

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03.11.2020. godine, broj 9700/11, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Analysis of mtDNA sequence in patients with mitochondriopathies“

kandidatkinje Phepy Gamil Anwar Dawod, zaposlene na Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Ain Shams University School of Medicine, Cairo, Egypt. Mentor je Prof. dr Ivana Novaković, a komentor prof. dr Jasna Jančić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Jelena Drulović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Nela Maksimović, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Ivana Kavečan, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija kandidatkinje Phepy Gamil Anwar Dawod napisana je na engleskom jeziku, ima ukupno 148 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod (Introduction), ciljevi rada (Objectives), ispitanici i metode (Patients and Methods), rezultati (Results), diskusija (Discussion), zaključci (Conclusion) i literatura (References), a na kraju se nalazi dodatak sa priložima (Appendices). U disertaciji se nalazi ukupno 21 tabela (plus dve u priložima) i 17 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je najpre data definicija mitohondriopatija (MHP) kao genetički uslovljenih bolesti u čijoj osnovi je poremećaj funkcije mitohondrija. Potom je detaljno prikazana građa i funkcija mitohondrija uključujući i njihovo evolutivno poreklo. Opisana je dinamika mitohondrija i prikazane su ove organele kao sistem za proizvodnju energije u ćeliji. Zatim je detaljno objašnjena genetika mitohondrija, što uključuje građu i ulogu mitohondrijske DNK (mtDNK) čoveka, specifičnosti replikacije i transkripcije mtDNK i karakteristike mitohondrijalanog nasleđivanja. Izneta su saznanja o haplotipovima i haplogrupama humane mtDNK, o njihovom značaju za prirodnu selekciju i o njihovoj vezi sa bolestima kod ljudi. U delu uvoda posvećenom MHP uopšte, izneta su generalna saznanja o patogenezi ovih poremećaja, o načinima njihove dijagnostike i mogućnostima lečenja. Potom su posebno detaljno opisane najčešće MHP i pridruženi sindromi (Leberova hereditarna optička neuropatija – LHON, mitohondrijska encefalopatija sa laktičkom acidozom i epizodama sličnim moždanom udaru – MELAS, Leigh-ov sindrom – LS), sa prikazom njihove genetičke osnove i specifičnih fenotipskih karakteristika.

Ciljevi rada su precizno definisani. Studija je sprovedena sa ciljem analize primarnih i sekundarnih mutacija mtDNK kod pacijenata iz Srbije sa kliničkom dijagnozom MHP. Kod LHON planirana je detekcija dobro poznatih primarnih mutacija: m.3460G> A, m.11778G> A i m.14484T> C, kao i sekundarnih i intermedijarnih promena u mtDNK, zatim kod MELAS detekcija glavne mutacije m.3243A> G, kao i analiza drugih patogenih mutacija specifičnih za MHP. Takođe, cilj je bilo utvrđivanje mtDNK haplotipa kod nosilaca mutacije, sa konstrukcijom filogenetskog stabla. Poslednji cilj istraživanja je bila korelacija genotipa sa fenotipskim karakteristikama ispitanika.

U poglavlju **ispitanici i metode** je navedeno da se radi o studiji koja je sprovedena u Klinici za neurologiju KCS, Beograd, u saradnji sa Klinikom za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu, Beograd. Opisani su način selekcije pacijenata i kriterijumi za uključ enje u studiju ili za isključenje iz iste, navedene su demografski i epidemioški podaci koji su prikupljeni kao značajni. U vezi primenjene metodologije, izneti su protokoli i postupci molekularno genetičke analize, koji uključuju izolaciju DNK, PCR amplifikaciju i sekvenciranje po Sangeru čitave mtDNK ispitanika. Dati su i podaci o softverskim paketima koji su korišćeni za bioinformatičku karakterizaciju detektovanih mutacija i za analizu haplotipa mtDNK. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Svi pacijenti, ili, u slučaju dece, njihovi stratelji, su dali pisani pristanak pre uključenja u studiju.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana sistematično i jasno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa kritičkim uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada, i daju odgovore na postavljene ciljeve istraživanja. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 695 referenci, a date su i internet adrese 14 sajtova koji su citirani u tekstu.

Prilog sadrži listu korišćenih skraćenica, sekvencu mtDNK čoveka sa označenim pozicijama prajmerima za analizu, kao i listu detektovanih mutacija i djagnostikovanih sindroma sa OMIM klasifikacijom.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji su kod jedanaest nesrodnih probanada iz Srbije sa kliničkom dijagnozom MHP utvrđene patogene mutacije u mtDNK. U grupi LHON, koja je imala 8 nesrodnih probanada i ukupno četvoro njihovih asimptomatskih srodnika, utvrđene su dobro poznate LHON primarne mutacije m.3460G>A (u genu MT-ND1) i m.11778G>A (u genu MT-ND4), kao i retka mutacija m.8836A>G (u genu MT-ATP6). U svim slučajevima je pokazan homoplazmijski obrazac mutacija, osim za m.11778G>A, gde je nađena heteroplazmija kod dva zdrava srodnika. U ovoj grupi odnos polova kod probanada je potvrdio predominaciju muškaraca, jer je odnos obolelih muškaraca i žena bio 7 : 1. Kod obolele žene je nađena primarna mutacija m.3460G>A. Od negenetičkih faktora rizika, konzumacija alkohola i pušenje registrovani su kod dva probanda. U istraživanju su otkrivene i sekundarne mutacije u grupi sa LHON, a njihovo prisustvo je povećalo penetrantnost primarnih mutacija, s obzirom na to da su bile povezane sa ranim početkom LHON. Supstitucije m.4216T>C u genu MT-ND1, m.13708G>A u genu MT-ND5, m.15257G>A i m.15812G>A u genu MT -CIB su asocirane sa dve napred pomenute poznate primarne LHON mutacije, dok je m.3394T>C u genu MT-ND1 asocirana samo sa 11778G> A. U grupi sa dijagnozom MELAS nađena je supstitucija m.3243A>G u genu MT-TL1, koja je tipična za ovaj poremećaj. Navedena mutacija je nađena kao heteroplazmijska kod dva obolela dečaka. Kod jedne devojčice - probanda je nađena homoplazmična mutacija m.8993T>G u genu MT-

ATP6, koja je patognomonična za tešku formu Leigh-ove bolesti. U istraživanju su otkrivene i druge varijante mtDNK čiji su klinički značaj i uticaj na fenotip nejasni.

Patogene karakteristike svih otkrivenih mutacija mtDNK analizirane su *in silico*, pomoću odgovarajućih softvera. Program PoliPhen2 je klasifikovao kao definitivno patogene tri promene: m.3460G>A, m.8993T>G i m.11778G>A, i kao verovatno štetnu jednu promenu, m.8836A>G, sa skorom 1.000, 1.000, 0.996 i 0.770, redom. Softveri PANTHER i PROVEAN su dali slične rezultate. Za mutaciju mitohondrijske tRNK, m.3243A>G, korišćeni su mitoTIP i Mamit-tRNA, i oba softvera su potvrdila njenu patogenost.

Analiza programom MITOMASTER je pokazala evropski tip haplogrupa mtDNK kod 15 ispitanika u celini analiziranih u ovoj studiji, kao i u grupi šest ranije obrađenih LHON probanada. Poznate primarne mutacije kod LHON, MELAS i Leigh sindroma povezane su sa podtipovima mtDNK haplogrupe R (U, H i J). Za razliku od toga, retka LHON mutacija m.8836A>G bila je vezana za haplogrupu N1b.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Ova doktorska disertacija predstavlja prvo sveobuhvatno istraživanje u našoj sredini čiji je cilj analiza promena u mtDNK kod različitih tipova MHP. Potvrđene su najčešće mutacije kod LHON, ali je nađena i jedan retko opisivana promena, o kojoj u literaturi postoje oskudni i protivrečni podaci. S obzirom na to, dobijeni rezultat predstavlja značajan prilog poznavanju genetičke osnove LHON. Demografske i epidemiološke karakteristike u grupi ispitanika sa LHON su u saglasnosti sa podacima iz literature, u smislu češćeg obolevanja muškog pola, i značaja faktora rizika vezanih za stil života i navike (pušenje, alkohol). Analiza sekundarnih mutacija nije dala jasan odgovor o njihovom značaju za fenotipsko ispoljavanje primarne promene u mtDNK, jer se isti set mutacija nalazi i kod bolesnika i kod srodnika bez simptoma. Ovo je takođe u skladu sa većinom navoda iz literature, i govori u prilog kompleksne etilogije LHON. Značajno je da su pojedine sekundarne mutacije bile povezane sa ranijim početkom bolesti. Analiza haplogrupa je pokazala da se česte LHON mutacije javljaju u kontekstu različitih haplotipova, koji su prema prethodno publikovanim studijama tipični za našu sredinu. Interesantan je nalaz da se pomenuta retka LHON mutacija nalazi kod osobe sa haplogrupom N1b, koja je i sama vrlo retak u populaciji Srbije, što je prilog podacima iz literature u vezi njenog porekla i pravca širenja. U vezi slučajeva MELAS, nađena tipična mutacija, koja je više puta objavljena u literaturi i u bazama podataka, je potvrdila značaj ciljanog genetičkog testiranja za postavljanje dijagnoze ovog obolenja. Pokazana mutacija u genu za mitohondrijsku tRNK kod Leigh-ovog sindroma, je takođe

poznata iz internacionalnih referenci, ali je to prvi slučaj detektovan u našoj sredini. Samim tim on skreće pažnju na razmatranje ovog entiteta u diferencijalnoj dijagnozi teških neurodegenerativnih poremećaja u detinjstvu. Rezultati istraživanja iznetog u ovoj disertaciji su omogućili savremeno sagledavanje molekularne osnove MHP u populaciji Srbije, i doprineli su uspostavljanju dijagnostičkih šema za efikasnije otkrivanje a potom i praćenje ovih složenih poremećaja. Na osnovu iznetog mogu se primeniti modaliteti lečenja na koje upućuje savremena literatura, a takođe se može planirati genetičko savetovanje i prenatalno testiranje, radi dobijanja zdravog potomstva.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Dawod PGA, Jancic J, Marjanovic A, Brankovic M, Jankovic M, Samardzic J, Potkonjak D, Djuric V, Mesaros S, Novakovic I, Abdel Motaleb FI, Kostic VS, Nikolic D. Whole Mitochondrial Genome Analysis in Serbian Cases of Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Genes (Basel)*. 2020 Sep 2;11(9):1037. doi: 10.3390/genes11091037. PMID: 32887465; PMCID: PMC7565519.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Analysis of mtDNA sequence in patients with mitochondriopathies“ kandidatkinje Phepy Gamil Anwar Dawod predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju genetičke osnove mitohondriopatija. Opsežnom molekularno genetičkom analizom utvrđen je spektar mutacija u mtDNK koje se javljaju u slučajevima Leberove hereditarne optičke neuropatije, MELAS i Leigh-ovog sindroma sa teritorije Srbije. Pored primarnih mutacija koje uzrokuju bolest detektovane su i sekundarne promene u mtDNK i proučen njihov uticaj na modifikaciju fenotipa. Definisane su haplogrupe mtDNK kod svih ispitanika čime je upotpunjena slika o genetičkoj potki na kojoj se javljaju patogene mutacije, i dat uvid o njihovom mogućem evolutivnom poreklu. Imajući u vidu sve navedeno ova studija ima značajan naučni doprinos, a njeni rezultati nalaze primenu i u medicinskoj praksi, jer daju osnovu za preciznu dijagnostiku i praćenje bolesnika sa mitohondriopatijama na teritoriji Srbije.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i adekvatno izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Phepy Gamil Anwar Dawod i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 23.12.2020.

Članovi Komisije:

Prof. dr Jelena Drulović

Doc. dr Nela Maksimović

Prof. dr Ivana Kavečan

Mentor:

Prof. dr Ivana Novaković

Komentor:

Prof. dr Jasna Jančić
