

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 13.06.2016. godine, broj 5940/5 imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Ispitivanje polimorfizama gena za citokine kod pacijenata sa estom varijabilnom imunodeficijencijom”**

kandidata dr Dijane Perovi , magistra medicinskih nauka.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Dušan Popadi** , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. **Doc. dr Biljana Jeki** , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Jelena Milašin**, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Mentor ove doktorske disertacije je **Prof. dr Vera Bunjeva ki**, a komentor **Prof. dr Branka Bona i-Nikoli** .

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom, komentorom i kandidatkinjom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, lanovi Komisije podnose Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu slede i

## IZVEŠTAJ

### A. Prikaz sadržaja disertacije:

Doktorska disertacija „**Ispitivanje polimorfizama gena za citokine kod pacijenata sa estom varijabilnom imunodeficijencijom**” je napisana na 112 strana i podeljena je u sedam poglavlja: Uvod (27 strana), Ciljevi (1 strana), Materijal i metode (8 strana), Rezultati (21 strana), Diskusija (21 strana), Zaključci (2 strane), Literatura (20 strana). Disertacija sadrži i spisak skraćenica, biografiju autora i priloge. Disertacija uključuje 9 slika, 26 tabela i 1 dijagram. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku i podatke o komisiji.

U poglavlju **UVOD**, opisani su epidemiološki podaci vezani za estu varijabilnu imunodeficijenciju (u daljem tekstu CVID). Opisana su aktuelna saznanja o etiopatogenezi ove primarne imunodeficijencije, sa posebnim osvrtom na poznatu genetsku osnovu i ulogu citokina, odnosno polimorfizama pojedina njih nukleotida u genima za citokine: TNF, IL-6, IL-10 i IFN gama. Prikazani su pretpostavljeni mehanizmi kojima ispitivani polimorfizmi mogu doprineti sklonosti ka javljanju CVID ili njenih kliničkih manifestacija kao i dosadašnji rezultati istraživanja na tom polju. Ukratko su opisani klinička slika, dijagnostički kriterijumi i podela na kliničke fenotipove, imunološki markeri oboljenja, kao i terapija.

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA** su jasno definisani i obuhvataju određivanje distribucije alela i genotipova polimorfizama *TNF*, *IL10*, *IL6* i *IFNG* u grupi pacijenata sa CVID kao i *IL10* i *IL6* kod zdravih osoba u Srbiji za koje do sada nisu postojali podaci. Zatim, procena da li je neki od polimorfizama ovih gena faktor rizika za nastanak CVID ili da li utiče na kliničke manifestacije bolesti, kao i da li se distribucije ispitivanih polimorfizama kod pacijenata sa CVID u ovoj studiji razlikuju u odnosu na podatke iz sličnih studija u drugim populacijama. Osim toga, cilj je bio i ustanoviti da li postoji korelacija određenog genotipa pacijenata sa smanjenom ili povećanom produkcijom određenog citokina na osnovu izmerenih koncentracija TNF, IL-10, IL-6 i IFN- $\gamma$  u supernatantu nakon stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi poliklonalnim aktivatorima.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** metodološki jasno i precizno su definisani kriterijumi za selekciju ispitanika, kriterijumi za postavljanje dijagnoze, kao i za podelu na kliničke fenotipove. Takođe, detaljno i jasno su opisane metode izolacije DNK, metode

detekcije i analize polimorfizama reakcijom lan anog umnožavanja DNK u realnom vremenu (Real time PCR) kao i *in vitro* ispitivanja u cilju odre ivanja koncentracija citokina. Studija je izvedena u skladu sa pravilima Helsinške deklaracije i odobrena je od strane Eti kog odbora Klini kog centra Srbije i Eti kog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U poglavlju **REZULTATI** sistemati no i detaljno, kroz tri celine, opisani su i jasno predstavljeni rezultati istraživanja. U prvom delu predstavljeni su demografski podaci i klini ki parametri. U drugom delu predstavljeni su rezultati ispitivanja polimorfizama *TNF*, *IL10*, *IL6* i *IFNG* u grupi pacijenata sa CVID i zdravih osoba iz kontrolne grupe. Odre ivana je u estalost alela i genotipova u ovim lokusima, upore ena je distribucija alela i genotipova izme u pacijenata sa CVID i zdravih kontrola, kao i me u pacijentima sa pojedinim klini kim fenotipom. U tre em delu predstavljeni su rezultati izmerenih koncentracija TNF, IL-10, IL-6 i IFN- u supernatantu nakon stimulacije mononuklearnih elija periferne krvi poliklonskim aktivatorima kod pacijenata i zdravih kontrola. Pore ena je produkcija citokina izme u dve ispitivane grupe i ispitivana je korelacija odre enog genotipa sa smanjenom ili pove anom produkcijom odre enog citokina kod pacijenata sa CVID. Dobijeni rezultati su ilustrovani sa 24 tabele i 8 slika.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidatkinja je na sveobuhvatan i detaljan na in povezala rezultate ovog istraživanja sa rezultatima sli nih istraživanja objavljenih u me unarodnim nau nim asopisima. Na osnovu toga, kandidatkinja je iznela svoje zaklju ke i hipoteze koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u kontekstu rezultata drugih autora koji imaju isti nau ni interes.

U poglavlju **ZAKLJU CI** navedeni su najzna ajniji zaklju ci koji su potpuno u skladu sa navedenim ciljevima istraživanja i dobijenim rezultatima.

Koriš ena **LITERATURA** sadrži spisak od 190 referenci.

## **B. Kratak opis najvažnijih rezultata**

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da se distribucija alela i genotipova polimorfizama *TNF* -308G/A i *IL6*-174G/C razlikuje u grupi pacijenta sa CVID u odnosu na

zdrave osobe iz kontrolne grupe, kao i da je splenomegalija, jedna od najčešćih komplikacija bolesti, povezana sa *IFNG* +874T/A polimorfizmom. Naime, ispitivanjem *TNF* -308G/A utvrđena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji A alela kod pacijenata sa CVID u odnosu na zdrave kontrole, kao i statistički značajna razlika u zastupljenosti AA i GG genotipa između u dve poređene grupe, pri čemu je GG genotip protektivan, a AA genotip povećava rizik za nastanak CVID. Isto tako, utvrđeno je da se frekvencija G alela polimorfizma *IL6*-174G/C statistički značajno razlikovala u grupi pacijenata sa CVID u odnosu na kontrolnu grupu. Asocijacija je nađena i između u T alela *IFNG* +874T/A i povećanog rizika za razvoj splenomegalije kod pacijenata sa CVID. U istalost alela ispitivanih polimorfizama gena za IL-10 i IL-6 kod zdravih osoba u Srbiji se značajno razlikovala u odnosu na populacije zdravih osoba na geografski udaljenim teritorijama i različitim etničkim poreklom. Ispitivanjem produkcije citokina u supernatantu nakon stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi nađena je visoko statistički značajna razlika u produkciji TNF i IL-6 *in vitro* kod pacijenata sa CVID u odnosu na zdrave kontrole. Međutim, korelacijom genotipova za ispitivane polimorfizme sa produkcijom odgovarajućeg citokina kod pacijenata sa CVID nije dobijena statistički značajna razlika u rezultatima.

### **C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature**

Ne postoji mnogo objavljenih studija u savremenoj literaturi koje su se bavile istraživanjem polimorfizama u genima za citokine kod pacijenata sa CVID. Mullighan je sa saradnicima 1997. godine prvi objavio asocijaciju *TNF* -308 A alela sa sklonošću ka CVID, i obrnuto, negativnu korelaciju sa G alelom, u kohorti od 150 pacijenata i 200 zdravih kontrola regrutovanih iz više centara u V. Britaniji. Više od decenije je prošlo do objavljivanja slične asocijacije u Iranskoj kohorti od 30 pacijenata i 140 zdravih osoba (Rezaei i sar., 2009). Rezultati ove doktorske disertacije, kada je reč o *TNF* -308 G/A polimorfizmu, u skladu su sa rezultatima pomenutih studija u V. Britaniji i Iranu. *TNF* -308 A je imao statistički značajno veću frekvenciju između u pacijentima, kao i homozigotni genotip sa tim alelom, što govori u prilog tome da su reči A alel, kao i AA genotip, faktori rizika za CVID. U isto vreme, G alel i GG genotip su bili značajno češći i u grupi zdravih kontrola, što bi se moglo protumačiti da u odnosu na razvoj CVID imaju protektivnu ulogu. Isto tako, rezultati ispitivanja produkcije TNF u ovoj doktorskoj disertaciji u skladu su sa većinom do sada objavljenih studija koje su ispitivale produkciju tog citokina kod pacijenata sa CVID i govore u prilog povećane

produkcije TNF. Iako korelacija genotipa pacijenata sa produkcijom TNF nije dala statistički značajnu razliku, uočen je trend porasta u produkciji TNF kod nosioa A alela, što je takođe opisano u literaturi. Polimorfizmi u promotorskom regionu *IL10* su takođe ispitivani u studijama sprovedenim u V. Britaniji i Iranu, dok je *IL6* polimorfizam, kod COVID pacijenata osim u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan samo u studiji Rezaei i saradnika. Iako su pomenute studije našle korelaciju određenog genotipa ili haplotipova polimorfizama u genu za IL-10 sa ispoljavanjem COVID i/ili specifično granulomatozne forme ove bolesti, rezultati ove doktorske disertacije nisu pokazali takvu povezanost. Štaviše, kada je reč o polimorfizmu *IL6-174G/C*, rezultati su suprotni, dok su u kohorti iz Irana našli asocijaciju A alela sa ispoljavanjem COVID, rezultati u ovoj tezi pokazali su statistički značajno veću učestalost G alela kod pacijenata sa COVID u odnosu na zdrave kontrole. Međutim, u ovom istraživanju je takođe utvrđeno da se distribucija alela *IL6-174G/C*, kao i drugih ispitivanih polimorfizama razlikuje između zdrave populacije Srbije i geografski udaljenih i etnički različitih populacija. Kada je reč o produkciji IL-6 rezultati ove doktorke disertacije ukazuju na povišenu produkciju IL-6 kod pacijenata sa COVID, a takvi podaci prevladavaju i u literaturi, iako su opisani i suprotni. Kada je reč o *IFNG+874T/A*, ovo je prva studija koja je ispitivala povezanost tog polimorfizma i COVID, a dobijeni rezultati su prvi koji ukazuju na asocijaciju T alela sa razvojem splenomegalije kod pacijenata sa ovom retkom bolešću.

### **Objavljeni ili saopšteni rezultati koji čine deo teze**

- 1: **Perovic D**, Perovic V, Pravica V, Bonaci-Nikolic B, Mijanovic R, Bunjevacki V. Evaluation of cytokine genetic polymorphisms in adult patients with common variable immunodeficiency: A single-center study. *Immunol Lett.* 2016 Jun 8. doi: 10.1016/j.imlet.2016.05.005. [Epub ahead of print]

### **D. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)**

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalan, aktuelan i značajan naučni doprinos u ispitivanju povezanosti između pojedinih alelskih varijanti gena koji kodiraju citokine i patogeneze iste varijabilne imunodeficijencije. Po prvi put u Srbiji utvrđena je frekvencija *TNF -308G/A*, *IL10-1082G/A*, *IL10-819C/T*, *IL6-174G/C* i *IFNG+874T/A* alela kod pacijenata sa COVID. Pokazano je da se učestalost određenih alela navedenih

polimorfizama razlikuje izme u zdravih kontrola i pacijenata, kao i izme u pacijenata sa razli itim klini kim fenotipom.

Ovi nalazi predstavljaju doprinos boljem razumevanju uticaja genetske osnove za sklonost ka nastanku COVID.

#### **E. Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije**

Doktorska disertacija pod nazivom „**Ispitivanje polimorfizama gena za citokine kod pacijenata sa estom varijabilnom imunodeficijencijom**” kandidata dr Dijane Perovi , magistra medicinskih nauka, ura ena je uz poštovanje svih principa nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledni, sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci.

Stoga, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom „**Ispitivanje polimorfizama gena za citokine kod pacijenata sa estom varijabilnom imunodeficijencijom**” kandidata dr Dijane Perovi , magistra medicinskih nauka, i odobri javnu odbranu.

**Mentor:**

---

Prof. dr Vera Bunjeva ki

**Komentor:**

---

Prof. dr Branka Bona i-Nikoli .

**lanovi Komisije**

---

Prof. dr Dušan Popadi

---

Doc. dr Biljana Jeki

---

Prof. dr Jelena Milašin