

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
ИЗБОРНОМ ВЕЋУ**

**ПРЕДМЕТ:
ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

На седници Изборног већа Медицинског факултета у Крагујевцу, одржаној дана 02.06. 2010. године, одлуком број 01-3722/4-21 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом "Повезаност полиморфизма гена за цитокине и локалног имунског одговора у дјеце склоне ка акутном отитису медиа" кандидата др Оливере Миљановић, специјалисте педијатрије и клиничке генетике, асистента за ужу научну област Педијатрија, Медицинског факултета Универзитета Црне Горе, у следећем саставу:

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Небојша Арсенијевић, председник
Редовни професор за уже научне области
Микробиологија и имунологија и Основи онкологије,
Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу

Проф. др Данило Војводић, члан
Ванредни професор за ужу научну област
Клиничка имунологија,
Војномедицинска академија Београд

Проф. др Љиљана Ердевички, члан
Ванредни професор за ужу научну област
Оториноларингологија,
Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију др Оливере Миљановић и подноси Изборном већу следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ

Др **Оливера Миљановић**, специјалиста педијатрије и клиничке генетике, асистент на предмету Педијатрија Медицинског факултета Универзитета Црне Горе, рођена је 25.10.1960. године у Подгорици. Основну школу и гимназију завршила је у родном граду. Медицински факултет завршила је на Медицинском факултету у Београду (1979-1985.година). Специјализацију из педијатрије завршила је са «одликом» на Медицинском факултету Универзитета у Београду 1993. Последипломске студије из медицинске генетике др Миљановић је завршила на Медицинском факултету Универзитета у Загребу, а магистарски рад под насловом «Повезаност минор и мајор малформација са психомоторном ретардацијом у хендикепираних особа», одбранила је на Медицинском факултету Универзитета у Београду, 1998. године. Ужу специјализацију из клиничке генетике завршила је са одличном оценом и одбранила рад под насловом «Заступљеност хромозомских аберација код новорођенчади са конгениталним аномалијама» 2006. године.

Најзначајнија кретања у стручном и научном раду др Миљановић карактеришу: рад на Дјечјој клиници у Подгорици од 1986, специјализацију из педијатрије завршава 1993, када оснива прво Генетско савјетовалиште у Црној Гори. Оснивач је и садашњи руководилац Центра за медицинску генетику и имунологију КЦ ЦГ, који постоји од 2000. године. Од 2001. године ангажована је као асистент из уже области Педијатрија на Медицинском факултету, Универзитета Црне Горе. У периоду од 1999. до 2005. године руководи Институтом за болести дјече КЦ ЦГ, а од 2007. године директор је Клиничког центра Црне Горе.

Стручни и научни рад др Миљановић усмјерен је на област медицинске и клиничке генетике и имунологије, чије је савремене концепте увела у свакодневну стручну праксу и истраживачки рад у Црној Гори. Бави се изучавањем конгениталних аномалија код новорођенчади и дјече, херeditарним оптерећењима ризичних породица и трудноћа, утицајем херeditарних оптерећења и наследних оболјења на потомство. Последних година заједно са сарадницима у Центру за медицинску генетику и имунологију изучава утицај херeditета на мултифакторске, полигено-адитивне болести и склоности (изоловане конгениталне аномалије, склоност инфекцијама, неонатална херeditарна оптерећења исл).

Др Миљановић се у области генетике усавршавала кроз бројне студијске боравке и учешће у међународним школама међу којима се издвајају: школе ТИОРЦАС пројекта: “Технике молекуларне генетике у анализи патогених мутација код генетских болести” и “Молекуларна - генетска основа канцера”, Универзитет Цампобасо, Италија, 2007; школа ТИОРЦАС пројекат школа “Биохемија и молекуларна биологија у хуманој медицини”, Предавачи са Универзитета Цампобасо у Италији, Подгорица 2006; студијски боравак на Оеенс Универзитету, Канада; Цоцхран Биотецхнологиу Сциенце

траининг (биотехнологија генетски модификованих организама) – УСДА Вашингтон, 2001; Студијски боравак на Медицинском факултету Универзитета у Барију, Италија - Институт за медицинску генетику 2000.

Др Миљановић је била активни учесник, а више пута и предавач по позиву, на бројним међународним и регионалним симпозијумима и конгресима посвећеним разноврсној тематици у области Клиничке и медицинске генетике и Педијатрије. До сада је као први аутор објавила 9 радова у периодици преко 10 у суплементима, а као коаутор појављује се у 13 радова. Аутор је 4 поглавља у три публикације, од којих је 3 једној публикацији главни уредних. Имала је преко 25 саопштења на конгресима у земљи и иностранству, а у преко 30 саопштења појављује се као коаутор.

На Медицинском институту Универзитета Црне Горе била је главни истраживач у три истраживачка пројекта из области генетике ("Генетичка истраживања становништва Црне Горе"; "Клиничка и цитогенетичка истраживања особа и породица оптерећених наслеђем"; "Генетички и други фактори ризика у појави слијепила и слабовидости у популацији Црне Горе") у периоду од 1988 до 1999. године, односно до увода на Института након отварања Медицинског факултета у Подгорици.

Од 2009. године др Миљановић је студент Докторских академских студија - изборно подручје Клиничка генетика, имунологија, педијатрија, Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу.

Поседује активно знање и вештине енглеског језика.

Б. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

1. Vojvodić D, Miljanović O, Đurđević D, Francuski J, Gatarić S, Stanojević I, Obradović D, Šubatović M, Filipović N. Effects of different anaesthetics agents on GM-CSF, MCP1, IL1 alpha and TNF alpha levels in rat sepsis model. Acta Veterinaria, prihvaćen za štampu 19. maja 2010. (M23 3 бода, SCI).
2. Perić A, Vojvodić D, Radulović V, Vukomanović-Djurcević B, Miljanović O. Correlation between cytokine levels in nasal fluid and eosinophil counts in nasal polyp tissue in asthmatic and nonasthmatic patients" Prihvacen za štampu u Allergologia et Immunopathologia pod sifrom: (Ref.AI-D-10-00026R1) (Medline)
3. Peric A, Vojvodic D, Radulovic V, Miljanovic O. Cytokine levels in nasal secretions in asthmatic and nonasthmatic patient with nasal polyposis. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg. 2010; 20 (3): 111-117. (Medline)

Укупан број бодова: 3

Ц. ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Одобрени циљеви истраживања и постављени циљеви у раду остали су у највећој мери исти. Примењена методологија истраживања идентична је са одобреном.

Докторска дисертација кандидата др Оливере Миљановић, написана на 179 страница, садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви рада, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључак и Литература. Рад садржи 84 табеле, 30 графика, 7 слике, а у поглављу „Литература“ цитирано је 358 библиографских јединица из домаћих и иностраних стручних публикација.

У **уводном делу** и теоретском разматрању, кандидат је концизно и јасно, користећи најсавременије литературне податке, изложио актуелна сазнања о патогенетским механизмима акутног упале средњег уха (АОМ) указујући на комплексну патогенезу обољења. У том смислу кандидат је приказао најновија сазнања која указују на интеракцију фактора спољашње средине (неправилна исхрана, атопијска конституција, изложеност дуванском диму, учестале респираторне инфекције, боравак у дечјем колективу), микроорганизама и генетске конституције у развоју склоности акутној упали уха. Из изнетог се јасно указује да је за разумевање разлога због којих нека од деце која су изложена дејству истих фактора ризика развијају склоност АОМ, а друга не, неопходно укључити изучавање гена који су повезани са имунским одговором на инфекцију (гени за цитокине).

У следећем поглављу јасно су изложени **циљеви** истраживања обухваћени овом тезом. Општи циљ истраживања се односио на утврђивање постојања повезаности полиморфизама на нивоу једног нуклеотида (СНПс) у генима за цитокине (ИЛ2, ИЛ6, ИЛ10, ТНФалфа) и у гену за ЦД14 са настанком склоности АОМ код деце узраста до седме године. Да би постигао задати циљ кандидат је поставио и неколико додатних циљева који су се односили: на повезаност изложености деце факторима ризика са развијањем склоности АОМ; повезаност животне доби у којој се испољила склоност АОМ са факторима ризика и полиморфизмима гена. Такође, кандидат је за циљ поставио и мерење детектабилност и концентрације цитокина (ИЛ12, ИФНгама, ИЛ2, ИЛ4, ИЛ5, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ10, ИЛ1бета, ТНФалфа, ТНФбета) у носном секрету деце склоне АОМ и контролне групе. На крају циљ је био да се испита у којој мери међусобна повезаност испитиваних фактора утиче на развој склоности АОМ

Материјал и методологија рада су адекватно и прецизно презентовани. У студију (комбинована клиничко-експериментална студија пресека) је укључено 143 деце, узраста од прве до 15. године, која су лечена на Дјечјој хируршкој клиници Института за болести дјече-КЦЦГ. Склоност АОМ (испуњен један или више критеријума за склоност АОМ) је имало 58 деце, док је 85 деце сврстано у контролну групу (узраста од седам до 15 година, која нису испољила ниједан критеријум за склоност АОМ). Испитаници АОМ групе подељени су у две подгрупе, у зависности од узраста у коме су испунили критеријум за склоност АОМ: а) *М-АОМ група*- 27 деце оба пола која су до навршене друге године испунила критеријуме за склоност АОМ и б) *В-АОМ група*-31 дете код којег је склоност АОМ испољена у узрасту од друге до седме године. За

одабир испитаника дизајниран је упитник који је, као и саму студију и информисани пристанак за родитеље, предходно одобрио етички комитет КЦЦГ. Код испитаника обе групе регистровано је присуство шест фактора ризика који погодују развоју склоности АОМ: а) *предиспонирајући (унутрашњи) фактори ризика*: породична склоност АОМ и присуство атопијских манифестација; б) *провоцирајући (спољашњи) фактори ризика*: учестале акутне респираторне инфекције, дневни боравак у дечјем колективу, пасивна изложеност дуванском диму и неправилна исхрана у дојеначком периоду. У супернатанту носног секрета одређивана је детектабилност и концентрација следећих цитокина: IFN γ , IL1b, IL2, IL4, IL6, IL6, IL8, IL10, IL12, TNF α , TNF β комерцијалним цитофлуорометријским тестом (Bender Medsystems flowcytomix multiplex test kit, BMS 810 FF, USA) на проточном цитофлуориметру (Bekman Coulter XL-MCL). Геномска ДНК изолована је из узорка периферне крви пацијената којој је додат антикоагуланс. За изолацију ДНК коришћен је апарат ABI Prism 6100 (Applied Biosystems, UK). Полиморфизам нуклеотидне секвенце (SNP) гена за цитокине IL-10₃₅₇₅ IL-10₁₀₈₂, TNF- α ₃₀₈, IL-6₅₉₇ и IL-2_{EX2} одређиван је есејом алелске дискриминације (Allelic Discrimination), употребом ``TaqMan predesigned Genotyping SNP assay`` на Applied Biosystems 7500 Real-Time Fast апарату. Полиморфизам гена за CD14₋₁₅₉ је одређиван PCR- RFLP методом коришћењем рестрикционе ендонуклеазе *Hae III*. За статистичку обраду података коришћене су методе дескриптивне и аналитичке статистике.

Резултати истраживања су систематично приказани и добро документовани табелама, графицима и сликама. Добијени резултати указују на значајну улогу фактора ризика (пре свега неправилне исхране, боравка у дечјем колективу и изложености дуванском диму) на развој склоности АОМ, нарочито у групи В-АОМ деце. Концентрације свих испитиваних цитокина биле су ниже у узорцима деце контролне групе, у односу на испитанике АОМ групе свих узраста. У групи деце са присутним унутрашњим факторима ризика, вредности испитиваних цитокина биле веће у узорцима АОМ групе у односу на контролну. Код деце са присутним спољним факторима ризика, са наследном склоности АОМ, вредности IL6 и IL12 биле су значајно веће у контролној у односу на све испитиване група. Испитивањем полиморфизама гена кандидат је указао да је код деце склоне АОМ, када се упоређују са контролном групом, значајно мање детектован генотип ГГ IL10₋₁₀₈₂ у односу на генотипове ГА+АА. У групи деце склоне АОМ мушког пола чешће се детектује генотип ГГ у односу на контроле. У групи деце без породичне склоности АОМ, у односу на контролну групу деце која такође немају регистровану породичну склоност АОМ знатно ређе се детектује ГГ генотип на позицији -1082 IL 10-гена, док је код деце која су правилно храњена у дојеначком периоду знатно ређе детектован у односу на контролну групу указујући на значај високопродуктивног генотипа IL10 на развој склоности АОМ. Испитивањем дистрибуције осталих генотипова између деце склоне АОМ и контролне групе нису уочене статистички значајне разлике.

У поглављу „Дискусија“, кандидат детаљно објашњава резултате свог истраживања и пореди их са литературним подацима других аутора из ове области, истовремено указујући на велику разноликост ставова различитих истраживачких група у вези са тематиком спроведеног клиничко/експерименталног истраживања и недоумице повезане са наследном компонентом склоности АОМ, са посебним освртом на улогу полиморфизама гена за цитокине који су значајни медијатори запаљенске

реакције. Презентован је критички коментар сопствених резултата уз детаљно тумачење проистеклих сазнања о значају испитиваних фактора ризика, полиморфизма гена на продукцију цитокина и о локалним имунорегулаторним механизмима на настанак склоности АОМ.

На основу добијених резултата и њихове дискусије, кандидат изводи више **закључака**:

1. Посматрајући узраст у коме се испољила склоност АОМ, уочана је бимодална дистрибуција са првим максимумом у прве две године живота и другим у петој и шестој години живота.
2. Најчешће заступљена три фактора ризика у свим испитиваним групама (АОМ група, млађа и старија АОМ група и контролна група) били су: дневни боравак у дечјем колективу, пасивна изложеност дуванском диму и неправилна исхрана у дојеначком периоду
3. Иако овим истраживањем није потврђена повезаност неправилне исхране и развоја склоности АОМ, када се посматрају разлике између деце склоне АОМ и контролне групе, значај овог фактора ризика уочава се у групи деце склоне АОМ узрастне доби преко две године. Међутим, још значајни налаз коначаног модела логистичке регресионе анализе, такође је указао само на значај неправилне исхране као фактор ризика у односу на све испитиване параметре (фактори ризика и полиморфизми гена).
4. Резултати детектабилности показивали су потпуно различите профиле цитокина у узорцима испитиваних група. У узорцима АОМ групе значајно су се више детектовани IL 6 и IL 5.
5. Код деце са присутним унутрашњим факторима ризика, са наследном склоности АОМ, детектабилност IL 2, IL 10 и TNF α (TH0/TH1 профил) била је значајно чешћа у АОМ групи.
6. Код деце са испољеним атопијским манифестацијама у АОМ групи значајно је била већа детектабилност инфламаторних (IL 6, IL 1 β и TNF β), а значајно мања тзв. TH1 (IFN γ , IL 2, TNF α) цитокина у односу на контролну групу.
7. Код деце са присутним спољним факторима ризика, како код деце са понављаним респираторним инфекцијама, тако и код деце која су боравила у колективу и била изложена дуванском диму, детектује се сличан образац детектабилности, где су знајно више детектабилни IL 6, IL 5 и TNF β а значајно мање детектабилни цитокини TH1 групе, IL 2, IFN γ и /или IL 12 у односу на контролну групу.
8. Изучавањем дистрибуције генотипова и фреквенција алела између оболеле и здраве деце показано је да значајан фактор ризика за склоност АОМ представља ГГ генотип у гену IL10-1082 (Г→А), док остали полиморфизми испољавају свој ефекат у тек у садејству са испитиваним факторима ризика.

ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену завршене докторске дисертације "Повезаност полиморфизма гена за цитокине и локалног имунског одговора у дјеце склоне акутном отитису медиа" кандидата др Оливере Миљановић сматра да је истраживање у оквиру тезе адекватно постављено и спроведено, да су резултати одговарајуће обрађени, а изведени закључци валидни.

Ова докторска дисертација представља оригинални научни допринос у разјашњавању улоге спољашњих и унутрашњих фактора ризика, локалне продукције цитокина и полиморфизама у генима за цитокине у настанку склоности АОМ у испитиваној популацији деце у Црној Гори.

Комисија са задовољством предлаже Изборном већу Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација "Повезаност полиморфизма гена за цитокине и локалног имунског одговора у дјеце склоне акутном отитису медиа" кандидата др Оливере Миљановић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Проф. др Небојша Арсенијевић, председник
Редовни професор за уже научне области
Микробиологија и имунологија и Основи онкологије,
Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу

Проф. др Данило Војводић, члан
Ванредни професор за ужу научну област
Клиничка имунологија,
Војномедицинска академија Београд

Проф. др Љиљана Ердевички, члан
Ванредни професор за ужу научну област
Оториноларингологија,
Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу

11.06.2010. године

