

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 07.09.2016. godine broj 5940/7, imenovana je Komisija u sastavu:

1. Prof.dr Amira Egi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof.dr Tatjana Simi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof.dr Milan Radovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Doc.dr Nataša Mili , docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
5. Prof. Marko Babi , profesor Stomatološkog fakulteta u Beogradu

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom:

**„Dijagnosti ki i prognosti ki zna aj podocituri je kod žena sa preeklampsijom”**

kandidata dr. Vesne Garovi , zaposlene na Mejo klinici, Ro ester, SAD.

Mentor doktorske disertacije je prof. dr Darko Ple aš.

Ilanovi Komisije su detaljno prou ili priloženu doktorsku disertaciju i podnose Nau nom ve u Medicinskog fakulteta u Beogradu slede i

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija „Dijagnosti ki i prognosti ki zna aj podocituri je kod žena sa preeklampsijom” napisana je na 58 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metod istraživanja, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 11 tabela i 17 grafikona/slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji, kao i propratne priloge.

U **uvodu** je data definicija preeklampsije, oboljenja koje se klini ki karakteriše pojavom hipertenzije i proteinurije, a predstavlja vode i uzrok morbiditeta i mortaliteta kako majki tako i fetusa. Naveden je zna aj ispitivanja ovog oboljenja koje se javlja u oko 8% svih trudno a, a ija su etiologija i patogeneza i dalje nepoznate, zbog ega nisu utvr ene ni

preventivne niti terapijske mere za njeno le enje. Obzirom da poro aj predstavlja jedinu terapiju izbora za le enje teških oblika preeklampsije i o ekivanih životno ugrožavaju ih komplikacija, detaljno su opisani razlozi zbog kojih su neophodna istraživanja u ovoj oblasti koja bi omogu ila uvo enje novih dijagnosti kih testova, za otkrivanje, kao i terapijskih intervencija, za le enje preeklampsije.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Osnovni ciljevi istraživanja su procena dijagnosti kog i prognosti kog zna aja podociturije kod žena sa preeklampsijom, u smislu: ispitivanja strukturnih promena podocita kod žena sa preeklampsijom, utvr ivanja dijagnosti kog zna aja podocita za dijagnozu preeklampsije, zna aja podociturije kao ranog markera preeklampsije, kao i zna aja podociturije kao faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti.

U poglavlju **Materijal i metod istraživanja** detaljno su objašnjeni svi sprovedeni istraživa ki postupci prikupljanja i analize podataka koji su koriš eni za dobijanje odgovora na postavljene ciljeve. Jasno su prikazani dijagnosti ki kriterijumi za preeklampsiju, kako kod žena koje nisu imale hipertenziju i proteinuriju pre trudno e, tako i kod žena sa prethodno postoje om hipertenzijom, proteinurijom i bolesti bubrega koje mogu imati najviše koristi od rane dijagnoze, s obzirom da je njihov rizik za pojavu preeklampsije izrazito visok. Dat je detaljan opis metodologije merenja podociturije na slu ajnim uzorcima urina koji su centrifugirani na sobnoj temperaturi, zatim ispirani dva puta sa HDF rastvorom i resuspendovani u DMEM F-12 medijumu sa FBS kome su dodati antibiotici za prevenciju bakterijskog zagađenja. Detalji oko zasejavanja uzoraka na presecima sa premazom od kolagen kulture tkiva, inkubacije, uklanjanja medijuma, i fiksacije preseka su pregledno dati. Svaka od pripremljenih komora preseka inkubirana je sa podocinom (1:200), a nakon ispiranja, sekundarna FITC-ozna ena antitela su dodavana u razre enju 1:40 u trajanju od 30 minuta. Sediment je dodatno prebojavan DAPI nuklearnom bojom kako bi se olakšalo razlikovanje celih elija od fragmenata elija. Plo ice su fiksirane sa Vectashield-om (Vector Labs, Burlington, CA), a preseci su pregledaani fluorescentnim mikroskopom (Zeiss). Nukleirane, pozitivno obojene elije su smatrane podocitima. Slepom metodom dr. Grande procenjivan je svaki uzorak odre ivanjem broja prisutnih elija i procenta elija koje su se obojile za podocin. Podociturija je izražena kao odnos broja podocita i sadržaja kreatinina u odgovaraju em uzorku urina. Zna aj koriš enja podociturije kao ranog markera preeklampsije ispitivan je kroz otkrivanje podociturije u urinu pre klini ke proteinurije baziranoj na analizi podataka kohorte trudnica za koje su prikupljeni uzorci krvi i urina, a kod

kojih se razvila preeklampsija. Prognostički značaj preeklampsije za razvoj zdravstvenih ishoda nakon trudnoće u žena sa preeklampsijom ispitan je kroz povećanje rizika žena sa hipertenzijom u trudnoći, u povećanju sa ženama bez te komplikacije, za kardiovaskularne i bubrežne bolesti.

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

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

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 101 reference.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Ova doktorska disertacija je pokazala da su poremećaji funkcije podocita i poremećena regulacija proteina koji su specifični za podocyte uzročno-posledično povezani sa ranim subkliničkim oštećenjem bubrega koje dovodi do proteinurije u žena sa preeklampsijom. Otkrivanje ovog mehanizma nastanka proteinurije omogućava uvođenje novih skrining i dijagnostičkih testova za preeklampsiju, razvoj novih terapijskih metoda i ukazuje na prognostički značaj postojanja preeklampsije u trudnoći i za zdravstvene ishode u ovih žena nastale nakon trudnoće. Istraživanje je podržano rezultatima priloženih radova objavljenih u vodećim međunarodnim časopisima u oblasti ginekologije, nefrologije i hipertenzije.

## **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Rezultati spovednog istraživanja su prodiskutovani adekvatno u odnosu na postojeće dokaze iz literature. Prikazani su dokazi koji upućuju na to da poremećaji funkcije endotela, izazvani faktorima placente koji ulaze u cirkulaciju majke, imaju ključnu ulogu u patogenezi preeklampsije. Ova zapažanja su dovela do proučavanja veze između nekoliko cirkulišućih faktora u krvi, koji uključuju vaskularni endotelni faktor rasta i njegovog prirodnog antagonistu, sFlt-1, sa pojavom preeklampsije. Nekoliko studija je pritom potvrdilo da je nivo sFlt-1 vrlo visok u preeklampsiji i da on vezuje većinu dostupnog vaskularnog endotelnog faktora rasta. Maynard i sar. su kreirali životinjski model preeklampsije, koji je sugerisao da višak cirkulišućeg sFlt-1 dovodi do poremećaja funkcije endotela kao antagonist molekula angiogeneze, tj. vaskularnog endotelnog faktora rasta i placentalnog faktora rasta. U novije

vreme, objavljeno je, tako e, da povišen nivo cirkulišu eg slobodnog endoglina ometa signalizaciju TGF- 1 i vazodilataciju posredovanu azot monoksidom, ime posreduje zajedno sa sFlt-1 u izazivanju teškog oblika preeklampsije. Me utim, uprkos njihovoj mogu oj ulozi u patogenezi preeklampsije, nivoi sFlt-1 i drugih markera angiogeneze, pokazali su zna ajna preklapanja vrednosti kod trudnica sa preeklampsijom i normotenzivnih trudnica. Samim tim, zbog postojanja velikog broja lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata, ovi markeri se ne smatraju prikladnim za razvoj skrining testova za preeklampsiju.

Zaklju ci i eksperimentalnih i klini kih studija pokazali su da ošte enje podocita i njihov kona an gubitak ima veoma važnu ulogu u razvoju proteinurije. Gubitak podocita usled apoptoze je pokazan kako u eksperimentalnoj tako i u humanoj glomerularnoj bolesti. Drugi prikazan prihvatljiv mehanizam delovanja podocita na razvoj proteinurije predstavlja odvajanje podocita iz glomerularne bazalne membrane, koje zatim dovodi do gubitka podocita putem urina. I zaista, izlu ivanje vijabilnih podocita urinom je dokazano u eksperimentalnoj membranoznoj nefropatiji i u urinarnom sedimentu bolesnika sa razli itim aktivnim glomerularnim bolestima povezanim sa proteinurijom. Me utim, za razliku od proteinurije koja je prisutna i u aktivnoj i u hroni noj fazi glomerularnog ošte enja, podociturija je izgleda ograni ena samo na aktivnu bolest. Progresivni tok ve ine glomerularnih bolesti se karakteriše hroni nom proteinurijom koja može da se pogorša u recidivu bolesti a poboljša tokom remisije, što ima za posledicu prekidni urinarni gubitak podocita. Nasuprot tome, proteinurija u preeklampsiji nastaje iznenada, obi no nakon 20-te nedelje trudno e, a prestaje nakon poro aja, i to obi no do 12-te nedelje nakon poro aja. S obzirom na akutno ošte enje bubrega u preeklampsiji, postavlja se pretpostavka da je podociturija prisutna u sedimentu urina bolesnika sa preeklampsijom, što vodi zaklju ku da oste enje podocita može imati ulogu u nastanku proteinurije u preeklampsiji, te da njihov gubitak u mokra i može da predstavlja rani pokazatelj bolesti i dijagnosti ki test za preeklampsiju.

Adekvatno su upoređeni i rezultati doktorske disertacije sa drugim studijama koje su pokazale da preeklampsija predstavlja dugoro ni rizik za pojavu hipertenzije i bolesti udruženih sa hipertenzijom, tj. ishemijskom bolesti srca kasnije tokom života u žena sa pozitivnom istorijom za preeklampsiju u trudno i. Prikazane su i studije koje su ispitivale povezanost preeklampsije sa bubrežnom bolesti, a rezultati dobijeni u doktorskoj disertaciji prikazani su u kontekstu navedenih istraživanja.

#### **D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije**

Garovic VD, Wagner SJ, Petrovic LM, Gray CE, Hall P, Sugimoto H, Kalluri R, Grande JP. Glomerular expression of nephrin and synaptopodin, but not podocin, is decreased in kidney sections from women with preeclampsia. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(4):1136-43.

Garovic VD, Wagner SJ, Turner ST, Rosenthal DW, Watson WJ, Brost BC, Rose CH, Gavrilova L, Craigo P, Bailey KR, Achenbach J, Schiffer M, Grande JP. Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(4):320.e1-7.

Garovic VD, Craici IM, Wagner SJ, White WM, Brost BC, Rose CH, Grande JP, Barnidge DR. Mass spectrometry as a novel method for detection of podocyturia in pre-eclampsia. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(6):1555-61.

Craici IM, Wagner SJ, Bailey KR, Fitz-Gibbon PD, Wood-Wentz CM, Turner ST, Hayman SR, White WM, Brost BC, Rose CH, Grande JP, Garovic VD. Podocyturia predates proteinuria and clinical features of preeclampsia: longitudinal prospective study. *Hypertension*. 2013;61(6):1289-96.

Garovic VD, Bailey KR, Boerwinkle E, Hunt SC, Weder AB, Curb D, Mosley TH Jr, Wiste HJ, Turner ST. Hypertension in pregnancy as a risk factor for cardiovascular disease later in life. *J Hypertens*. 2010;28(4):826-33.

Kattah AG, Asad R, Scantlebury DC, Bailey KR, Wiste HJ, Hunt SC, Mosley TH, Kardia SL, Turner ST, Garovic VD. Hypertension in pregnancy is a risk factor for microalbuminuria later in life. *J Clin Hypertens*. 2013;15(9):617-23.

#### **E) Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Dijagnostički i prognostički značaj podociturije kod žena sa preeklampsijom” dr Vesne Garovi predstavlja originalni naučni doprinos u proceni dijagnostičkog i prognostičkog značaja podociturije kod žena sa preeklampsijom. Adekvatnom primenom metoda kandidat je postigao postavljeni istraživački cilj i dokazao, da su poremećaji funkcije podocita i poremećena regulacija proteina koji su specifični za podocyte uzročno-posledično povezani sa ranim subkliničkim oštećenjem bubrega koje dovodi do proteinurije u žena sa preeklampsijom. Originalan naučni doprinos sastoji se u: (1) ispitivanju strukturnih promena podocita kod žena sa preeklampsijom, (2) utvrđivanju dijagnostičkog značaja podocita za dijagnozu preeklampsije, (3) značaja podociturije kao ranog markera preeklampsije, kao i (4) značaja podociturije kao faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti. Doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući i zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Vesne Garovi i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 30.09.2016. godine.

Mentor:

---

Prof. dr Darko Ple aš

lanovi Komisije:

---

Prof.dr Amira Egi

---

Prof.dr Tatjana Simi

---

Prof.dr Milan Radovi

---

Doc.dr Nataša Mili

---

Prof. Marko Babi