

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

ПР...	29.11.19
Ор...	
1507/2-2	

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-03-754/19 од 02.10.2019. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Владимира Вранића** под називом:

**„Повезаност полиморфизама у гену за рецептор витамина D са генском
предиспозицијом и клиничким параметрима оболелих од остеоартритиса великих
зглобова“**

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **Проф. др Бранко Ристић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хирургија*, председник;
2. **Доц. др Мирјана Веселиновић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан;
3. **Др сци мед Немања Ранчић**, научни сарадник Војномедицинске академије, Универзитета одбране у Београду за ужу научну област *Фармакологија*, члан.

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

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Владимир Вранић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Владимир Вранић је рођен 05.03.1977. године у Подујеву, АП Косово, Србија. Медицински факултет Универзитета у Београду завршио је 2002. године, са просечном оценом 9,22 а 2011. специјализацију из ортопедске хирургије на Војномедицинској академији, Универзитет одбране у Београду. Члан је више струковних удружења и похађао је више стручних едукација. Аутор је публикација у националним и међународним часописима.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: Повезаност полиморфизама гена за рецептор витамина D и генске предиспозиције за обољевање од остеоартритиса великих зглобова.

Предмет:

1. Утврђивање учесталост алела и генотипова полиморфизама FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232) и TaqI (rs731236) VDR гена, у групи пацијената са остеоартритисом великих зглобова и код испитаника контролне групе
2. Утврђивање повезаности испитиваних полиморфизама VDR гена са ризиком за настанак остеоартритиса великих зглобова
3. Испитивање повезаности полиморфизама FokI (rs2228570), TaqI (rs731236) и ApaI (rs7975232), VDR гена са демографским, етиолошким и релевантним клиничко-патолошким параметрима пацијената са остеоартритисом: индекс телесне масе, појава бола у другим зглобовима, појава отока, рана појава болести, рана менопауза, повреде и породична анамнеза
4. Утврђивање евентуалних разлика у повезаности испитиваних полиморфизама са ризиком и клиничко-патолошким параметрима између пацијената са остеоартритисом кука и пацијената са остеоартритисом колена
5. Испитивање постојања гаметске неравнотеже повезаности између FokI, ApaI и TaqI полиморфизама VDR гена, као и утврђивање дистрибуције идентификованих хаплотипова у групи пацијената са остеоартритисом и у контролној групи.

Хипотезе:

1. Разлике у учесталостима генотипова полиморфизама VDR гена између групе пацијената са остеоартритисом и контролне групе здравих особа би указале на потенцијалну повезаност полиморфизама овг гена са ризиком за појаву остеоартритиса код пацијената у нашој популацији
2. Полиморфизми FokI, TaqI и ApaI у VDR гену би могли бити повезани са демографским, етиолошким и/или клиничко-патолошким параметрима код пацијената са остеоартритисом
3. Постојање гаметске неравнотеже везаности између истраживаних полиморфизама VDR гена и значајне разлике у дистрибуцији хаплотипова FokI/TaqI/ApaI VDR гена између групе пацијената са остеоартритисом и контролне групе би указало на постојање хаплотипова VDR гена који носе повишени ризик за настанак остеоартритиса.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Владимир Вранић, је објавио 1 рад у целости у часопису категорије **M51**, у коме је први аутор, чиме је стакао услов за пријаву теме докторске дисертације.

1. **Vranic V**, Potic-Floranovic M, Petrovic M, Starcevic S, Supic G. Vitamin D and Vitamin D Receptor Gene in Osteoarthritis. Ser J Exp Clin Res. 2019. doi: 10.2478/sjccr-2018-0075. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Остеоартритис је прогресивно и дегенеративно обољење зглобова која погађа око 3% хумане популације. Одликује се упалом синовијалне мембране, која је праћена прогресивним деградирањем и губитком зглобне хрскавице и абнормалним растом субхондралне кости. Најчешће су захваћени зглобови колена и кука, а ређе прстију, вратног и лумбалног дела кичменог стуба. Симптоми укључују јак бол у зглобовима, укоченост и отицање, који прогредирају током година и доводе до губитка покретљивости. Познати етиолошки фактори ризика за појаву примарног остеоартритиса су: старост изнад 60 година, женски пол и то у менопаузи, гојазност, велика физичка оптерећења, повреде зглобова, итд. Узроци и механизми настанка остеоартритиса нису у потпуности разјашњени. Сматра се да значајну улогу може имати и генетска предиспозиција, а кључну улогу би могао имати витамин D, који има есенцијалну улогу у метаболизму костију и у хомеостази калцијума и фосфата. Ради се о стероидном хормону који

важном у метаболизму костију. Везивањем за VDR, активна форма витамина (D3) регулише апсорпцију калцијума и фосфата из гастроинтестиналног тракта и реапсорпцију у бубрезима што одржава ниво калцијума у крви. Уз паратиroidни хормон и калцитонин, витамин D има кључну улогу у минерализацији и ресорпцији костију. Међутим, витамин D има широк спектар ефеката и на различите типове ћелија што му обезбеђује потенцијалну улогу у великом броју комплексних болести, укључујући различите типове тумора, обољења са поремећајима инфламације и остеоартритис. У великом броју студија је испитивало потенцијалну улогу овог витамина у дегенеративним обољењима костију и зглобова, укључујући и остеоартритис. Вишее студија је испитивало повезаност нивоа витамина D у серуму са патогенезом и прогресијом остеоартритиса, као и суплементације витамином D у терапији остеоартритиса, али са неконзистентним резултатима.

2.5. Значај и циљ истраживања

Циљ овог истраживања је одређивање разлике у учесталости полиморфизама гена за рецептор витамина D [VDR FokI (rs2228570), VDR TaqI (rs731236) и VDR ApaI (rs7975232)] у групи пацијената са остеоартритисом великих зглобова и контролној групи здравих особа, као и утврђивање евентуалне повезаности са релевантним параметрима као што су: индекс телесне масе, појава бола у другим зглобовима, отоци, рана појава болести, рана менопауза, повреде и породична анамнеза).

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Последњих година је за велики број типова комплексних системских инфламацијских болести, укључујући и остеоартритис, утврђена повезаност у учесталости генотипова различитих полиморфизама са предиспозицијом за настанак болести, као и са патогенезом и прогресијом болести. Полиморфизми нуклеотидне секвенце (енгл. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) представљају разлике у секвенци ДНК у једном нуклеотиду и највећи су извор генетичке варијабилности у хуманим популацијама. Полиморфизми гена за VDR би могли имати значајну улогу у предиспозицији и патогенези остеоартритиса.

У хуманом VDR гену је до сада је откривено око 500 полиморфизама нуклеотидне секвенце, а само мали број њих има функционалне ефекте. Различите популације се одликују разликама у учесталости алела, што указује на потребу да се анализе учесталости и утврђивање повезаности полиморфизама VDR гена са ризиком за настанак обољења раде за специфичне

популације. Полиморфизам VDR FokI (rs2228570) представља супституцију тимина са цитозином (Т/С) у стартном кодону егзона 2 на позицији +27823. Утврђено је да се две варијанте алела међусобно разликују у функционалности, где протеин који је кодиран изворним wt обликом гена има скоро 2 пута већу активност у односу на протеин који је кодиран мутираним. Присуство мутираног алела доводи до веће интеракције са транскрипционим фактором 2В (TF2В) и до веће транскрипционе активности у поређењу са wt алелом. Полиморфизам VDR ApaI (rs7975232) настаје супституцијом цитозина аденином (С/А) на позицији +61888 у интрону 8. У егзону 9 се налази полиморфизам VDR TaqI (rs731236), који настаје заменом тимина цитозином (Т/С) на позицији +61938 (4,9). VDR TaqI доводи до замене аминокиселине изолеуцина метионином, а ова промена би се могла одразити на промену функције протеина VDR и повећан ризик за појаву остеоартритиса. Осим тога, полиморфизми ApaI и TaqI се међусобно налазе у јакој неравнотежи везаности, па се наслеђују у хаплоблоку.

Последњих година је већи број студија показао повезаност витамина D и полиморфизама у рецептору за витамин D са предиспозицијом за развој остеоартритиса. По нашим сазнањима код пацијената оболелих од остеоартритиса популације Србије ови полиморфизми до сада нису истраживани.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Истраживање ће бити спроведено по типу ретроспективне, клиничке и неинвазивне студије. Узорци периферне крви пацијената са остеоартритисом су прикупљени у периоду од 2015-2018. године, а у наредном периоду ће бити урађене генетске анализе и статистичка обрада података.

2.7.2. Популација која се истражује

Истраживањем ће бити обухваћени испитаници популације Србије, оболели од остеоартритиса који су оперисани у Клиници за ортопедију и трауматологију ВМА, док ће контролну групу чинити здрави даваоци крви, одговарајуће полне и старосне дистрибуције и без клиничких манифестација ОА ни других системских инфламацијских или аутоимунских обољења.

2.7.3. Узorkовање

Општи критеријуми - У истраживање су укључени оболели од остеоартритиса великих зглобова који су оперативно лечени на Клиници за ортопедију и трауматологију ВМА и испитаници контролне групе здравих даваоца крви који нису имали клиничке манифестације остеоартритиса

нити друга системска инфламацијска обољења. Сви испитаници ће бити животне доби од 18 до 85 година, мушког или женског пола, којима ће бити узимани узорци периферне крви са антикоагулансом у запремини од 3ml на Институту за биохемију, ВМА.

Узорци периферне крви пацијената са остеоартритисом великих зглобова и испитаника контролне групе су прикупљани у периоду од 2015-2018. године.

Искључујући критеријуми у групи оболелих од остеоартритиса су били: секундарни остеоартритис (конгенитални синдроми са појавом јувенилног остеоартритиса), остеоартритиса малих зглобова, остеоартритиса великих зглобова који није захтевао хируршку интервенцију, или код којих је хируршка интервенција рађена у другој институцији.

У контролној групи испитаника здравих даваоца крви искључујући критеријуми су били: појава клиничких манифестација остеоартритиса или других системских инфламацијских или аутоимунских обољења и историја малигног обољења. Ради адекватног упоређивања, контролна група је формирана на основу одговарајуће полне и старосне дистрибуције групе оболелих, тако да не постоји значајна разлика у учесталости женског пола и особа старије животне доби (у односу на медијану старости пацијената). Пол и године су познати фактори ризика за појаву примарног остеоартритиса (учесталост примарног остеоартритиса је повећана код људи старијих од 60 година и код женског пола), и у статистичкој анализи су означени као "збуњујуће" варијабле.

Специфични критеријуми - Испитаници ће бити подељени у две групе:

1. **Експериментална група** – коју чине оболели од остеоартритиса, код којих је постављена дијагноза остеоартритиса кука и колена (клинички критеријуми) и који су оперисани на Клиници за ортопедију и трауматологију ВМА.
2. **Контролна група** – коју чине здрави даваоци крви, одговарајуће полне и старосне дистрибуције. Испитаницима контролне групе је на основу анамнезе утврђено да немају клиничке манифестације остеоартритиса или других системских инфламацијских обољења.

Експериментална група ће бити формирана од оболелих са остеоартритисом великих зглобова (кука или колена) оперативно лечених на Клиници за ортопедију и трауматологију ВМА. Дијагноза остеоартритиса је била постављана на основу анамнезе, клиничког прегледа и радиографског снимка. На радиографији, тежина оштећења зглобова је процењена на основу типичних радиолошких промена: субхондралне коштане склерозе, сужавања зглобног простора, формирања остеофита, формирања субхондралне цисте и губитка кости.

Контролна група испитаника ће бити формирана тако да одговара дистрибуцији пола експерименталне групе и бити сличне старосне категорије на основу медијане старости оболелих особа. Учесталост полиморфизама и повезаност се клиничко-патолошким параметрима у групи болесника са остеоартритисом ће бити упоређивани у односу на контролне групе испитаника.

Планирно је да укупан број испитаника буде 194 (за снагу студије од 0.80 израчунато је да је минимални број потребних испитаника 80 у свакој од група).

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Прорачун студијског узорка је учињен за ретроспективну студију (на основу ранијих студија и прелиминарне анализе) посебно коришћењем одговарајућег рачунарског програма, уз вероватноћу α грешке од 0,05, снагу студије 0,80, и дихотомно обележје посматрања (χ^2 тест). На овај начин, добијен је минимални број испитаника од 80 (снага студије 0,80) у свакој од група. Да би узорак био довољно велики определили смо се да број оболелих буде 94, а број контролне групе испитаника 100, одн. да укупна величина узорка буде 194 испитаника.

2.7.6. Статистичка обрада података

Статистичка анализа ће бити извршена коришћењем програма SPSS, верзија 20.00 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Таблице вероватноће анализираће се χ^2 -тестом или Fisher тестом. За утврђивање постојања повезаности између полиморфизама гена и генетске предиспозије за настанак ОА биће израчунаван унакрсни однос шанси (енгл. Odds Ratio, OR) са 95% интервалом поверења (енгл. Confidence Interval, CI) безусловном бинарном логистичком регресијом. Прилагођени однос шанси (енгл. adjusted OR) биће израчунаван укључујући подешавања на основу пола и животне доби. Варијабле које се покажу као статистички значајне у униваријантној анализи, укључујући и варијабле са нивоом значајности мањим од 20%, ће бити анализирани мултиваријантном регресионом анализом.

Pair-wise неравнотежа везаности (LD) (D'), фреквенција хаплотипа и постојање Hardy-Weinberg еквилибријума ће бити одређивани коришћењем Haploview програма, верзија 4.2. Све разлике ће бити сматране значајним у случајевима када су p вредности мање од 0,05.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

По нашим сазнањима полиморфизама VDR гена до сада нису истраживани код пацијената са остеоартритисом у нашој популацији. У овој студији се очекује да се детектују разлике у учесталости генотипова полиморфизама VDR гена између оболелих од остеоартритиса и испитаника контролне групе. Добијене разлике у учесталости генотипова могу указати на потенцијалну повезаност полиморфизама у VDR гену са ризиком за настанак остеоартритиса великих зглобова.

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Узроци и механизми остеоартритиса још увек нису у потпуности разјашњени. Кључну улогу би могао да игра витамин D, који је есенцијалана супстанца у метаболизму костију. Метаболички активна форме витамина (витамин D3) своје ефекте остварује везујући се за рецептор витамина D (VDR). Рецептор витамина D функционише као транскрипциони фактор и одговоран је за контролу експресије великог броја гена, међу којима су и гени који учествују у метаболизму костију и хомеостази калцијума и фосфата. Витамин D игра важну улогу у бројним инфламацијским обољењима. Релативни недостатак овог витамина је чест у нашој популацији. У већем броју студија су испитивани ефекти овог витамина у патогенези и прогресији остеоартритиса, при чему су резултати контроверзни и неконзистентни. Последњих година је за велики број типова комплексних системских инфламацијских болести, укључујући и остеоартритис, утврђена повезаност учесталости генотипова различитих полиморфизама који указују на наследну предиспозицију за настанак и раније појављивање болести. Циљ овог истраживања је одређивање разлике у учесталости полиморфизама гена за рецептор витамина D (VDR FokI (rs2228570), VDR TaqI (rs731236) и VDR ApaI (rs7975232)) у групи пацијената са остеоартритисом великих зглобова и контролној групи здравих особа, као и утврђивање евентуалне повезаности са релевантним параметрима као што су: индекс телесне масе, појава бола у другим зглобовима, отоци, рана појава болести, рана менопауза, повреде и породична анамнеза).

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже проф. др Гордана Шупић, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије, Универзитет Одбране, која је изабрана за ужу научну област *Биологија са хуманом генетиком* 01.03.2018.

Проф. др Гордана Шупић поседује стручне и научне компетенције које су у складу са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. Правилника за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1 Компетентност ментора

Радови проф. др Гордане Шупић који су у вези са темом докторске дисертације:

Magic M, Zeljic K, Jovandic S, Stepic J, Pejovic M, Colic S, Magic Z, Supic G. Hedgehog signaling pathway and vitamin D receptor gene variants as potential risk factors in odontogenic cystic lesions. Clin Oral Investig. 2019;23(6):2675-2684.

Kujundzic B, Zeljic K, Supic G, Magic M, Stanimirovic D, Ilic V, Jovanovic B, Magic Z. Association of vdr, cyp27b1, cyp24a1 and mthfr gene polymorphisms with oral lichen planus risk. Clin Oral Investig. 2016;20(4):781-9.

Zeljic K, Kandolf-Sekulovic L, Supic G, Pejovic J, Novakovic M, Mijuskovic Z, Magic Z. Melanoma risk is associated with vitamin D receptor gene polymorphisms. Melanoma Res. 2014;24(3):273-9.

Zeljic K, Supic G, Stamenkovic Radak M, Jovic N, Kozomara R, Magic Z. Vitamin D receptor, CYP27B1 and CYP24A1 genes polymorphisms association with oral cancer risk and survival. J Oral Pathol Med. 2012;41(10):779-87.

Zeljic K, Supic G, Magic Z. New insights into vitamin D anticancer properties: focus on miRNA modulation. Mol Genet Genomics. 2017 Jun;292(3):511-524.

Zeljic K, Elkilany A, Supic G, Surbatovic M, Djordjevic D, Magic Z, Bozic B. Vitamin D receptor gene polymorphisms association with the risk of sepsis and mortality. Int J Immunogenet. 2017;44(3):129-134.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална хирургија

5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Бранко Ристић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хирургија*, председник;
2. Доц. др Мирјана Веселиновић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан;
3. Др сци мед Немања Ранчић, научни сарадник Војномедицинске академије, Универзитета одбране у Београду за ужу научну област *Фармакологија*, члан.

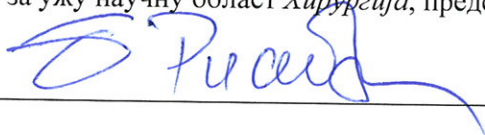
ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Владимир Вранић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Владимира Вранића, под називом: „**Повезаност полиморфизама у гену за рецептор витамина D са генском предиспозицијом и клиничким параметрима оболелих од остеоартритиса великих зглобова**“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Бранко Ристић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хирургија*, председник



Доц. др Мирјана Веселиновић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан



Др сци мед Немања Ранчић, научни сарадник Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област *Фармакологија*, члан.



У Крагујевцу, 01.11.2019. године