

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04. 2016. godine, broj 5940/4 imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom: „**Ispitivanje učestalosti polimorfizama beta-2 adrenergičnih receptora i povezanosti sa terapijskim odgovorom kod osoba sa bronhijalnom astmom**“ kandidata mr sci dr Nataše Petrović-Stanojević, zaposlene u KBC “Zvezdara” u Beogradu kao lekar specijalista interne medicine i asistent na predmetu Interna medicina na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Mentor je Prof. dr Branislava Milenković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof Dr Tatjana Pekmezović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof Dr Aleksandra Ilić-Dudvarski, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Dr sci Dragica Radojković, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetski inženjering Univerziteta u Beogradu.

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Nataše Petrović-Stanojević napisana je na 130 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 21 tabele i 26 slika i

grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **Uvodu** su definisane genetske determinante bronhijalne astme, sa posebnim osvrtom na, kako je do sada pokazano, dva funkcionalno najrelevantnija i najčešća, Gly16Arg i Gln27Glu, čije prisustvo dovodi do fenotipske modulacije ADRB2 na membrani ćelije. Istaknut je značaj razumevanja osnova strukture i funkcije humanog ADRB2 na molekularnom i genetskom nivou. Nadalje su prikazani istorijat otkrića beta receptora, kao i farmakološki razvoj beta agonista, podela i funkcija adrenoceptora, mehanizam relaksacije glatkog mišića izazvan beta-agonistima, pre- i post-sinaptički mehanizmi intracelularne modulacije holinergičke neurotransmisije i tonusa glatkog mišića bronha, kao osnovni mehanizmi disfunkcije beta adrenoceptora. Navedeni su dosadašnji rezultati istraživanja o populacijskoj raspodeli između kodona 16 and 27 kao i varijacije među pojedinim etničkim grupama. Prikazane su i dosadašnje epidemiološke i kliničke studije koje su pokazale da ADRB2 polimorfizam može imati značajne implikacije u patofiziologiji astme, ekspresije fenotipa astme, kao i terapijskog odgovora na ADRB2 agoniste.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u određivanju učestalosti polimorfizma (Gly16Arg), (Gln27Glu) beta2-adrenergičkog receptora (ADRB2) kod osoba sa bronhijalnom astmom i zdravih ispitanika, kao i njihove povezanosti sa tokom bolesti, težinom kliničke slike i terapijskog odgovora kod osoba sa bronhijalnom astmom.

Ciljevi doktorske disertacije bili su a. Određivanje učestalosti polimorfizma (Gly16Arg), (Gln27Glu) beta2-adrenergičkog receptora (ADRB2) kod osoba sa bronhijalnom astmom i zdravih ispitanika; b. Ispitivanje povezanosti kombinacija polimorfizama (Gly16Arg), (Gln27Glu) i agonista beta2-adrenergičkog receptora sa tokom bolesti i težinom kliničke slike kod osoba sa bronhijalnom astmom; c. Ispitivanje povezanosti kombinacija polimorfizama (Gly16Arg), (Gln27Glu) beta2-adrenergičkog receptora i terapijskog odgovora kod osoba sa bronhijalnom astmom

lečenih dugodelujućim beta-agonistima (LABA), samostalno ili u fiksnoj kombinaciji sa kortikosteroidima

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je ispitivanje rađeno na Kliničkom odeljenju za pulmologiju, alergologiju i kliničku imunologiju KBC «Zvezdara», Beograd, u okviru projekta No 173008 "Kompleksne bolesti kao model sistem za proučavanje modulacije fenotipa-strukturalna i funkcionalna analiza molekularnih biomarkera" 2011-2016. god koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnologiju

RS.GenetskeanalizesuurađenenenaInstitutuzamolekularnugenetikuiogenetičkoinženjerstvo Univerziteta u Beogradu.Sve procedure su bile odobrene od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu i sprovedene u skladu sa etičkim principima i smernicamadobre kliničke prakse.Precizno su navedene karakteristike grupe ispitanika i kontrolne grupe, kriterijumi za uključenje, definisani praćeni klinički parametri.. Tok bolesti, kontrola astme i težina kliničke slike bila je određena prema važećim Smernicama Evropskog respiratornog društva (GINA), vrednostima Asthma Control Testa, i vrednostima spirometrijskih parametara opstrukcije. Ishodna varijabla je bila broj i stepen težine pogoršanja bolesti u datom periodu posmatranja. Metodologija genotipizacije Arg16Gln i Gln27Glu polimorfizama je definisanakorišćenjem uzoraka periferne krvi pacijenata, iz kojih je DNK izolovana komercijalnim kitom. Za analizu je korišćeno 5mL venske krvi uzete sa 3,8% Na-citratom u odnosu 9 : 1 i 5mL seruma. Segment DNK u kome se nalaze navedeni polimorfizmi analiziran je metodom PCR (polymerase chain reaction) i direktnog sekvenciranja DNK. Statističke metode korišćene u obradi rezultatasu χ^2 test zanivoverovatnoće $p > 0,05$, univarijantnaimultivarijantnalogističkaregresionaaanaliza.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljani 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 191 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je pokazalo statistički značajnu razliku u frekvenciji genotipova alela između pacijenata i kontrolne grupe, kako u grupi svih pacijenata, tako u grupama posmatranim premapolu. Homozigoti 27Gln/Gln, kao i nosioci alela 27Gln, pokazali su značajnu riziku pojavu astme, dok se prisustvo alela 27Glu pokazalo kao protektivni faktor za pojavu astme. Nosioci genotipa 27Glu/Gln pokazali su smanjen rizik za pojavu astme. Zapolimorfizam Arg16Gly nije uočena razlika u frekvencijama genotipova alela između pacijenata i kontrolne grupe. Kombinacije - haplotipovi 16Arg/Gly-27Gln/Gln i 16Gly/Gly-27Gln/Gln su bile zastupljenije u grupi bolesnika, dok je genotip 16Arg/Gly-27Gln/Glu bio značajno zastupljeniji u zdravoj kontroli. Prisustvo alela 27Gln u kombinaciji, je pokazao značajnu riziku pojavu astme, dok je protektivni efekat alela 27Glu u kombinaciji genotipova 16Arg/Gly-27Gln/Glu.

Za ispitivanje uticaja faktora rizika za verovatnoću razvoja astme kod odraslih, korišćena je binarna logistička regresiona analiza i prikazan je binarni regresioni model za predikciju astme kod odraslih. Dobijeni model predikcije astme obuhvatio je tri nezavisne promenljive: 27Gln alel, pol i godina. Bio je statistički značajan ($p=0,003$). Model može tačno da klasifikuje prisustvo astme kod 61,5 % osoba. Nezavisni prediktori pojave astme u ispitivanoj populaciji bili su: prisustvo alela 27Gln, muški pol i mlađi uzrast.

Nadalje, utvrđeno je da supacijentisaastmomkojisubilihomozigoti 27Gln/Glnbilistatističkiznačajnomlađi u odnosunapacijentesagenotipovima 27Gln/Glui 27Glu/Glu. Ovajuticajnijeuočenzapolimorfizam Arg16Gly.

Međutim, uočeno je da supacijentikojisuimalikombinacijualela16Gly-27Gln biliznačajnomlađi u odnosunapacijentesakombinacijamaalela 16Gly-27Glu i 16Arg-27Gln.

Rezultatimultivarijacioneanalizekojom je ispitanpojedinačniizajedničkiuticajispitivanihpolimorfizamaistarostipacijenatanaparam etrefunkcijepluća u tri uzastopneposetesupokazali da se vrednostiza FEV1% i ACT odprve do trećeoposetestatističkiznačajnorazlikuju u zavisnostiodprisustva/odsustva 27Gln alelaistarosnihgrupacijenata, doksukombinacijealelaistarosnegrupeuticajesamonapromenuvrednosti FEV1, a neinapromenu ACT-a. Polimorfizam 16Arg nijepokazaozajedničkiuticajsagodinamapacijentanapromene FEV1% i ACT-a u tri uzastopneposete. Mlađiasmatičari, naterapijisa LABA, kojisubili 27Glu/Gluhomozigoti (27Gln -)ilisakombinacijom 16Gly-27Glu, imalisunajznačajniji pad funkcijepluća u trećojposeti (obaparametra FEV1% i ACT) u odnosunapacijentekojisubilinosioci 27Gln alelaidrugihkombinacijaalelaistestarnosnegrupe. Nasuprotovome, u populacijistarijihasmatičaranaterapijisa LABA lekovimaprimećuje se da 27Glu/Gluhomozigoti (27Gln -)imaliboljukontroluastme u trećojposeti u odnosunanosioce 27Gln alela, a sličan trend se uočavaikodpacijenatasakombinacijomalela 16Gly-27Glu.

Kodpacijenatakojisuprimali LABA terapijuikojisubilinosioci 16Arg alela, 27Gln alelaikombinacijealela 16Arg-27Gln zapažena je lošijakontrolaastme, doksupacijentikojisuprimalidrugelekove, imaliboljukontroluastme, nezavisnoodgenotipailikombinacijealela.

Pušačikojisubilinaterapiji LABA sasrednjimivisokimdozama inhalacionihkortikosteridasupokazalinajveći pad plućnefunkcije.

U zaključku, utvrđeno je da 27Gln alela povećava rizik za nastanak astme u našoj odrasloj populaciji. Takođe, pokazan je uticaj životne dobine na efikasnost LABA+ICS u odnosu na ADRB2 polimorfizam. Tako, nosioci 27Gln alela mlađi od 50 godina imaju bolji odgovor na LABA+ICS terapiju, dok u starijih pacijenata 27Glu alel dovodi do bolje kontrole astme.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Rezultati ove disertacije ukazuju da postoji statistički značajna razlika u frekvencijama genotipova alela između pacijenata i kontrolne grupe, kako u grupi svih pacijenata, tako i u grupama posmatranim po spolu:

- Osobe koje su nosioci 27Gln alela, naročito homozigotisa Gln27Gln, imaju značajan rizik za pojavu astme. Ovaj rizik je utvrđen kod oba pola, s tim što je kod muškaraca prisustvo ovog genotipa alela bilo povezano sa nešto većim rizikom u odnosu na žene i za 27Gln alel.

- Nosioci Glu27Gln genotipa i 27Glu alela su imali smanjen rizik od pojave astme i za 27Glu alel 0,4. Ovakav protektivni efekat 27Glu alela utvrđen je i kod oba pola.

- Polimorfizam na Arg16 nije bio povezan sa nastankom oboljenja u našoj populaciji, tj. za polimorfizam 16Arg/Gly nisu uočene razlike u frekvencijama genotipova alela između pacijenata i kontrolne grupe.

Prethodne studije (Basu 2009, Lipworth 2013, Cagliani 2009) su ukazale na težu kliničku sliku i veći broj zacerbacija, više izraženo u pedijatrijskoj nego u adultnoj populaciji.

- Kada je analizirana distribucija kombinacija genotipa, pokazano je da osobe sa 16Arg/Gly-27Gln/Glni i 16Gly/Gly-27Gln/Glni imaju dvostruko veći rizik od nastanka astme, dok rizik za nosioce 16Arg/Gly-27Gln/Glni kombinacije iznosi oko trećinu u odnosu na ostale subjekte; ovisno o nalazima konzistentnih meta analiza o povezanosti ADRB2 polimorfizma i astme, u kojoj je takođe primećeno niži rizik od oboljevanja od astme kod 27Gln/Glu heterozigota u

poređenju sadržaja genotipova, dok nije opisana uticaja Arg16Gly (Thakkinstian 2005). Što se tiče analize genetskog statusa, mora se apostrofirati da premaliteraturi, frekvencija alela Arg16Gly i Gln27Glu varirameđurazličitim etničkim grupama (Wier 1998, Xie 1999), kao i da Arg16Gly i Gln27Glu polimorfizmi izazivaju različite stepene agonističke regulacije receptora (Moore 2000).

Frekvencije u 16Gly i 27Glu alela u kontrolnoj grupi iznosile su 53,0% i 27,7%, respektivno, što se značajno ne razlikuje od drugih nalaza u studijama koje su obrađivale populaciju belaca (De Paiva 2014).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Petrovic-Stanojevic N**, Topic A, Nikolic A, Stankovic M, Dopudja-Pantic V, Milenkovic B, Radojkovic D. Polymorphisms of beta2-adrenergic receptor gene in Serbian asthmatic adults: effects on response to beta-agonists, *MolDiagTher* 2014; 18 (6): 639-646.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Ispitivanje učestalosti polimorfizama beta-2 adrenergičnih receptora i povezanosti sa terapijskim odgovorom kod osoba sa bronhijalnom astmom**“ kandidata mr dr Nataše D. Petrović-Stanojević predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizama koji učestvuju u patogenezi bronhijalne astme. U ovoj studiji, polimorfizmi Arg16Gly i Gln27Glu ADRB2 gena ispitivani su u srpskoj populaciji prvi put, kako među zdravim osobama, tako i među pacijentima obolelim od bronhijalne astme. Ova saznanja bi u budućnost potencijalno mogla doprineti razvoju personalizovane terapije astme.

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 drNataše Petrović-Stanojević odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 23.05. 2016.

ČlanoviKomisije:

Mentor:

Prof. drTatjanaPekmezović

Prof. drBranislavaMilenković

Prof. dr Aleksandra Ilić-Dudvarski

DrsciDragicaRadojković, naučnisavetnik
