

**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 5940/05, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**“ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA eNOS GENA KAO FAKTORA RIZIKA ZA RAZVOJ  
RETINOPATIJE  
PREVREMENO RO ENE DECE“**

kandidata mr.dr Jelice Panteli , zaposlene u Klini kom Centru Srbije na Klinici za o ne bolesti. Mentor je Prof. dr Ivan Stefanovi , a komentor Doc. dr Tatjana Damnjanovi .

Komisija za ocenu završne doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Nataša Cerovac, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Biljana Jeki , docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Ana Oros, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije**

Doktorska disertacija mr sci Jelice Panteli napisana je na ukupno 127 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, metodologija istraživanja, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 22 tabele, 16 slika i 14 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, spisak skra enica koriš enih u tekstu, priloge i biografiju kandidata.

U **uvodu** je data definicija retinopatije prematuriteta (ROP), vreme javljanja oboljenja, na in otkrivanja tj.oftalmološki skrining i terapija. Opisani su uzroci javljanja oboljenja. Prikazan je detaljan osvrt na dosadašnja saznanja o oboljenju, faktorima rizika kao i rasprostranjenosti bolesti. Date su osnove vaskulogeneze retine i patogeneze oboljenja. Navedena je precizna klasifikacija po anatomskim karakteristikama – Me unarodna klasifikacija premature retinopatije – International Classification for Retinopathy of Prematurity – (ICROP) ime je omogu eno da budu ujedna eni kriterijumi dijagnostike aktivne forme retinopatije, pravovremeno le enje i pra enje rezultata le enja. Ukazano je na najagresivniji oblik oboljenja – AP ROP koji se javlja vrlo rano kod najnezrelije dece. Na adekvatan na in je opisan zna aj oftalmološkog skrininga u otkrivanju oboljenja. Bez obzira na injenicu da ROP predstavlja naj eš i uzrok slepila danas, ovaj ishod može se pravovremenom prevencijom spre iti. Detaljno je opisan zna aj pojedinih faktora rizika. Dat je akcenat na geneti kim faktorima rizika sa pregledom literature i skrenuta pažnja na polimorfizme eNOS gena kao faktore rizika za retinopatiju prevremeno ro ene dece.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Ispitivana je u estalost genotipova i alela polimorfizama T-786C i 4a/4b gena za endotelnu azot oksid sintetazu u populaciji prevremeno ro ene dece kao i prisustvo povezanosti ispitivanih polimorfnih geneskih varijanti sa nastankom teškog stepena retinopatije. Tako e, studija je sprovedena sa ciljem da se ispituju klini ki faktori rizika udruženi sa nastankom teškog stepena retinopatije prevremeno ro ene dece.

U poglavlju **materijal i metode** isti e se da je ovo prospektivno klini ka studija preseka koja uklju uje 239-oro prevremeno ro ene dece. Sprovedena je na Klinici za ginekologiju i akušerstvo KCS i Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Detaljno su opisani kriterijumi za uklju enje u studiju. Na osnovu sprovedenog oftalmološkog skrininga prevremeno ro ena deca podeljena su u dve grupe. ROP grupa je obuhvatila prevremeno ro enu decu kod kojih je stepen ROP-a zahtevao oftalmološku terapiju, a kontrolnu grupu su inila deca kod kojih terapija nije primenjena.

Prisustvo faktora rizika analizirano je korišćenjem medicinske dokumentacije. Za molekularno-genetičko ispitivanje izvršena je izolacija DNK iz bukalne sluznice prevremeno rođene dece. Detaljno je opisana metodologija izolacije DNK, kao i PCR metoda za detekciju ispitivanih polimorfizama. Etički komitet, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu je odobrio ovo istraživanje. Roditelji prevremeno rođene dece su obavešteni u pismenoj formi o oboljenju (ROP), na inu lezija, mogućim posledicama, kao i ciljevima molekularno-genetičke studije u koju će njihova deca biti uključena. Roditelji su dali pismeni pristanak da se uzme bris bukalne sluznice njihovog deteta i da dete učestvuje u istraživanju.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani, tabelarno i grafički 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 166 referenci.

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

Rezultati ispitivanja polimorfizma T-786C pokazuju da je 39,1% dece homozigotno za eš i alel T (genotip TT), 52,3% su heterozigoti i 8,6% homozigoti za re i alel C (genotip CC). Uestalost alela C je 34,8%, a uestalost alela T 65,2%. Uestalost genotipova T-786C polimorfizma u grupi sa ROP-om je: 40,0% TT genotipa, 51,7% CT genotipa i CC genotipa 8,3%. U kontrolnoj grupi uestalost TT genotipa je 38,2%, CT genotipa 52,9% i CC genotipa 8,8%. Uestalost C alela u ROP grupi je 34,2% naspram C 35,3% u kontrolnoj grupi.

Ispitivanjem polimorfizma 4a/4b utvrđeno je da je 65,3% dece homozigotno za eš i alel 4b (genotip bb), 31,2% su heterozigoti (genotip ab) i 3,5% homozigoti za re i

alel 4a (genotip aa). Uestalost alela 4a je 19,1%, a uestalost alela 4b 80,9%. Uestalost 4a/4b polimorfizma u grupi sa ROP-om je: genotipa 4bb 60,2%, genotipa 4ba 34,9% i genotipa 4aa 4,9%. U kontrolnoj grupi uestalost genotipa 4bb je 70,1%, genotipa 4ba 27,6% i 4aa genotipa 2,3%. Uestalost 4a alela u ROP grupi je 22,3% naspram 4a 16,1% u kontrolnoj grupi. Nije naenastatistiki znaajna razlika u uestalosti genotipova i alela ispitivanih polimorfizama gena za endotelnu azot oksid sintetazu izme u ispitivanih grupa.

Statistiki znaajna razlika je uo ena kod dece ženskog pola po dominantnom modelu (4bb/4ab+4aa). Deca ženskog pola sa ispoljenim ROP-om su eše nosioci 4ba i 4aa genotipova od dece ženskog pola u kontrolnoj grupi. Nosioci 4aa genotipa oba pola eNOS 4a/4b polimorfizma imali su nižu nedelju gestacije u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Ispitivana prevremeno ro ena deca nosioci 4aa genotipa imaju nižu NG, TM i Apgar skor, a ve i broj dana provedenih na terapiji kiseonikom u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Ispitivanjem srednje vrednosti NG statistiki znaajna razlika se uo ava po recesivnom modelu tj., nosioci 4aa genotipa imaju znaajno niže srednje vrednosti NG nego nosioci 4bb i 4ba genotipa. Multivarijantna linearna regresiona analiza sa polom, TM i Apgar skorom kao kovarijatama nije pokazala asocijaciju 4a/4b genotipa sa vrednostima NG kod ispitivane prevremeno ro ene dece.

Rezultati univarijantne analize klini kih faktora rizika izme u ROP i kontrolne grupe pokazuju da su: nedelja gestacije, telesna masa, Apgar skor, perinatalna asfiksija, broj dana na terapiji kiseonikom, mehanska ventilacija, respiratorni distres sindrom, bronhopulmonalna displazija, pneumonija, sepsa, anemija, intraventrikularna hemoragija i nekroticni enterokolitis statistiki znaajno eše ispoljeni u ROP grupi. Primenom multivarijantne regresione analize uo ava se da su nezavisni faktori rizika za razvoj ROP-a: niska nedelja gestacije, niska telesna masa na ro enju, pneumonija, sepsa, intraventrikularna hemoragija i nekroticni enterokolitis.

### C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Uestalost C alela u evropskim populacijama je od 29% do 49%. Najviša uestalost polimorfizma je uo ena u Španiji. Najniže u estalosti su zabeležene u Skandinavskim zemljama. U australijskoj populaciji u estalost C alela je 37,8%. U estalost alela u bela kim van evropskim populacijama je vrlo sli na u estalostima u Evropi. Najniža u estalost je u azijskoj populaciji gde je frekvenc a alela C 21,2% (ALFRED database). Naše istraživanje je pokazalo u estalost C alela 34,8%, što je u skladu sa u estalostima u Evropi. U estalost C alela u ROP grupi je 34,2% , a 35,3% u kontrolnoj grupi.

U estalost CC genotipa u populaciji Kavkazoida (obuhvata sve etike grupe) je 11%, a heterozigota 50%. U razli itim etni kim evropskim grupama u estalost CC genotipa je 30%, a heterozigota 56%. U Italiji u estalost heterozigota je 49%. U populacijama Afrike i Azije predominantan je TT genotip (ALFRED database). U našem istraživanju u estalost CC homozigota je 8,6%, što je približno opisanoj u estalosti kod Kavkazoida.

U estalost 4a alela 4a/4b polimorfizma u intronu 4 u evropskim populacijama je od 10% do 27%. Najniža u estalost polimorfnog alela je u Africi tj.u crna koj populaciji i iznosi 3,5% (ALFRED database). Naše ispitivanje je pokazalo u estalost 4a alela 19,1%. U estalost re eg 4a alela u ROP grupi je 22,3% prema 16,1% u kontrolnoj grupi. Frekvenc a u našem istraživanju je u saglasnosti sa frekvencom dobijenom u Rusiji. Dakle, možemo re i da je u estalost 4a alela u našoj populaciji u skladu sa u estalostima opisanim u okruženju.

U našem ispitivanju u estalost heterozigota polimorfizma 4a/4b je 31% što je u saglasnosti sa opisanim rezultatima u evropskoj populaciji gde se u estalost 4a/4b genotipa kre e od 16% do 34%.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da ne postoje razlike u distribuciji genotipova i alela eNOS T-786C polimorfizma izme u ROP i kontrolne grupe. Ispitivanjem genotipova i alela eNOS 4a/4b polimorfizama uo ena je razlika izme u ROP i kontrolne grupe privremeno ro ene dece, ali ova razlika nije statisti ki zna ajna.

Rusai i sar. na populaciji prevremeno rođene dece sa ROP-om ispitivali su polimorfizme eNOS gena (2008). Dobili su da je učestalost C alela 32% u grupi sa aktivnim oblikom ROP-a koji zahteva terapiju. Učestalost C alela u grupi dece koja nisu tretirana je 33%. Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela T-786C. Učestalost recesivnog 4a alela je 24% u ROP grupi, a učestalost u kontrolnoj grupi je 15%. U ovom radu istakli su da je eNOS 4aa genotip nezavisni faktor rizika za teži stepen ROP-a.

Pri ispitivanju prevremeno rođene dece ženskog pola primećen je razvoj ROP-a koji je zahtevao terapiju po dominantnom modelu (4bb/4ab+4aa). Devojice u ROP grupi su nosioci 4ba i 4aa genotipova od devojica u kontrolnoj grupi. Međutim, logistička regresiona analiza sa polom, nedeljom gestacije, telesnom masom, Apgar skorom i brojem dana na terapiji kiseonikom kao kovarijatama nije pokazala da je 4a alel faktor rizika za razvoj teških formi ROP-a kod devojica.

U skladu sa literaturom u našem istraživanju genotip 4aa je deset puta češće ispoljen u grupi dece sa nedeljom gestacije manjom od 30 u poređenju sa grupom dece veće nedelje gestacije. Nosioци 4aa genotipa eNOS 4a/4b polimorfizma imali su nižu srednju vrednost nedelje gestacije u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Vrednosti nedelje gestacije analizirane po recesivnom modelu su bile značajno niže kod dece sa 4aa genotipom. Uočava se niža telesna masa i Apgar skor, kao i veći broj dana provedenih na terapiji kiseonikom kod dece sa 4aa genotipom u odnosu na ostale grupe genotipova (4bb i 4ba). Multivarijantna linearna regresiona analiza sa polom, telesnom masom i Apgar skorom kao kovarijatama nije pokazala asocijaciju 4a/4b genotipa sa vrednostima nedelje gestacije kod ispitivane prevremeno rođene dece.

U literaturi su navedeni brojni klinički faktori rizika: niska nedelja gestacije, niska telesna masa, perinatalna asfiksija, mehanička ventilacija, broj dana provedenih na terapiji kiseonikom, plućna oboljenja, sepsa, anemija, broj transfuzija, intraventrikularna hemoragija, nekrotični enterokolitis i drugi (Oros A., 2003, Kim T i sar., 2004, Gilbert C i sar., 2005, Darlow B. i sar., 2005, Brown MS i sar., 2006, Pinheiro AM I sar., 2009, Chen

M. I sar., 2011, Enomoto H i sar., 2015). U skladu sa literaturom, a na osnovu multivarijantne analize zaključeno je da su nezavisni faktori rizika za razvoj ROP-a kod prevremeno rođene dece obuhvaćene ovim ispitivanjem niska nedelja gestacije, niska telesna masa, sepsa, pneumonija, intraventrikularna hemoragija i nekrotični enterokolitis.

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

Pantelic J, Varljen T, Maksimovic N, Jekic B, Oros A, Nikolic T, Stefanovic I, Novakovic I and Damnjanovic T. **Analysis of T-786C and 4a/b endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in retinopathy of prematurity.** GENETIKA 2016; 48(3): u štampi.

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

Doktorska disertacija *“Ispitivanje polimorfizama eNOS gena kao faktora rizika za razvoj retinopatije prevremeno rođene dece”* dr Jelice Pantelić, je prvi rad sproveden na populaciji prevremeno rođene dece u našoj sredini. U cilju otkrivanja nasledne predispozicije za teže stadijume retinopatije prematuriteta poseban značaj imaju genetička ispitivanja koja omogućavaju otkrivanje gena odgovornih za razvoj ROP-a. Rano otkrivanje odgovarajućeg genotipa sa predispozicijom za ROP omogućilo bi blagovremenu primenu odgovarajućih terapija. U svetu su genetička istraživanja na polju retinopatije prematuriteta veoma aktuelna. Ovakav pristup je od velikog značaja jer je ROP vodeći uzrok slepila dečije dobi.

Najveći uspeh Nacionalnih instituta u razvijenim zemljama sveta je formiranje baza evidencije premature retinopatije i njenog tretmana. Odnos prema rešavanju premature retinopatije merilo je zdravstvene kulture jedne zemlje i korespondira sa naporima koje ulažemo ka pridruživanju svetskim standardima. Sve do sada navedeno ukazuje da prematura retinopatija nije samo obaveza oftalmologa i porodice već predstavlja obavezu društva u celini.

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 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 klinički i naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Jelice Pantelić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 01.07.2016.

**Članovi Komisije:**

Prof. dr Nataša Cerovac

---

Doc. dr Biljana Jekić

---

Prof. dr Ana Oros

---

**Mentor:**

Prof. dr Ivan Stefanović

---

**Komentor:**

Doc. dr Tatjana Damnjanović

---