

UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
 FAKULTET: PRIRODNO-MATEMATIČKI



РЕПУБЛИКА СРПСКА
 УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
 ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
 Број: 19-2070/17
 Датум: 27.07.2017. год.
 БАЊА ЛУКА

IZVJEŠTAJ

o ocjeni uradene doktorske disertacije

I PODACI O KOMISIJI

- | |
|--|
| <p>1) Nastavno-naučno vijeće Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci je na sjednici održanoj 14.06.2017. godine donijelo Odluku broj 19/3.1524/17 kojom je imenovalo Komisiju za pregled, ocjenu i odbranu doktorske disertacije. Komisija je dobila zadatak da napiše Izvještaj o ocjeni uradene doktorske disertacije „Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociраних са синдромом iritabilnog kolona“, kandidatkinje mr Irine Milovac.</p> <p>2) Komisija:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prof.dr Nataša Golić, predsjednik, Uža naučna oblast: Molekularna genetika i genetičko inženjerstvo; Molekularna mikrobiologija, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd, Srbija. - Prof.dr Lejla Pojskić, mentor, član, Uža naučna oblast: Humana molekularna genetika; Biotehnologija i biosigurnost, Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Univerzitet u Sarajevu. - Prof.dr Stojko Vidović, mentor, član, Uža naučna oblast: Humana genetika; Molekularna biologija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci. <p>1) Navesti datum i organ koji je imenovao komisiju;</p> <p>2) Navesti sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, naučno-nastavnog zvanja, naziva uže naučne oblasti za koju je izabran u zvanje i naziva univerziteta/fakulteta/instituta na kojem je član komisije zaposlen.</p> |
|--|

II PODACI O KANDIDATU

- | |
|--|
| <p>1) Irina, Nedeljko, Milovac</p> <p>2) 17.06.1978. godine, Banja Luka, Bosna i Hercegovina</p> <p>3) Univerzitet u Sarajevu, Prirodno-matematički fakultet, Odsjek za Biologiju, smjer genetika, magistar bioloških nauka</p> <p>4) Prirodno-matematički fakultet, „Analiza uloge hondroitin sulfat proteoglikana tipa 3 (SCPG 3) u biologiji shizofrenije“, Biološke nauke, 17.12.2012. godine</p> <p>5) Biološke nauke</p> <p>6) Postupak za sticanje naučnog stepena doktora nauka je započet 2013. godine, prema odredbama člana 149. Zakona o visokom obrazovanju; Studijski program: Biologija</p> <p>1) Ime, ime jednog roditelja, prezime;</p> <p>2) Datum rođenja, opština, država;</p> <p>3) Naziv univerziteta i fakulteta i naziv studijskog programa akademskih studija II ciklusa, odnosno poslijediplomskih magistarskih studija i stečeno stručno/naučno zvanje;</p> <p>4) Fakultet, naziv magistarske teze, naučna oblast i datum odbrane magistarskog rada;</p> |
|--|

- 5) Naučna oblast iz koje je stečeno naučno zvanje magistra nauka/akademsko zvanje mastera;
6) Godina upisa na doktorske studije i naziv studijskog programa.

III UVODNI DIO OCJENE DOKTORSKE DISERTACIJE

- 1) **"Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociranih sa sindromom iritabilnog kolona"**
- 2) 27.03.2014. godine, Senat Univerziteta u Banjoj Luci (Odluka broj: 02/04-3.995-40/14)
- 3) Poglavlje „UVOD“ je napisano na 34 stranice i sadrži kratak osvrt na kliničke i molekularno-biološke osnove sindroma iritabilnog kolona, probleme dijagnostifikovanja i liječenja. U ovom dijelu dat je veoma detaljan i referentan pregled aktuelne literature iz pripadajuće oblasti. Uvod je koncipiran na način da se vrlo vješto ističu ključni problemi kao opravdanje za molekularno-biološka istraživanja, a samim tim i problem istraživanja ove disertacije.
- Poglavlje „CILJ ISTRAŽIVANJA“ (35. strana) je napisano u formi taksativnog navoda sveukupnog cilja, te pojedinačnih ciljeva disertacije.
- Poglavlje „MATERIJAL I METODE“ (od 36. do 75. stranice) sadrži jasan opis istraživanja po fazama rada, sa podacima o ispitivanoj (statističkoj) populaciji, vrsti, mjestu i načinu sakupljanja bioloških uzoraka i kliničkih i demografskih podataka o ispitanicima, načinu transporta i obradi uzoraka, izolaciji DNK i RNK, kvantitativnoj analizi ekstrakata, PCR, detekciji rezultata genetičkih analiza, metodama statističke obrade i interpretacije rezultata. Etički aspekti su kao važan aspekt savremenih humanih molekularno-genetičkih istraživanja eksperimenta posebno obrazloženi u okviru ovog poglavlja.
- U poglavlju „REZULTATI“ (od 76. do 105. stranice) kandidatkinja je, poštujući principe metodologije prezentovanja rezultata naučno-istraživačkog rada, jasnim jezikom, tabelarno i slikama, pregledno predstavila dobijene rezultate slijedeći logiku provedenog istraživanja. U okviru prvog dijela kandidatkinja je predstavila detaljno rezultate o sakupljenim podacima i uzorcima. U drugom dijelu je predstavila brojnu, starosnu i polnu strukturu ispitivanih grupa, a u trećem dala detaljne podatke vezane za kliničke upinike. U četvrtom dijelu kandidatkinja je dala rezultate genotipizacije ispitivanih polimorfizama, rezultate asocijativne analize, Hardi-Vajnbergovog ekvilibrijuma i P vrijednosti na genotipskom i alelnom nivou, kao i rezultate analize haplotipskih asocijacija metodom regresivne analize haplotipova. U petom dijelu kandidatkinja je predstavila rezultate analize asocijacije varijacija u genskoj ekspresiji sa ispitivanim kliničkim fenotipom, a u šestom rezultate analize korelacija između genetičkih karakteristika ispitivanog oboljenja i kliničkih parametara.
- Rezultati istraživanja su kroz poglavlje „DISKUSIJA“ (od 106. do 119. stranice) dodatno razmatrani i obrazloženi istim redoslijedom kao i u prethodnom poglavlju. Na vrlo vješt način, kandidatkinja je dodatno obrazložila rezultate svoje doktorske disertacije i razmotrila ih u svjetlu dosadašnjih rezultata istraživanja na polju genetike sindroma iritabilnog kolona koristeći visokoreferentne publikacije iz pripadajuće oblasti.
- Poglavlje „ZAKLJUČAK“ (od 120. do 122. stranice) sadrži pravilno izvedene i sistematski izložene najvažnije zaključke ovog istraživanja, uz jasno navođenje

njihovog teorijskog i praktičnog značaja za ispitivano područje.

U poglavlju „LITERATURA“ (od 123. do 133. stranice) je dat pregledan popis ukupno 83 korištene reference i 25 internetskih navoda.

U numeraciju nisu uključeni „REZIME“ i „SUMMARY“, dati na početku rada, poslije naslovnih strana na srpskom i engleskom jeziku, koji na adekvatan način daju proširen sažetak ove doktorske disertacije na srpskom, odnosno engleskom jeziku. Slijede, takođe bez uključivanja u numeraciju, „ZAHVALA“ i „SADRŽAJ“ prije poglavlja „UVOD“, kao i biografija autora i tri Izjave, koje se nalaze na kraju rada poslije poglavlja „LITERATURA“.

- 4) Doktorska disertacija je u potpunosti urađena u skladu sa propozicijama Pravilnika o sadržaju, izgledu i digitalnom repozitorijumu doktorskih disertacija na Univerzitetu u Banjoj Luci. Ova doktorska disertacija sadrži 133 numerisane stranice štampanog teksta, 27 slika, 5 grafikona i 46 tabela. Obuhvata sedam poglavlja: UVOD, CILJ ISTRAŽIVANJA, MATERIJAL I METODE, REZULTATI, DISKUSIJA, ZAKLJUČAK i LITERATURA. Korišteno je 83 referenci i 25 internetska navoda.

1) Naslov doktorske disertacije;

2) Vrijeme i organ koji je prihvatio temu doktorske disertacije

3) Sadržaj doktorske disertacije sa straničenjem;

4) Istaći osnovne podatke o doktorskoj disertaciji: obim, broj tabela, slika, šema, grafikona, broj citirane literature i navesti poglavlja.

IV UVOD I PREGLED LITERATURE

- 1) Sindrom iritabilnog kolona (Irritable Bowel Syndrome – IBS) je funkcionalni poremećaj gastrointestinalnog trakta (GI) okarakterisan bolovima i nelagodnom u stomaku koji je povezan sa defekacijom i poremećajima u defekaciji, kao i sa distenzijom stomaka, a takođe su prisutna i različita psihološka stanja kao što su različiti strahovi, anksioznost, pa čak i depresije. Kriterijumi za uspostavljanje dijagnoze su jasni, ali nisu lako primjenljivi u kliničkoj praksi o čemu govori podatak da više od 40% pacijenata mogu imati simptome i do 5 godina prije uspostavljanja same dijagnoze. U slučaju da ne postoji nikakva fizička, radiološka ili laboratorijska indikacija za neko organsko gastrointestinalno oboljenje, sumnja se na IBS. Sindrom iritabilnog kolona je okarakterisan kao „mozak-crijevo“ poremećaj (brain-gut disorder), a vezuje se sa izmijenjenim fiziološkim procesima kao što su peristaltika crijeva, visceralna preosjetljivost, promjene u imunom odgovoru u sluzokoži crijeva i promjene u crijevnoj mikroflori. Neke epidemiološke studije su pokazale da je u Sjevernoj Americi prevalenca za IBS 3-20% što na godišnjem nivou predstavlja oko 45 miliona oboljelih (Burbige, 2010). Proteklih tridesetak godina dijagnostifikovanje sindroma iritabilnog kolona zasnovano je na pozitivnoj dijagnostici kompatibilnih simptoma, kao i isključivanja organskih bolesti, prvenstveno karcinoma debelog crijeva i Kronove bolesti. Simptomi IBS-a su heterogeni, a mogu da se pojačavaju i/ili jenjavaju tokom vremena. Zabilježen je kormobiditet sa drugim GI oboljenjima i nekim psihološkim stanjima, kao i sa oboljenjima koja uopšte nisu gastrointestinalna. Sindrom iritabilnog kolona negativno utiče na kvalitet života (QOL – Quality of Life) koji se ogleda u smanjenoj produktivnosti u radu i povećanim izostancima sa posla i iz škole, kao i učestalijim korištenjem zdravstvene zaštite, što ima značajne posljedice na

društveno-ekonomski sistem (Henström, 2016). Prema Rim III kriterijumu može se izvršiti subkategorizacija sindroma iritabilnog kolona na IBS-D (dijareja tip), IBS-C (konstipacija tip), IBS-M (miješani tip kao kombinacija dijareje i konstipacije), kao i neimenovani tip IBS-a (IBS-unsubtyped) (Yao, 2012). Funkcionalni gastrointestinalni poremećaji imaju visoku incidencu i prevalencu u opštoj populaciji. Procjenjuje se da je prevalenca za IBS u zemljama zapadne populacije između 8 i 20%. Slična prevalenca je i u Kini, a nešto niža u Tajlandu. Ovo oboljenje češće pogađa žene srednje životne dobi nego muškarce, npr. u Indiji 20-30% žena oboli od IBS-a. U Sjedinjenim Američkim Državama IBS pogađa između 10 i 20% populacije, što ovu državu košta 1.6 biliona dolara direktno i 19.2 biliona dolara indirektno na godišnjem nivou. Većina bolesnika sa IBS-om i ne traži liječničku pomoć što navodi na činjenicu da prevalenca IBS-a može biti veća od one koja se navodi u literaturi. Na prevalencu IBS-a utiču socijalni i kulturološki faktori (Ladabaum, 2012). Za sada ne postoje epidemiološki podaci za IBS u Bosni i Hercegovini i u regionu. Ispitivanja su pokazala da se IBS javlja češće unutar nekih porodica sugerišući tako genetičku komponentu bolesti (Kalantar et al, 2003; Saito, 2011). Bolesnici sa IBS-om prilikom uzimanja anamneze često navode pozitivnu porodičnu istoriju, a studije su pokazale da osobe u čijim porodicama se javlja IBS imaju dva do tri puta veću vjerovatnoću da obole od sindroma iritabilnog kolona od osoba čije porodice nemaju IBS. I dalje je nejasno koji su to sve geni, uz sadejstvo spoljašnjih faktora sredine, asocirani sa sindromom iritabilnog kolona (Saito, 2011). Genotipizacija genetičkih markera, sekvenciranje cjelokupnog ljudskog genoma kao i skladištenje i analiza ovih podataka dovelo je do otkrivanja velikog broja suspektih genskih lokusa za različita GI oboljenja. Ovo je privuklo mnoge da se istraže genski lokusi koji uzrokuju ili barem mogu doprinjeti razvoju IBS-a, iako ovakva istraživanja zahtijevaju mnogo truda, vremena i finansijskih sredstava. Do danas je poznato oko 60 gena kandidata i njihovih specifičnih varijanti identifikovanih na osnovu genotipizacije, a koji se dovode u vezu sa sindromom iritabilnog kolona. Potencijalne lokacije-geni kandidati odabrani su na osnovu uloge proteina koje kodiraju. To su uglavnom oni geni koji stoje u osnovi serotoninskog i adrenergičkog puta, zatim geni odgovorni u inflamatornom procesu i intestinalnoj barijeri, kao i oni koji stoje u osnovi nekih psihotičnih poremećaja (Henström&D'Amato, 2016).

Na osnovu navedenih problema formulisan je predmet istraživanja: genetička osnova sindroma iritabilnog kolona.

Istraživanje koje je sprovedeno je prospektivno, pregledno, fundamentalno i neintervencijsko kliničko istraživanje u skladu sa međunarodnim etičkim kodeksima, a u cilju da se utvrdi:

- Da li postoji značajna razlika u distribuciji alelnih frekvencija odabranih kandidat gena između grupe pacijenata sa IBS-om i kontrolne grupe;
- Da li postoji značajna razlika u distribuciji genotipskih frekvencija odabranih kandidat gena između grupe pacijenata sa IBS-om i kontrolne grupe;
- Da li postoji značajna razlika u distribuciji haplotipskih frekvencija odabranih kandidat gena između grupe pacijenata sa IBS-om i kontrolne grupe.

Hipoteze ovog istraživanja su sljedeće: postoje razlike u distribuciji frekvencija alela, genotipova i haplotipova odabranih kandidat gena između grupe pacijenata i grupe zdravih ispitanika.

- 2) Pretpostavlja se da je kod većine IBS pacijenata genetička pozadina determinisana velikim brojem čestih genetičkih varijanti sa malim efektom. Istovremeno mogu postojati podgrupe pacijenata sa visoko penetrantnim varijantama gena što može i da objasni fenotip podgrupe. Tako je npr. nedavno rađena case-control studija na klinici Mayo gdje je vršeno sekvenciranje SCN5A gena. Studija je pokazala da je identifikovana štetna mutacija prisutna kod 2.2% IBS pacijenata i niti jedna kod zdravih kontrola. Ovaj gen kodira natrijumov kanal odgovoran za elektrostimulatornu funkciju ćelija srca, ali takođe i za sličnu "pacemaker" funkciju kod enterocita. Većina mutacija koje su identifikovane predstavljaju gubitak funkcije natrijumovog kanala, a fenotip koji se javljao u tim slučajevima bio je u glavnom sa dominantnom konstipacijom (IBS-C). Takođe, u četiri nezavisne GWAS-ove studije je utvrđeno da mononukleotidni polimorfizam (SNP) na SCN5A genu povećavaju rizik od IBS-a. Ova istraživanja su ojačala hipotezu da i rijetke mutacije, i populacijski česte varijante mogu biti uključene u genetiku IBS-a. Međutim, do sada su uspjesi u identifikaciji gena determinatora IBS bili rijetki. Imajući u vidu da je genetička podloga za IBS veoma heterogena, od poligenije do rijetkih varijanti jednoga gena, potrebno je usvojiti različiti strategije za identifikaciju genetičkih faktora. Dok većina do sada predloženih riziko-gena predstavlja više nevalorizovane nego zaista dokazane predisponirajuće faktore, za TNFSF15 gen uključen u imuni odgovor i interakciju "domaćin-mikroorganizam", to nije slučaj. Gen TNFSF15 je pokazao visoku asocijaciju sa IBS-om (Zucchelli et al, 2011), koja je zatim i potvrđena u drugim studijama (Swan et al, 2013; Wouters et al, 2014; Czogalla et al, 2015). Ovaj gen kodira protein TL1A koji se nalazi kod imunih ćelija i utiče na zapaljenski odgovor u sluznici crijeva. Nosioci riziko-alela rezultiraju većom ekspresijom TL1A proteina, a samim tim i jačom aktivacijom T ćelija i jačim imunim odgovorom. Povezanost TNFSF15 gena pokazuje da inflamatorni odgovor može biti važan mehanizam kod nastanka IBS-a (Henström&D'Amato, 2016).

Pored studija koje se odnose na genetičke varijante serotoninskog transportera SERT-a, nekoliko studija je proučavalo funkcionalne SNP na genima koji kodiraju serotoninski receptor. Geni koji kodiraju različite vrste receptora su HTR2A, HTR3A, HTR3B, HTR3C i HTR3E. Tri studije su imale pozitivne nalaze, a jedna od tih studija je pokazala da HTR3A -42C>T C/T je učestaliji kod IBS-D pacijenata. Ovaj nalaz, međutim, nije ponovljen u ostalim kohortama. U druge dvije studije tvrdeno je da je sa IBS-D udružen SNP G>A na HTR3E genu, što je zanimljiv nalaz jer je HTR3E receptor zastupljen u tankom i debelom crijevu, i želudcu, a studije in vitro su pokazale da postoji povećana ekspresija 5-HT3E podjedinice što može da ima direktan efekat na funkciju serotoninskog receptora. Fukudo sa saradnicima (2009) je proučavao 386A>C polimorfizam na HTR3B genu i utvrdio da su se razlikovali regioni aktivacije mozga između osoba sa A/A, A/C i C/C genotipom. Saito sa saradnicima (2011) je sproveo sveobuhvatno istraživanje sa preko 20 gena koji su u vezi sa serotoninom kod 968 ispitanika (pacijenti i kontrole) gdje su utvrđene sljedeće

asocijacije: 27 polimorfizama udruženih sa 9 gena za IBS, nekoliko asocijacija sa TDO2, HTR2A i HTR7; 32 snipa na 15 gena za IBS-C sa višestrukim asocijacijama na HTR4 i HTR7; 26 polimorfizama na 7 gena za IBS-D sa višestrukom asocijacijom na HTR2A; 32 udruženja na 9 gena sa višestrukim asocijacijama na TPH2, DDC, TDO2, HTR1E, HTR2A i HTR7. Dakle, postoji nekoliko dokaza da geni koji su uključeni u obradu serotonina imaju važnu ulogu u patofiziologiji IBS-a (Saito et al, 2011).

Epigenetički molekularni mehanizmi koji obuhvataju metilaciju DNK i acetilaciju histona su uključeni u disregulaciju vezanu za stres hipotalamus-hipofiza-adrenalnog puta (HPA - hypothalamic-pituitary-adrenal axis). Posljednje studije su pokazale pojačan odgovor kortizola na visceralni stres kod IBS pacijenata i da traume smanjuju ekspresiju gena za glukokortikoidni receptor hipermetilacijom. Izmijenjena ekspresija ovoga gena, koji inače učestvuje u negativnoj povratnoj sprezi, smanjuje sposobnost HPA da se efikasno bori sa stresom (Vaiopoulou et al. 2014).

Literatura citirana u doktorskoj disertaciji, a navedena u ovom dijelu Izvještaja:

Burbige E.J. (2010). Irritable bowel syndrome: diagnostic approaches in clinical practice. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 127-137. Henström M., D'Amato M. (2016). Genetics of irritable bowel syndrome. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3:7. Yao X., Yang Y.S., Cui L.H., Zhao K.B., Zhang Z.H., Peng L.H., Guo X., Sun G., Shang J., Wang W.F., Feng J., Huang Q. (2012). Subtypes of irritable bowel syndrome on Rome III criteria: A multicenter study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20(4):760-765. Saito Y.A. (2011). The role of genetics in IBS. *Gastroenterol Clin North Am*, 40(1):45-67. Ladabaum U., Boyd E., Zhao W.K., Mannalithara A., Sharabidze A., Singh G., Chung E., Levin T.R. (2012). Diagnosis, Comorbidities and Management of Irritable Bowel Syndrome in Patients in Large Health Maintenance Organization. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10(1):37-45. Kalantar J.S., Locke G.R.3rd, Zinsmeister A.R., Beighley C.M., Talley N.J. (2003). Familial aggregation of irritable bowel syndrome: a prospective study. *Gut*, 52(12):1703-1707. Czogalla B., Schmitteckert S., Houghton L.A., Sayuk G.S., Camilleri M., Olivo-Diaz A., Spiller R., Wouters M.M., Boeckxstaens G., Bermejo J.L., Niesler B. (2015). A meta-analysis of immunogenetic case-control association studies in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*, 27:717-27. Swan C., Drouotier N.P., Campbell E., Zaitoun A., Hastings M., Dukes G.E., Cox J., Kelly F.M., Wilde J., Lemmon M.G., Neal K.R., Whorwell P.J., Hall I.P., Spiller R.C. (2013). Identifying and testing candidate genetic polymorphisms in the irritable bowel syndrome (IBS): association with TNFSF15 and TNFA. *Gut*, 62:985-94. Wouters M.M., Lambrechts D., Knapp M., Cleynen I., Whorwell P., Agréus L., Dlugosz A., Schmidt P.T., Halfvarson J., Simrén M., Ohlsson B., Karling P., Van Wanrooy S., Mondelaers S., Vermeire S., Lindberg G., Spiller R., Dukes G., D'Amato M., Boeckxstaens G. (2014). Genetic variants in CDC42 and NXP1 as susceptibility factors for constipation and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome. *Gut*, 63:1103-11. Vaiopoulou A., Karamanolis G., Psaltopoulou T., Karatzias G., Gazouli M. (2014). Molecular basis of the irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*, 20(2): 376-383.

- 3) Očekivani naučni doprinosi ove disertacije se odnose na upotpunjavanje znanja o ovom etiološki kompleksnom i fenotipski nestabilnom oboljenju. Ova studija predstavlja značajan korak u identifikaciji gena i njihovih alelnih varijanti udruženih sa sindromom iritabilnog kolona, kao i solidnu osnovu za buduća istraživanja na polju ove oblasti.
- 4) Studije kao što je ova su važne, jer zahvaljujući boljem razumijevanju genetičkih i negenetičkih determinanti IBS, možemo doprinijeti boljoj tehnologiji dijagnostike i liječenja IBS-a sa širim socioekonomskim značajem.

- 1) Ukratko istaći razlog zbog kojih su istraživanja preduzeta i predstaviti problem, predmet, ciljeve i hipoteze;
- 2) Na osnovu pregleda literature sažeto prikazati rezultate prethodnih istraživanja u vezi problema koji je istraživani (voditi računa da obuhvata najnovija i najznačajnija saznanja iz te oblasti kod nas i u svijetu);
- 3) Navesti doprinos teze u rješavanju izučavanog predmeta istraživanja;
- 4) Navesti očekivane naučne i pragmatične doprinose disertacije.

V MATERIJAL I METOD RADA

- 1) Predložena doktorska disertacija predstavlja kolaborativni naučnoistraživački projekat između Laboratorije za humanu genetiku Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu i Odjeljenja gastroenterologije i hepatologije na Klinici za unutrašnje bolesti Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske u Banjoj Luci. Prije formiranja eksperimentalne i kontrolne grupe, Etički komitet Univerzitetskog kliničkog centra Republike Srpske (UKC) je bio upoznat sa metodologijom i ciljevima ove doktorske disertacije nakon čega je dokumentom i odobrio njegovu realizaciju. Svi učesnici, pacijenti i zdrave osobe, dobrovoljno su pristupile studiji, te potpisali informisani pristanak, odnosno izjavu o saglasnosti za učešće u studiji. Obrazac sadrži osnovne podatke o vrsti i cilju istraživanja, zaštiti diskrecionog prava učesnika i primjeni rezultata studije. Svaki učesnik je pročitao i svojeručno potpisao informisani pristanak. Obrada svih pacijenata i zdravih kontrola, te prikupljanje uzoraka realizovano je uz pomoć ljekara specijaliste gastroenterologa i hepatologa sa Klinike za unutrašnje bolesti UKC RS i tehničara. Nakon potpisivanja informativnog pristanka, pristupilo se popunjavanju standardizovanih upitnika HAD, PHQ 15, GSRIS-IBS i VSI. Učesnici u studiji su imali dodatno vremena da pažljivo odgovore na pitanja vezana za podatke o kliničkoj slici, psihološkim aspektima kao i subjektivnoj procjeni bolesti i simptoma. Takođe, ljekar specijalista je zajedno sa učesnicima popunio CRF upitnik koji se odnosio na osnovne identifikacione i demografske podatke, te na pitanja koja su se odnosila na personalnu i porodičnu istoriju. Za potrebe ove doktorske disertacije kandidat je u periodu od aprila 2014. do marta 2016. godine zajedno sa stručnim ljearskim timom prikupio podatke i uzorke za ukupno 29 osoba: 20 pacijenata kod kojih je na osnovu Rim III kriterijuma dijagnostifikovan sindrom iritabilnog kolona i 9 zdravih kontrola bez bilo kakvih gastrointestinalnih tegoba. Uzimani su uzorci krvi venpunkcijom kubitalne vene i uzorci biopsije kolona prilikom endoskopije. Iz uzoraka krvi je izolovana DNK i RNK, a iz biopsija RNK kako bi se dalje mogla uraditi analiza genskih varijanti te utvrditi razlika u ekspresiji gena kod pacijenata i zdravih kontrola iz dva različita biološka uzorka. Svi uzorci krvi su prikupljeni u vakutajner u kome se već nalazio antikoagulans K3EDTA. Izolacija genomske DNK je izvršena prema protokolu po Mileru (Miller et al, 1988). Izolacija RNK iz krvi je vršena prema protokolu Quick-RNA™ MiniPrep kiti, koji je namjenjen i dizajniran za brzo, jednostavno i pouzdano izolovanje RNK. Za postupak izolacije RNK iz tkiva (biopsija kolona), korišten je Quick-RNA™ MiniPrep Plus kit. Analiza količine i kvaliteta izolovane DNK izvršena je pomoću elektroforeze na agaroznom gelu (Maniatis et al, 1982). Izvršena je genotipizacija za ukupno 4 genska polimorfizma kao mogućih rizikofaktora za sindrom iritabilnog kolona. Rezultati su izraženi ili numerički u baznim parovima (bp) po

utvrđenoj veličini ciljnog fragmenta ili kao razlika u nukleotidu (tačkasta mutacija), te su prikazani tabelarno. Kod uzoraka za obje ispitivane grupe kod kojih je bilo moguće izvršiti genotipizaciju izračunate su frekvencije alela (Af), frekvencija genotipova (Gf) i Hardy-Vajnbergov ekvilibrijum (HWE) za FKBP5, DRD2, DAT i SRin2, a rezultati su prikazani tabelarno. Takođe, primjenom asocijativne analize ispitivanih gena sa pojavom sindroma iritabilnog kolona (Fisher Exact Test) dobijene su P vrijednosti na genotipskom i alelnom nivou, a u analizi haplotipske asocijacije metodom regresivne analize haplotipova, analizirano je nekoliko kombinacija odabranih polimorfizama. U nastavku studije kandidatkinja je analizirala polimorfizam genske ekspresije. Nakon izolacije RNK izvršeno je određivanje koncentracije RNK uz pomoć Qubit 2.0 Fluorometra, a nakon toga i reverzna transkripcija lančane reakcije polimeraze (RT-PCR) za detekciju informacione RNK iz uzoraka ograničene količine tkiva. Potreba za preciznijom kvantifikacijom iRNK dovela do razvoja nove tehnike nazvane lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. Real-Time Polymerase Chain Reaction, Real-Time PCR) koju je kandidatkinja koristila u ovom radu. Izbor mogućih gena kandidata za analizu ekspresije gena kod sindroma iritabilnog kolona izvršeno je na osnovu detaljnog pregleda opsežne literature iz oblasti genetike gastrointestinalnih oboljenja. U ovom radu analizirani su geni: TNFSF15, P2RY4, VIP, GUCA2B, PDZD3 i NR1H4. Za statističku obradu ekspresije odabranih gena kandidatkinja je koristila novi softverski alat REST, a za analizu korelacija Pearsonov koeficijent u sklopu softverskog programa MedCalc 17.4.4.

- 2) Primijenjene metode istraživanja su adekvatne, dovoljno tačne i savremene uzimajući u obzir dostignuća na ovom polju istraživanja na globalnom nivou. Ispoštovan je plan istraživanja, koji je dat prilikom prijave doktorske teze. Ispitivani parametri daju dovoljno elemenata za pouzdano istraživanje, a statistička obrada podataka je adekvatna.

- 1) Objasniti materijal koji je obrađivan, kriterijume koji su uzeti u obzir za izbor materijala;
- 2) Dati kratak uvid u primijenjeni metod istraživanja pri čemu je važno ocijeniti sljedeće:
 1. Da li su primijenjene metode istraživanja adekvatne, dovoljno tačne i savremene, imajući u vidu dostignuća na tom polju u svjetskim nivoima;
 2. Da li je došlo do promjene u odnosu na plan istraživanja koji je dat prilikom prijave doktorske teze, ako jeste zašto;
 3. Da li ispitivani parametri daju dovoljno elemenata ili je trebalo ispitivati još neke, za pouzdano istraživanje;
 4. Da li je statistička obrada podataka adekvatna.

VI REZULTATI I NAUČNI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

- 1) Na osnovu CRF upitnika dobijeni su osnovni podaci o pacijentima i kontrolama te su dobiveni podaci o ukupnoj zastupljenosti podtipova IBS-a, kao i zastupljenost IBS-a u odnosu na pol. Na osnovu GSRS upitnika dobiveni su podaci o pacijentima i zdravim ispitanicima te su dali subjektivnim procjenama o jačini gastrointestinalnih tegoba u proteklih 7 dana. Na upitnik PHQ-15 koji se odnosi na skalu jačine somatskih simptoma odgovorili su svi ispitanici u obje grupe. Ovim upitnikom su se prikupile dodatne informacije o kliničkoj slici ispitanika i njegovoj subjektivnoj procjeni simptoma. Zahvaljujući VSI upitniku izmjerena je specifična anksioznost pacijenta sa

simptomima koji su u vezi sa gastrointestinalnim senzacijama ili simptomima koji igraju značajnu ulogu kod oboljelih od sindroma iritabilnog kolona. Na HAD upitnik odgovorili su svi učesnici studije na osnovu čega je dobijena procjena anksioznosti i depresije koju pacijent proživljava.

Dobijen je rezultat genotipizacije FKBP5 gena metodom ASA-PCR za FKBP5 gen. Analiza udruženosti nije pokazala statistički značajnu asocijaciju ovoga SNP-a sa pojavom sindroma iritabilnog kolona niti na nivou alelna ($P=0,761$), niti na nivou genotipske asocijacije ($P=0,548$), a genotipske frekvencije analiziranog polimorfizma su se nalazile u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži (HWE 0,0000).

Dobijen je rezultat genotipizacije DRD2 gena metodom PCR-RFLP za detekciju polimorfniha fragmenata kod grupe pacijenata i kontrolne grupe, izračunate su frekvencije alela i genotipova. Genotipske frekvencije analiziranog polimorfizma se nisu nalazile u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži (HWE 0,5120). Analizom asocijacija na nivou alela ($P=0,251$) i genotipova ($P=0,568$) je utvrđeno da nije bilo statistički značajne povezanosti ovog polimorfizma sa pojavom sindroma iritabilnog kolona.

Dobijen je rezultat genotipizacije DAT gena PCR metodom kod grupe pacijenata oboljelih i kontrolne grupe, te su izračunate frekvencije gena i genotipova. Genotipske frekvencije analiziranog polimorfizma pokazale su odstupanje od ravnotežnog stanja (HWE=0,023). Kada je u pitanju asocijativna analiza, pokazalo se da DAT ima jaku statistički signifikantnu udruženost sa sindromom iritabilnog kolona, kako na nivou alela ($P=0,006$), tako i na nivou genotipova ($P=0,031$). Osobe koje imaju 434 alel u svom genotipu imaju 6 puta veću vjerovatnoću da će oboljeti od sindroma iritabilnog kolona od osoba koje nemaju ovu alelnu varijantu u svom genotipu.

Dobijen je rezultat genotipizacije SRint2 gena PCR metodom kod grupe pacijenata i kontrolne grupe, a u uzorcima su uočene tri alelne varijante. Nije uočena asocijacija alela ($P=1$) i genotipova ($P=1$) sa pojavom IBS-a. Frekvencije genotipova su pokazale da se nalaze u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži (HWE 0,0000).

U analizi haplotipskih asocijacija za analizirane polimorfizme napravljeno je nekoliko mogućnosti, gdje je Powermarker softver automatski kreirao nekoliko kombinacija. Dobijeni rezultati pokazuju da kombinacija od dva polimorfizma FKBP5 i DAT1 na granici značajnosti ($P=0,0535$).

Nakon sumiranja svih rezultata dobijenih Real-Time PCR-om, urađena je REST analiza pri čemu su dobijeni rezultati relativne ekspresije odnosa određene grupe uzoraka za gen od interesa nasuprot referentnom genu. U poređenju razlike u ekspresiji gena u krvi pacijenata i kontrola moglo se vidjeti da nije zabilježena statistički značajna razlika u ekspresiji gena između posmatranih grupa. Kod gena je bila primijećena povećana (*up*) regulacija, ali ne na nivou signifikantnosti. U analizi razlike u ekspresiji gena između pacijenata i kontrola u biopsijama, primijećena je smanjena (*down*) ekspresija VIP gena na signifikantnom nivou ($P=0,045$) za 3,102 puta u grupi pacijenata u odnosu na zdrave kontrole.

Kada se poredila razlika u ekspresiji odabranih gena u grupi pacijenata između dva tipa bioloških uzoraka, mogla se uočiti statistički značajna razlika za četiri analizirana gena:

PDZD3 ($P=0,021$), P2RY4 ($P=0,043$), GUCA2B ($P=0,002$) i TNFSF15 ($P=0,001$). Za sva četiri gena bila je povećana ekspresija u biopsijama u odnosu na krv (up regulacija). Takođe je zabilježena povećana ekspresija za NR1H4, a smanjena za VIP, ali ne na signifikantnom nivou. U poređenju razlike u ekspresiji kod grupe zdravih ispitanika između krvi i tkiva, takođe se mogla uočiti povećana ekspresija gena na statistički značajnom nivou za tri gena TNFSF15 ($P=0,001$), VIP ($P=0,018$) i GUCA2B ($P=0,001$). Za P2RY4 je uočena smanjena, a PDZD3 i NR1H4 povećana ekspresija gena u biopsijama u odnosu na krv kod grupe pacijenata, ali ne na signifikantnom nivou.

U analizi korelacije testirana je povezanost između dvije varijable: genetičkih karakteristika sindroma iritabilnog kolona i kliničkih parametara prikupljenih anketiranjem pacijenata pomoću operacionalizovanih kliničkih upitnika. Dobijeni su rezultati koji pokazuju da varijacija u genskoj ekspresiji praćena specifičnom varijacijom u ukupnoj vrijednosti (score) za svaki upitnik.

- 2) Dobijeni rezultati su jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni, poređeni sa rezultatima drugih autora, pri čemu je kandidat ispoljavao dovoljno kritičnosti.
- 3) Sindrom iritabilnog kolona smatra se biopsihosocijalnim poremećajem čija je pojava najčešće posljedica interakcija između više faktora koji uključuju poremećaje motiliteta crijeva, abnormalnosti gastrointestinalne senzacije, različite upale i infekcije crijeva, promjene u aferentnim senzornim informacijama, psihičkih i afektivnih poremećaja. Predloženo je nekoliko modela da se opiše i objasni sindrom iritabilnog kolona, ali svaki od tih modela se fokusira na određene i konkretne aspekte ili mehanizme ovoga poremećaja. U ovoj doktorskoj disertaciji se nastojalo da se predstavite i razmotre različite determinante IBS-a i njegovih simptoma kroz individualni pristup pacijenata i procjenu njegovog psiho-fizičkog statusa, kroz odgovore na kliničke upitnike gdje su ispitanici mogli da daju svoju subjektivnu ocjenu, a zatim i kroz različite genetičke analize, analize udruženosti prema modelu *case-control* studije, analize genske ekspresije u različitim tkivima, i na kraju kroz analize korelacije gdje se nastojalo ispitati da li postoji eventualna povezanost između analiziranih gena i kliničkog fenotipa.

Ovim prospektivnim istraživanjem utvrđeno je da postoji alelna i genotipska asocijacija DAT polimorfizma sa IBS-om, te da osobe koje imaju 434 alel u svom genotipu, imaju 6 puta veću vjerovatnoću da će oboljeti od IBS-a u odnosu na osobe koje nemaju ovu varijantu gena. Sama činjenica da je ovaj nalaz u dosadašnjim istraživanjima jedini koji je udružen sa ovim kliničkim fenotipom, javljaju se moguće ideje u kojem pravcu se treba ići u budućim ispitivanjima. Iako je većina dosadašnjih istraživanja bila usmjerena na serotonin, ovim radom je potvrđeno da dopaminski neurotransmiterski sistem evidentno ima nezanemarljivu ulogu u etiopatologiji IBS-a.

U studijama ekspresije gena kod IBS pacijenata sa dijarejom zabilježena je smanjena ekspresija VIP gena u biopsijama u odnosu na zdrave ispitanike (Camilleri et al, 2014), a u ovome radu je takođe zabilježena smanjena ekspresija VIP gena (negativna deregulacija) u biopsijama pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike. U poređenju ekspresije gena u istoj grupi ali različitim tkivima, zabilježena je povećana ekspresija ovoga gena u biopsijama kod zdravih ispitanika što sugerise na protektivnu ulogu VIP-

a u eliminaciji pro-IBS faktora rizika. VIP je od nedavno prepoznat i kao obećavajuća farmakoterapijska meta zbog njegove uloge u olakšavanju ukupne pokretljivosti crijeva i snažan je relaksant mišića crijeva.

Jedna od najvećih poteškoća prilikom dijagnostifikovanja i liječenja sindroma iritabilnog kolona je svakako njegov izrazito heterogeni fenotip kao i sama multifaktorska priroda oboljenja. Analizama korelacije je dokazano da postoji povezanost između varijacije u ekspresiji gena u različitim tkivima i determinisanih kliničkih fenotipova sa dijagnozom za svakog pacijenta posebno.

- 1) Ukratko navesti rezultate do kojih je kandidat došao;
- 2) Ocijeniti da li su dobijeni rezultati jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni, upoređujući sa rezultatima drugih autora i da li je kandidat pri tome ispoljavao dovoljno kritičnosti;
- 3) Posebno je važno istaći do kojih novih saznanja se došlo u istraživanju, koji je njihov teorijski i praktični doprinos, kao i koji novi istraživački zadaci se na osnovu njih mogu utvrditi ili nazirati.

VII ZAKLJUČAK I PRIJEDLOG

- 1) Sindrom iritabilnog kolona je veoma često oboljenje sa neupitnom genetičkom osnovom. Dokazano je da agregira u porodicama i utiče na višestruke generacije, te da osobe, u čijim porodicama se javlja bar jedan srodnik koji je obolio od IBS-a, imaju 2-3 puta veću vjerovatnoću (bez obzira na pol) da će i sami oboljeti od iritabilnog kolona. Distribucija ovog poremećaja ukazuje na to da se oboljenje ne nasljeđuje po klasičnim mendelovim pravilima i da je riječ o kompleksnom svojstvu sa nepredvidivim obrascem nasljeđivanja i veoma značajnim učestvom negenetičkih sredinskih faktora. Za mnoge bolesti "modernog čovjeka" kao što su hipertenzija, karcinom, dijabetes, gojaznost, autizam i neke psihoze, se smatra da su kompleksna oboljenja, te su predmet stalnog izučavanja genetičara i biomedicinskih autoriteta. I pored toga što je identifikovano nekoliko jako važnih genskih markera, jasno je da geni sami po sebi ne mogu dovesti do ispoljavanja same bolesti, te da su u uskoj vezi sa negenetičkim faktorima kao što su pušenje, ishrana, izloženost infekcijama i sastav bakterijske mikrobiote u gastrointestinalnom traktu. Model "gen-sredina" svakako može biti predložena i za IBS, gdje genetički i sredinski faktori zajedno rezultiraju promjenama u fenotipu. Genetička varijacija u genima koji kodiraju proteine za različite biološke procese, kontrolišu ili moduliraju senzacije i motilitet crijeva, ili čak regulišu odgovor mozga na stres, prvi su geni kandidati za IBS. Oni, u interakciji sa faktorima sredine kao što su ishrana, infekcije, trauma i stres, vjerovatno su odgovorni za kompletan IBS fenotip. Klinička heterogenost IBS-a može da se objasni različitim specifičnim kombinacijama gena uz sadejstvo pomenutih faktora sredine.

Ova studija predstavlja važan korak ne samo u identifikaciji odgovornih gena i njihovih alelnih varijanti za sindrom iritabilnog kolona, već i za potpunije razumijevanje ovog fenomenološki heterogenog, fenotipski nestabilnog i etiološki kompleksnog oboljenja. Kad su u pitanju ishodi istraživanja, ova doktorska disertacija predstavlja značajan doprinos razvoju naučnih oblasti biomedicinskih nauka.

2) Na osnovu izloženih činjenica, u generalnom zaključku, Komisija ocjenjuje da **mr. Irina Milovac** ispunjava sve propisane uslove za konačnu realizaciju doktorske disertacije i da ova doktorska disertacija pod nazivom: „**Identifikacija i karakterizacija genetičkih polimorfizama asociiranih sa sindromom iritabilnog kolona**“ predstavlja originalno i relevantno naučno istraživanje u pripadajućoj oblasti bioloških nauka, te predlaže Nastavno-naučnom vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta i Senatu Univerziteta u Banjoj Luci da odobri odbranu iste.

1) Navesti najznačajnije činjenice što tezi daje naučnu vrijednost, ako iste postoje dati pozitivnu vrijednost samoj tezi;

2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije komisija predlaže:

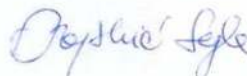
- da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana,
- da se doktorska disertacija vraća kandidatu na doradu (da se dopuni ili izmijeni) ili
- da se doktorska disertacija odbija.

POTPIS ČLANOVA KOMISIJE

1. **Prof.dr Nataša Golić, predsjednik**



2. **Prof.dr Lejla Pojskić, mentor, član**



3. **Prof.dr Stojko Vidović, mentor, član**



Beograd, Sarajevo, Banja Luka; 25.07.2017.

IZDVOJENO MIŠLJENJE: Član komisije koji ne želi da potpiše izvještaj jer se ne slaže sa mišljenjem većine članova komisije, dužan je da unese u izvještaj obrazloženje, odnosno razlog zbog kojih ne želi da potpiše izvještaj.