

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-720/34 од 13.07.2016. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Ивана Радосављевића** под називом:

„Утицај полиморфизма гена за панкреасне протеине и факторе некрозе тумора на ток акутног панкреатитиса”.

Чланови комисије су:

1. **Проф. др Слободан Јанковић**, редовни професор Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија и токсикологија и Клиничка фармакологија, председник
2. **Проф. др Јасна Јевђић**, ванредни професор Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
3. **Проф. др Александар Карамарковић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хирургија, члан

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Др Иван Радосављевић рођен је 23.02.1980. године. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу завршио је 2006. године са просечном оценом 9,80, при чему је школске 2004./2005. године био изабран за најбољег студента Универзитета у Крагујевцу. Докторске академске студије, смер Клиничка и експериментална хирургија, уписао је на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу 2007. године, а усмени докторски испит положио са оценом 10. Запослен је на Клиници за хирургију Клиничког центра Крагујевац и у звању истраживача сарадника за ужу научну област Хирургија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске тезе

Наслов:

Утицај полиморфизма гена за панкреасне протеине и факторе некрозе тумора на ток акутног панкреатитиса

Предмет:

Ова студија има за циљ да утврди повезаност најзначајнијих варијација гена који кодирају катјонски трипсиноген, инхибитор панкреасног трипсина, трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе и факторе некрозе тумора α и β са настанком компликација или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.

Хипотезе:

1. Варијације гена који кодира катјонски трипсиноген (енгл. cationic trypsinogen, PRSS1) повезане су са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.
2. Варијације гена који кодира инхибитор панкреасног трипсина (енгл. pancreatic secretory trypsin inhibitor, serine protease inhibitor Kazal type 1, SPINK1) повезане су са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.
3. Варијације гена који кодира трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе (енгл. cystic fibrosis conductance regulator, CFTR) повезане су са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.
4. Варијације гена који кодира фактор некрозе тумора α (енгл. tumor necrosis factor- α , TNF- α) повезане су са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.
5. Варијације гена који кодира фактор некрозе тумора β (енгл. tumor necrosis factor- β , TNF- β) повезане су са настанком компликација и/или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини на једном од водећих светских језика у научном часопису категорије M52 у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву теме докторске дисертације.

1. **Radosavljevic I**, Milojevic A, Miljkovic J, Divjak A, Jelic I, Artinovic V, Spasic M, Stojanovic B, Canovic P, Jankovic S, Djordjevic N. Lack Of PRSS1 And SPINK1 Polymorphisms In Serbian Acute Pancreatitis Patients. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2015; 16 (3): 201-206.

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Тежину клиничке слике акутног панкреатитиса у највећој мери одређује активност панкреасних протеина који врше аутодигестију панкреаса и медијатори запаљења који управљају инфламаторним одговором. Неке од њих кодирају полиморфни гени, а досадашња истраживања указала су на то да присуство или одсуство њихових одређених генетских варијација може представљати фактор ризика за развој теже клиничке слике и неповољан исход. За сада се зна да су гени који кодирају панкреасне протеине PRSS1, SPINK1 и CFTR и факторе некрозе тумора TNF- α и TNF- β полиморфни, а неки од њихових генетских варијација доведени су у везу са панкреатитисом. Међутим, највећи број досадашњих истраживања на ову тему није се тицао акутног, већ других облика панкреатитиса, и истраживао је ризик од развоја обољења, а не ток и исход. Са друге стране, студије које су се бавиле акутним панкреатитисом врло често резултирала опречним закључцима. Због наведеног, сазнања о утицају генетског полиморфизма панкреасних протеина и фактора некрозе тумора на ток и исход акутног панкреатитиса још увек су непотпуна.

2.5. Значај и циљ истраживања

Циљ предложене студије је утврђивање повезаности најзначајнијих варијација гена који кодирају катјонски трипсиноген, инхибитор панкреасног трипсина, трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе и факторе некрозе тумора α и β са настанком компликација или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом.

Значај предложене студије огледа се у њеном потенцијалу да укаже на повезаност између генотипа и клиничке слике акутног панкреатитиса и тиме промовише генотипизацију као дијагностичку и прогностичку методу избора у акутном панкреатитису и рани маркер тежине очекиване клиничке слике.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Акутни панкреатитис настаје као резултат отказивања физиолошких заштитних механизма и активације протеолитичких проензима унутар панкреаса, у чему значајну улогу игра велики број различитих ензима и цитокина (*Kanth R et al . World J Gastrointest Pathophysiol. 2014; 5(4): 427-437*). PRSS1 је најзаступљенија изоформа најзначајнијег панкреасног проензима трипсиногена. Ген који кодира катјонски трипсиноген је полиморфан, а у најзначајније варијације спадају 365G>A, који трипсин чини отпорним на аутолизу и трајно активним, и 86A>T, који отежава инхибицију трипсина (*Patel M. Ther Adv Gastroenterol.2013; 6(2) 169–179*). SPINK1 спречава прерану активацију трипсиногена и последичну панкреасну аутодигестију. Најзначајнија варијација кодирајућег гена је 101A>G, а њено присуство повећава ризик од настанка панкреатитиса, нарочито у комбинацији са другим генетским и/или негенетским факторима ризика (*Koziel D. BMC Gastroenterology.2015; 15:70. doi:10.1186/s12876-015-0302-6*). CFTR омогућава секрецију бикарбоната те побољшава проток панкреасног сока. До данас је познато преко 1200 различитих варијанти гена који кодира CFTR, а у најзначајније се убрајају 1408G>A, 350G>A, 1522_1524delTTT и интронска варијација 5T, за које се сматра да могу утицати

на количину функционалног протеина CFTR, као и на ток панкреатитиса (Kanth R et al . *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014; 5(4): 427-437; Rawad M. *Curr Opin Gastroenterol.*2013; 29:544–551; Koziel D. *BMC Gastroenterology.*2015; 15:70. doi:10.1186/s12876-015-0302-6). TNF- α се у току тешког акутног панкреатитиса продукује у многим органима и његов ниво корелира са тежином клиничке слике. Ген који га кодира је полиморфан, а нека досадашња истраживања (Zhang D, et al. *J Surg Res.*2003;112(2):138-43; Yan-Wei Yin. *Journal of surgical research.* 2012; 178: 409-414.), али не сва (Ozhan G. *Mediators Inflamm.* 2010:482950 . DOI:10.1155/2010/482950), указала су на могућу повезаност полиморфизама -308G>A и -238A>G са тежином клиничке слике панкреатитиса. TNF- β испољава сличне ефекте као TNF- α , а варијација кодирајућег гена NcoI заступљенија је код пацијената оболелих од акутног панкреатитиса праћеног септичним шоком (Zhang D, et al. *J Surg Res.* 2003;112(2):138-43).

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

У питању је ретроспективна студија типа случај-контрола.

2.7.2. Популација која се истражује

Популација из које се узимају и случајеви и контроле су пацијенти лечени од акутног панкреатитиса у Јединици интензивног лечења, Клиници за хирургију и Ургентном центру Клиничког центра Крагујевац у периоду од најмање 2 године. За укључивање у студију пацијенти треба да задовоље све критеријуме за укључивање, и то: потврђена дијагноза акутног панкреатитиса и хоспитализација у Јединици интензивног лечења, на Клиници за хирургију или у Ургентном центру Клиничког центра Крагујевац. Пацијенти се не укључују у студију уколико задовоље макар један од критеријума за искључивање, и то: млађи од 16 година, пацијенти са постоперативним акутним панкреатитисом, труднице и пацијенти преведени из других установа у Клинички центар Крагујевац касније од 48 сати од почетка болести.

2.7.3 Узорковање

Из студијске популације се као случајеви бирају сви хоспитализовани пацијенти са акутним панкреатитисом код којих је дошло до некрозе панкреаса, инфекције некрозе, псеудоцисте или смртог исхода. За сваки случај се из преосталих чланова студијске популације бирају пацијенти истог пола и сличне старости (\pm 1 година). Од изабраних пацијената истог пола и сличне старости биће случајно изабране контроле коришћењем RANDBETWEEN функције Microsoft Office Excel-а.

2.7.4. Варијабле које се мере у студији

Као независне варијабле прате варијације гена који кодирају катјонски трипсиноген, инхибитор панкреасног трипсина, трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе и факторе некрозе тумора α и β , и то: 1) PRSS1: 365G>A (rs77914057), 86A>T (rs111033566); 2) SPINK1: 101A>G (rs17107315); 3) CFTR: 1408G>A (rs213950), IVS8-5T (rs73715573/rs10229820), 350G>A (rs78655421); 4) TNF- α : -238G>A (rs361525), -308G>A (rs1800629); 5) TNF- β : NcoI, као и остали фактори који могу утицати на ток и исход акутног панкреатитиса, и то: 1) старост пацијента; 2) пол пацијента; 3) коморбидитет, тј. врста акутне или хроничне болести која прати панкреатитис; 4) примена лекова – врста и доза лека, пут примене и дужина примене; 5) пушење; 6) уношење алкохола - врста, количина и учесталост; 7) уношење кафе – дневна количина, колико дуго. Као зависне варијабле прате се показатељи тока и исхода акутног панкреатитиса, и то: 1) вредности APACHEII скорa (у првих 48 сати од пријема); 2) смртни исход; 3) некроза панкреаса; 4) инфекција некрозе; 5) псеудоциста панкреаса; 6) вредности рутинских хематолошких тестова 7) вредности рутинских биохемијских тестова.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка процењена је на основу публикације Zhang *et al.* (Zhang D, *et al.* *J Surg Res.* 2003;112(2):138-43) о утицају варијација гена који кодира фактор некрозе тумора α са развојем тешког акутног панкреатитиса и последичног септичног шока. Ова студија је на узорку од 102 болесника са акутним панкреатитисом показала да је генотип TNF- α који укључује полиморфизам на позицији -308 заступљенији код оних код којих се развио септични шок у односу на болеснике без септичног шока (53,1% наспрам 20%). Употребом статистичког програма G*Power за Фишеров тест, уз прихваћене вредности вероватноће грешке првог типа $\alpha=0,05$ и снаге студије од 0,95, укупна величина узорка процењена је на 96.

2.7.6. Статистичка анализа

За статистичку анализу података користиће се програм Statistica® (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA). Нормалност расподеле континуираних варијабли биће испитана Колмогоров-Смирнов тестом, а опсервиране и очекиване фреквенције алела (Hardy-Weinberg равнотежа) биће упоређене χ^2 тестом. Значајност разлике у вредностима континуалних варијабли између случајева и контрола биће тестирана Студентовим Т-тестом за независне узорке (ако постоји нормална расподела) или Ман-Витнијевим тестом (ако нема нормалне расподеле). За утврђивање заступљености појединих генотипова међу случајевима и контролама користиће се χ^2 тест или Фишеров тест. Интеракција између генотипа и других предикторских варијабли биће испитана помоћу логистичке регресије или анализе коваријансе. Резултати ће бити приказани табеларно или графички. У свим тестовима статистичка значајност биће одређена вредношћу $p<0,05$.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Од студије се очекује да покаже да ли постоји значајна повезаност полиморфизма гена за панкреасне протеине PRSS1, SPINK1 и CFTR и факторе некрозе тумора TNF- α и TNF- β са током акутног панкреатитиса.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Предложена студија бави се утврђивањем повезаности најзначајнијих варијација гена који кодирају катјонски трипсиноген, инхибитор панкреасног трипсина, трансмембрански регулатор спровођења код цистичне фиброзе и факторе некрозе тумора α и β са настанком компликација или смртог исхода код пацијената са акутним панкреатитисом. Студија је ретроспективна, типа случај-контрола, а укључује пацијенте лечене од акутног панкреатитиса у Клиничком центру Крагујевац у периоду од најмање 2 године. Генотипизација се спроводи PCR методом уз примену рестрикционих ензима, док се као показатељи тока и исхода акутног панкреатитиса прате вредности АРАСНЕII скорa, смртни исход, некроза панкреаса, инфекција некрозе, псеудоциста панкреаса и вредности рутинских хематолошких и биохемијских тестова. Уколико се утврди да испитивани полиморфизам гена утиче на ток акутног панкреатитиса, процениће се и значај генотипизације као дијагностичке и прогностичке методе избора у акутном панкреатитису и рани маркер тежине очекиване клиничке слике.

3. Предлог ментора

Комисија за ментора ове докторске дисертације предлаже **проф. др Наташу Ђорђевић**, специјалисту клиничке фармакологије и ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

1. Jurisic V, Obradovic J, Tomic N, Pavlovic S, Kulic M, **Djordjevic N**. Effects of DMSO, glycerol, betaine and their combinations in detecting single nucleotide polymorphisms of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene promoter sequence in non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. *J Pharmaceut Biomed* 2016; 128: 275–9.
2. Dragas Milovanovic D, Milovanovic JR, Radovanovic M, Radosavljevic I, Obradovic S, Jankovic S, Milovanovic D, **Djordjevic N**. The influence of *CYP2C8*3* on carbamazepine serum concentration in epileptic pediatric patients. *BJMG* 2016; 19(1): 21-8.
3. Spasić M, Janković S, Stefanović S, Kostić K, Radovanović D, **Đorđević N**, Radosavljević I, Divjak A, Milojević A, Jelić I, and Čanović D. Clinical and laboratory parameters associated with death in acute pancreatitis. *Vojnosanit Pregl* 2016; DOI: 10.2298/VSP160227100S.
4. Mugosa S, **Djordjevic N**, Djukanovic N, Protic D, Bukumiric Z, Radosavljevic I, Boskovic A, Todorovic Z. Factors affecting the development of adverse drug reactions to β -blockers

- in hospitalized cardiac patient population. Patient Prefer Ather 2016; DOI: 10.2147/PPA.S108579.
5. Obradovic J, **Djordjevic N**, Tosic N, Mrdjanovic J, Stankovic B, Stanic J, Zaric B, Perin B, Pavlovic S, Jurisic V. Frequencies of *EGFR* single nucleotide polymorphisms in non-small cell lung cancer patients and healthy individuals in the Republic of Serbia: a preliminary study. Tumor Biol 2016; DOI: 10.1007/s13277-016-4930-4.
 6. **Djordjevic N**, Milovanovic DD, Radovanovic M, Radosavljevic I, Obradovic S, Jakovljevic M, Milovanovic D, Milovanovic JR, Jankovic S. *CYP1A2* genotype affects carbamazepine pharmacokinetics in children with epilepsy. Eur J Clin Pharmacol. 2016;72(4):439-45.
 7. Mugosa S, **Djordjevic N**, Bukumiric Z, Djukanovic N, Cukic J, Radosavljevic I, Baskic D, Protic D, Zdravkovic M, Todorovic Z. PREDICT score and *CYP2C19* polymorphism independently predict lack of efficacy of clopidogrel in cardiology patients. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2016;43(3):379-81.
 8. Radosavljevic I, Milojevic A, Miljkovic J, Divjak A, Jelic I, Artinovic V, Spasic M, Stojanovic B, Canovic P, Jankovic S, and **Djordjevic N**. Lack of *PRSS1* and *SPINK1* polymorphism in Serbian acute pancreatitis patients. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (3): 201-6.
 9. Dragas Milovanovic D, Radosavljevic I, Radovanovic M, Milovanovic J, Obradovic S, Jankovic S, Milovanovic D, **Djordjevic N**. *CYP3A5* polymorphism in Serbian pediatric epileptic patients on carbamazepine treatment. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (2): 93-9.
 10. Aklillu E, **Djordjevic N**, Carrillo JA, Makonnen E, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. High CYP2A6 enzyme activity as measured by a caffeine test and unique distribution of *CYP2A6* variant alleles in Ethiopian population. OMICS 2014;18(7):446-53.
 11. Obradovic J, Jurisic V, Tosic N, Mrdjanovic J, Perin B, Pavlovic S, and **Djordjevic N**. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-rich *EGFR* promoter sequence. Journal of Clinical Laboratory Analysis 2013; 27 (6): 487–93.
 12. Jakovljevic MB, Mijailovic ZD, Popovska Jovicic BD, Canovic PS, Gajovic OM, Jovanovic MR, Petrovic DS, Milovanovic OZ, and **Djordjevic ND**. Assessment of viral genotype impact to the cost-effectiveness and overall costs of care for peg-interferon-2 α + ribavirine treated chronic hepatitis C patients. Hepatitis Monthly. 13(6): e6750 , DOI: 10.5812/hepatmon.6750
 13. **Djordjevic N**, Carrillo JA, van den Broek MPJ, Kishikawa J, Roh HK, Bertilsson L, Aklillu E. Comparisons of *CYP2A6* genotype and enzyme activity between Swedes and Koreans. Drug Metab Pharmacokinet 2013; 28(2): 93-7.
 14. **Djordjevic N**, Carrillo JA, Roh HK, Karlsson S, Ueda N, Bertilsson L, Aklillu E. Comparison of N-acetyltransferase-2 enzyme genotype-phenotype and xanthine oxidase enzyme activity between Swedes and Koreans. J Clin Pharmacol 2012; 52(10):1527-34.
 15. Радосављевић И, **Ђорђевић Н**. Утицај генетског полиморфизма на ток и исход акутног панкреатитиса. Рационална терапија 2011; 3(2): 17-21.
 16. **Djordjevic N**, Carrillo JA, Ueda N, Gervasini G, Fukasawa T, Suda A, Jankovic S, Aklillu E. N-acetyltransferase-2 (*NAT2*) gene polymorphisms and enzyme activity in Serbs: unprecedented high prevalence of rapid acetylators in a white population. J Clin Pharmacol 2011; 51: 7: 994-1003.
 17. **Djordjevic N**, Ghotbi R, Jankovic S, Aklillu E. Induction of *CYP1A2* by heavy coffee consumption is associated with the *CYP1A2* –163C>A polymorphism. Eur J Clin Pharmacol 2010; 66(7):697-703.

18. **Djordjevic N**, Carrillo JA, Gervasini G, Jankovic S, Aklillu E. In vivo evaluation of CYP2A6 and xanthine oxidase enzyme activities in the Serbian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66(6): 571-8.
19. **Djordjevic N**, Ghotbi R, Jankovic S, Bertilsson L, Aklillu E. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption in Serbs and Swedes. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64(4): 381-5.
20. **Djordjevic N**, Jankovic S. Pharmacogenetics – future of the drug therapy. *Acta Medica Medianae* 2007;46(2): 57-62.

4. Научна област дисертације

Медицина. Ужа област: Хирургија.

5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Слободан Јанковић, редовни професор Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија и токсикологија и Клиничка фармакологија, председник
2. Проф. др Јасна Јевђић, ванредни професор Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
3. Проф. др Александар Карамарковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хирургија, члан

Закључак и предлог комисије

На основу досадашњег научно-истраживачког рада и остварене публикације, др мед. Иван Радосављевић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања је прецизно постављен, а научна методологија је јасна и прецизна.

Комисија сматра да ће предложена докторска теза бити од великог научног и практичног значаја, с обзиром на потенцијал да утврди генетску предиспозицију за развој теже клиничке слике акутног панкреатитиса и тиме промовише увођење генотипизације као једноставне и трајне лабораторијске анализе у рутинску примену као дијагностичке и прогностичке методе избора у овом обољењу.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Ивана Радосављевића под називом „Утицај полиморфизма гена за панкреасне протеине и факторе некрозе тумора на ток акутног панкреатитиса”, и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. **Проф. др Слободан Јанковић**, редовни професор Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Фармакологија и токсикологија и Клиничка фармакологија, председник

.....

2. **Проф. др Јасна Јевђић**, ванредни професор Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

.....

3. **Проф. др Александар Карамарковић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хирургија, члан

.....

У Крагујевцу, године