stepena recesivne homozigotnosti tako i smanjenje varijabilnosti za testiranih karakteristika (SFN: V=38.4%, EPI: V=40.69%; BFN: V= 41.10%; JFN: V=42%). Iako nisu uočene razlike u prosečnim vrednostima testiranih HRO kod polova u okviru svake grupe (kontrola, oboleli) (FNm=4.2±0.2, FNž=4.5±0.2,  $t=0.969$ ;  $p>0.5$ ) (KNm=3.3±0.2, KNž=3.2±0.2,  $t=0.265$ ,  $p>0.5$ ), detektovana je razlika u distribuciji pojedinih karakteristika tj. razlika u varijabilnosti u zastupljenosti pojedinačnih HRO (KNm/ž:  $\sum X^2=203.1^{***}$ ; FNm/ž:  $\sum X^2=79,142^{***}$ ). Rezultati testiranja obolelih i "zdravih" dečaka, kao i obolelih i "zdravih" devojčica pokazali su značajnu razliku u smislu uvećane recesivne homozigotnosti i smanjene varijabilnosti kod pacijenata u poređenju sa kontrolnim grupama ispitanika (KNm=3.3±0.2, FNm=4.2±0.2,  $t=2.910$ ,  $p<0.001$ ) (KNz=3.2±0.2, FNz=4.5±0.2,  $t=3.76$ ,  $p<0.001$ ), (FNm=42.0%; FNž=40.2%; KNž=54,03%; KNm=56,8%).

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

Do danas, nije potpuno razjašnjen etiopatogenetski mehanizam pojave febrilnih napada. Uloga genetike u samoj etiologiji febrilnih napada je evidentna, ali takođe nepotpuno razjašnjena. Istraživanja su pokazala da različite promene u *KCC2* genu kod pacijenata sa FN (Puskarjov i sar., 2014, Kahle i sar., 2014, Stodberg i sar., 2015). U literaturi do sada postoje samo dva istraživanja koja su analizirala *rs2297201* polimorfizam *KCC2* gena u etiologiji nekog oboljenja (Lewis i sar., 2010), tako da ovaj doktorat predstavlja pionirski poduhvat u istraživanju ovog polimorfizma u etiologiji febrilnih napada. Učestalost C alela *rs2297201* *KCC2* gena se kreće od 63.8% do 96.6% u zavisnosti od populacije. Naše istraživanje je

pokazalo učestalost C alela u celom analiziranom uzorku 88.6% što je nešto niže od one u evropskoj populaciji. Učestalost C alela u populaciji dece sa FN je 83.9%, dok je u kontrolnoj grupi bilo 93.5%, što je u skladu sa učestalostima u evropskoj populaciji (The Allele Frequency Database. A resource of gene frequency data on human populations supported by the U. S. National Science Foundation). Detektovana je značajno manja zastupljenost genotipa CC polimorfizma *rs2297201 KCC2* gena u grupi dece sa FN (69.6%) u odnosu na kontrolnu grupu (86.9%), što ukazuje na mogući protektivni efekat ovog genotipa za pojavu FN. Genotipovi CT i TT i alel C polimorfizama *rs2297201 KCC2 gena* mogu biti predisponirajući faktor na nastanak FN. Ovi genotipovi su asocirani i sa pojavom SFN, dok nije uočena veza ovog polimorfizma i epilepsije ( $\chi^2 = 2.471$ ;  $p = 0.116$ ). Kako KCC2 kanal ima smanjenu ekspresiju tokom razvoja mozga koja korelira sa uzrasno specifičnom pojavom FN, pretpostavljamo da i male promene u funkciji proteina mogu uticati na smanjen konvulzivni prag u ovom uzrastu. S druge strane, možemo pretpostaviti da ispitivani polimorfizam *KCC2* gena nema ulogu u nastanku epilepsije, tj. predstavlja dokaz o različitom mehanizmu nastanka FN i epilepsije. Važno je napomenuti da povećanje temperature utiče na smanjenu funkciju ovog kanala (Hartman i sar., 2011), pa možemo pretpostaviti da febrilnost u kombinaciji sa ovim polimorfizmom ima kumulativni efekat na pojavu FN.

Učestalost C alela *rs222747* polimorfizma *TRPV1* gena je najniža u Afričkoj populaciji (11.8%), dok je najviša u Aziji (30.1%) (Tabela 28). Rezultati našeg istraživanja su pokazala da je učestalost C alela (24,1%) približna učestalostima u Evropskoj populaciji (24.7%). Učestalost C alela kod dece sa FN je 25.7%, a u kontrolnoj grupi je 22.5%. Razlika u učestalostima genotipova i alela ispitivanog polimorfizma *TRPV1* gena između svih podgrupa dece sa sa febrilnim napadom u poređenju sa kontrolnom grupom nije značajna ( $p > 0,05$ ). Ovi rezultati bi mogli ići u prilog pretpostavci da ovaj polimorfizam ne predstavlja faktor rizika za nastanak febrilnog napada, kao ni za ispoljavanje određenog tipa febrilng napada. U poslednjih tridesetak godina brojna istraživanja koja su uključivala grupe pacijenata obolelih od različitih bolesti, a u okviru kojih je utvrđivana genetička homozigotnost upotrebom HRO testa, pokazala su značajne populaciono-genetičke razlike u odnosu na opštu populaciju. Viši stepen opšte recesivne homozigotnosti je uočen kod brojnih bolesti (Marinković i sar., 1990, Marinković i Cvjetičanin 1994, Marinković i sar., 2007, Cvjetičanin i sar., 2009, Nikolić i sar., 2010, Marinković i Cvjetičanin 2013, Savić i sar., 2018, Karan i sar., 2018). Autori pretpostavljaju da uvećani stepen recesivne homozigotnosti na neki način remeti genetičko-fiziološku homeostazu i predstavlja vid predispozicije za lakše ispoljavanje bolesti. Uvećana genetička homozigotnost bi mogla upućivati i na uvećan stepen genetičkih opterećenja što

može predstavljati vid predispozicije za lakšu ekspresiju bolesti (Cvjetićanin i Marinković 2005, Marinković i sar., 2007, Cvjetićanin i sar., 2009, Nikolić i sar., 2012, Milašinović i sar., 2017, Savić i sar., 2018, Karan i sar., 2018). Važno je istaći da 7/10 HRO koje su značajno odstupale su karakteristike u regionu glave (Tabela 15) i sve su bile učestalije kod dece sa febrilnim napadom. Razlike u zastupljenosti pojedinih recesivnih karakteristika mogle bi se objasniti pretpostavkom da geni koji determinišu ispoljavanje oboljenja deluju plejotropno, čime bi mogli da utiču i na druge karakteristike, kao što su i ispitivane HRO (Cvjetićanin i Marinković 2005, Cvjetićanin i Marinković 2013, Nikolić i sar., 2012, Milašinović i sar., 2017). Rezultati našeg rada pokazuju da se zastupljenosti u prisustvu pojedinačnih HRO razlikuju, 50% (10/20) testiranih fenotipskih karakteristika je učestalije kod pacijenata sa febrilnim napadom, što takođe upućuje na uvećanu recesivnu homozigotnost za gene koji determinišu testirane osobine pa bismo mogli pretpostaviti da izvesne kombinacije gena utiču na pojavu febrilnog napada kod dece. I devojčice iz grupe sa febrilnim napadom su imale značajno veći broj HRO u odnosu na devojčice iz kontrolne grupe, međutim ova razlika je bila nešto manja u poređenju sa dečacima sa febrilnim napadom i dečaka iz kontrolne grupe. Ovaj rezultat nam može ukazivati na to da eventualna pripadnost muškom polu može biti predisponirajući faktor za pojavu febrilnog napada. Naši rezultati su u skladu sa istraživanjima drugih autora koji su pokazali razliku u distribuciji HRO među polovima kod različitih bolesti (Cvjetićanin i sar., 2005, Nikolić i sar., 2011, Nikolić i sar., 2012, Milašinović i sar., 2017, Karan i sar., 2018). Rezultati našeg istraživanja upućuju na to da značajno uvećana recesivna homozigotnost kao i umanjena varijabilnost za ispitivane osobine kod osoba sa FN verovatno dovode organizam u specifično stanje genetičko-fiziološke homeostaze koje bi moglo da predstavlja izvesnu predispoziciju za pojavu FN ili lakše ispoljavanje same bolesti. Ovi nalazi se slažu sa istraživanjima drugih autora u kojima se ukazuje na to da izmena u stepenu genetičke homozigotnosti i varijabilnosti predstavljaju izvesnu predispoziciju za lakšu ekspresiju pojedinih bolesti (Marinković i sar., 1990, Cvjetićanin i sar., 2005, Marinković i Cvjetićanin 2007, Nikolić i sar., 2011, Nikolić i sar., 2012, Milašinović i sar., 2017, Karan i sar., 2018).

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

*Sanja Dimitrijevic*, Suzana Cvjeticanin, Aleksandra Pusica, Biljana Jekic, Tamara Filipovic, and Dimitrije Nikolic. **Anthropogenetic Variability in the Group of Individuals with Febrile Seizures: Population-Genetic Study.** *Biomed Res Int.* 2018:7845904.

doi: 10.1155/2018/7845904

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

Doktorska disertacija „Utvrdjivanje stepene genetičke homozigotnosti i varijabilnosti i učestalost polimorfizama *TRPV1* i *KCC2* gena kod osoba sa febrilnim napadima“ dr Sanje Dimitrijević, kao prvi ovakav rad koji obuhvata srpsku populaciju predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju kompleksne etiologije febrilnih napada. Poseban kvalitet ovog istraživanja leži u činjenici da je prvo istraživanje vezano za analiziranje *KCC2* i *TRPV1* gena u populaciji dece sa febrilnim napadom. Upravo zbog toga treba sprovesti dalja istraživanja na većem uzorku, kao i u različitim populacijama. Genotipovi CT i TT i alel C polimorfizama *rs2297201 KCC2 gena* mogu biti predisponirajući faktor na nastanak FN. Ovi genotipovi su asocirani i sa pojavom SFN. Možemo zaključiti da HRO test omogućava da na brz i jednostavan način utvrdimo stepen genske homozigotnosti i varijabilnosti (kako kod pojedinca tako i u grupi ispitanika) koji bi mogli upućivati na određenu predispoziciju za lakše ispoljavanje FN. Takođe ova metoda omogućava i procenu za moguću genetičku determinisanost različite kliničke slike febrilnog napada.

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

U Beogradu, 15.03.2019.

Članovi Komisije:

Prof. dr Ivana Novaković

---

Prof. dr Biljana Jekić

---

Prof. dr Stojko Vidović

---

Mentor:

Prof. dr Dimitrije Nikolić

---

Komentor:

Prof. dr Suzana Cvjetićanin

---

