

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16-JM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Značaj određivanja statusa prenosioca kod Dišenove i Bekerove mišićne distrofije u populaciji Srbije“

kandidata Mr dr Jasmine Maksić, zaposlene na Fakultetu za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju, Univerzitet u Beogradu. Mentor je Prof. dr Ivana Novaković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vidosava Rakočević Stojanović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Nela Maksimović, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Dragan Rapaić, profesor Fakulteta za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju

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 Mr dr Jasmine Maksić napisana je na ukupno 124 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal, metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 23 tabele, 9 grafikona i 14 slika. Citirano je 168 referenci iz domaće i inostrane literature. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i prilog u kome je ilustrovana primenjena molekularno genetička metoda.

U **uvodu** su definisane Dišenova (DMD) i Bekerova (BMD) mišićna distrofija, koje nastaju kao posledica mutacija u genu za distrofin. Naznačena je specifičnost strukture gena za distrofin (DMD gen), kao i struktura i funkcija njegovog proteinskog produkta – distrofina. Prikazani su tipovi i mehanizmi nastajanja promena tj. mutacija u genu za distrofin, kao i njihova korelacija sa fenotipom kod obolelih. Takođe, data je patogeneza ovih bolesti, njihova

klinička slika, kao i karakteristike kod žena manifestnih nosioca mutacije. Opisan je tip nasleđivanja DMD/BMD, kao i mogući rizici kod potomaka.

Zatim, prikazane su mogućnosti postavljanja genske dijagnoze kod obolelih i detekcije žena nosioca, kao i značaj genetičkog savetovanja i prenatalne dijagnoze. Opisane su molekularno genetičke metode direktne i indirektne analize gena za distrofin, koje omogućuju detektovanje mutacija kod obolelih, kod ženskih nosioca i u prenatalnoj dijagnozi. Takođe su prikazane metode svaremene genske terapije Dišenove i Bekerove mišićne distrofije.

Cilj rada je bio da se utvrde i analiziraju delecije i duplikacije u genu za distrofin kod probanada i da se u slučajevima potvrđenih delecija i duplikacija kod probanada, utvrdi status prenosioca kod njihovih ženskih srodnika; u slučajevima bez dokazanih delecija i duplikacija kod probanada, da se ispita mogućnost indirektne genetičke analize za određivanje statusa ženskih prenosioca. Takođe, u indikovanim slučajevima, da se izvrši prenatalna molekularno genetička analiza gena za distrofin, primenom adekvatne metode za datu porodicu.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da su uzorak činila 72 DMD/BMD probanda, 69 ženskih članova iz 44 porodice probanada i 11 trudnica (15 trudnoća). Genomska DNK za analizu je izolovana iz limfocita periferne krvi ispitanika metodom isoljavanja prema standardnoj proceduri, a za prenatalnu dijagnozu, DNK je izolovana iz uzorka horionskih resica, plodove vode ili krvi pupčanika ploda primenom komercijalnog kita. Za detekciju delecija i duplikacija u DMD genu kod probanda, od molekularno genetičkih metoda, su primenjene reakcija lančane polimerizacije (multipleks PCR) i metoda istovremenog umnožavanja vezanih proba (MLPA). Za izvođenje MLPA analize korišćena su dva SALSA MLPA kita, P034 i P035 (MRC-Holland, Holandija). Analiza je sprovedena na aparatima ABI Thermal Cycler Verity i ABI 3500 Genetic Analyser. Softverska obrada podataka obavljena je primenom programa Coffalyser.Net. Za detekciju ženskih nosioca primenjena je MLPA metoda i analiza vezanosti. U analizi vezanosti je korišćeno 6 mikrosatelitnih markera – 3'DYS (DXS1234), 5'DYS-II (DXS1242), STR44 (DXS1238), STR45 (DXS1237), STR49 (DXS1236), STR50 (DXS1235) i dva RFLPs markera pERT87-8taqI i pERT87-15taqI. Alelski status markera utvrđen je nakon PCR amplifikacije na aparatu ABI 9700 Thermal Cycler. Za prenatalnu dijagnozu primenjena je PCR metoda, analiza vezanosti i MLPA metoda.

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 168 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Primenom PCR i/ili MLPA metode kod 29 DMD i 43 BMD probanada je otkriveno 68,1%, velikih mutacija, tj. 87,7% delecija i 12,3% duplikacija. Delecije i duplikacije su zahvatile veći broj egzona u 79,6% slučajeva, a najčešća lokalizacija je bila u štapićastom domenu gena, u 85,7%. Odstupanje od Monakovog pravila je bilo prisutno kod 8,7% DMD bolesnika i 16,7% BMD bolesnika. Kod ispitanih ženskih srodnika probanada, velike mutacije su bile nađene u 39,6% slučajeva. Od 37 ispitanih majki probanada, potvrđenih nosioca je bilo 45,9%. Kod izolovanih DMD slučajeva je nađeno 50% majki nosilaca mutacije, odnosno 37,5% kod BMD. Među DMD/BMD slučajevima sa delecijom, majke su bile potvrđene kao nosioci u 56% slučajeva, a u DMD/BMD slučajevima sa duplikacijom majke su bile nosioci u 75% slučajeva. Na osnovu dobijenih podataka, utvrđena stopa novih mutacija iznosi ukupno 51,4%, odnosno 45,5% za DMD bolesnike i 60% za BMD bolesnike. Od preostalih 16 ženskih srodnika, kod 25% su bile nađene delecije koje ima i proband sa kojim su u srodstvu. U analizi vezanosti najinformativniji je bio marker DXS1237 (intron 45) u 77,8% slučajeva. Na osnovu samo analize vezanosti kod 8 porodica, učestalost ženskih hetrozigota je iznosila 82,3%. Kod 7 porodica analiza vezanosti je bila dopunjena MLPA analizom čime je predviđanje ishoda na osnovu analize vezanosti blo potvrđeno kod 55,5% ispitanica (dve porodice), dok kod 4 porodice nije mogla biti isključena tačkasta mutacija. Takođe, kod jedne majke probanda i njene rođene sestre predviđanje analizom vezanosti, da su mogući prenosioci mutacije, nije bilo potvrđeno MLPA analizom. Kod 3 trudnice kod kojih je primenjena indirektna molekularno genetička metoda, za dva muška ploda očekivani ishod je bio da će biti zdravi, dok kod trećeg ploda predviđeni ishod, da će biti bolestan, nije bio potvrđen MLPA analizom, ali se ne isključuje mogućnost prisustva tačkaste mutacije. Kod 8 trudnica (12 trudnoća) kod kojih je bila primenjena direktna molekularno genetička metoda, kod jedne majke, iz tri trudnoće, dva ploda (jedan muški, jedan ženski) su imala deleciju, dok jedan muški plod nije imao deleciju; kod druge majke, u dve trudnoće, delecija je bila potvrđena kod oba muška ploda.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Multipleks PCR metoda je vrlo efikasna u otkrivanju hemizigotnih delecija u genu za distrofin, a pošto su to najčešće prisutne mutacije kod DMD/BMD bolesnika, primena ove metode je opravdana kao prvi korak u DMD/BMD dijagnozi. Sa druge strane, MLPA metoda omogućuje analizu svih 79 egzona DMD gena i otkrivanje delecija van „vrućih tačaka” u genu, kao i duplikacija, kod probanda i žena nosioca mutacije. U istraživanju, kod jedne grupe probanada ispitivanje je bilo obavljeno PCR metodom, kod jedne grupe samo MLPA metodom, dok su kod jedne grupe probanada bile primenjene obe metode. U ovoj grupi, MLPA metodom su bile potvrđene sve delecije nađene PCR metodom, takođe je u 22,7% slučajeva nađena veća delecija, u 22,7% slučajeva delecija na drugoj lokaciji (van „vrućih tačaka” u genu), a kod 4 ispitanika otkrivena je duplikacija (18,2%). Ovi nalazi su u skladu sa do sada iznetim iskustvima velikog broja autora o efikasnosti MLPA metode (Lalić i sar., 2005; Murugan i sar., 2010; Prashant i sar., 2012). Kod 72 DMD/BMD probanada primenom PCR i/ili MLPA metode je bilo otkriveno 68,1% velikih mutacija, pri čemu su delecije činile 87,7%, a duplikacije 12,3%, što je u skladu sa rezultatima do sada najveće studije koju su sprovedi Bladen i sar. (2015). Kod izolovanih DMD/BMD slučajeva je zapaženo da se delecije i duplikacije javljaju u distalnom delu gena u 70% slučajeva (Passos-Bueno i sar., 1992), što je pokazalo i istraživanje iz disertacije (63,3%), a najveći broj delecija i duplikacija kod probanada je bio lokalizovan u štapićastom domenu gena, kod 85,7% bolesnika. Rezultati su pokazali da je odstupanje od očekivanog fenotipa bilo prisutno kod 8,7% DMD bolesnika, odnosno kod 16,7% BMD bolesnika. Dobijeni podaci su u skladu sa podacima iz literature koji pokazuju odstupanje od Monakovog pravila u oko 10% DMD/BMD slučajeva (Aartsma-Rus i sar., 2006). Odnosno, duplikacije, koje su češće prisutne kod BMD, rezultuju odstupanjem od ovog pravila čak u preko 30% slučajeva (Kesari i sar., 2008; Takeshima i sar., 2010).

Primenom MLPA metode, majke DMD/BMD probanada su bile potvrđene kao nosioci u 45,9% slučajeva, što je u skladu sa nalazima drugih autora (Murugan i sar., 2013). U izolovanim DMD slučajevima majke su bile nosioci u 50% slučajeva, kako nalaze i drugi autori (Taylor i sar., 2007; Dastur i sar., 2011), a što je manje od procenjenih 2/3. Međutim, za izolovane BMD slučajeve iz analiziranog uzorka, učestalost otkrivenih majki nosioca iznosila je 37,5%, što je niža vrednost od 89,5% koju nalaze Lee i sar. (2014). Ipak, kada su u pitanju *de novo* mutacije, većina autora se slaže da je za predviđanje rizika nosioca od značaja koji tip mutacije je prisutan. U ispitivanom uzorku, kada su u pitanju delecije, majke su bile potvrđene kao nosioci u 56% slučajeva, a kod duplikacija u 75% slučajeva. Ovi podaci su u

skaldu sa navedenim u literaturi, tj. da je veći rizik da majka bude nosilac kod duplikacija (63-68%), nego u slučaju delecija, odnosno da su delecije češće *de novo* mutacije (Murugan i sar., 2013; Lee i sar., 2014). Najčešća lokalizacija otkrivenih delecija kod majki je bila u distalnom delu DMD gena, u 71,4% slučajeva, što nalaze i drugi autori - 72% (Passos-Bueno i sar., 1992), odnosno 76% (Basak i sar., 2009).

Primenom analize vezanosti kod 8 porodica, zaključeno je da su 82,3% ispitanica mogući prenosioci mutacije. Dodatna MLPA analiza koja je bila sprovedena u 7 porodica potvrdila predviđene ishode za dve porodice (55,5% ispitanica). Kod četiri porodice nije mogla biti isključena tačkasta mutacija, a za jednu porodicu, MLPA analiza nije potvrdila status prenosioca kod ženskih članova. U svom radu, Taylor i sar. (2007) samo analizom vezanosti otkrivaju 47% žena koje su nosioci, a nakon primene MLPA metode (ili qPCR) i metode sekvenciranja gena, efikasnost detekcije ženskih nosioca se povećala se za 33%, tj. 25% primenom MLPA (ili qPCR) metode i još za 8% metodom sekvenciranja gena.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Jasmina Maksić, Valerija Dobričić, Lukas Rasulić, Nela Maksimović, Marija Branković, Vedrana Milić Rašić, Vidosava Rakočević Stojanović and Ivana Novaković. Analysis of duplications versus deletions in the dystrophin gene in Serbian cohort with dystrophinopathies. DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180226089M>; Vojnosanitetski pregled, 2018 OnLine-First Maj (00): 89-89 je dostupan na stani <http://doiserbia.nb.rs/issue.aspx?issueid=3045>.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Značaj određivanja statusa prenosioca kod Dišenove i Bekerove mišićne distrofije u populaciji Srbije“ Mr dr Jasmine Maksić, je prvi ovakav rad koji pruža katalogizaciju otkrivenih mutacija kod DMD/BMD pacijenata i žena nosioca mutacije u našoj zemlji, i predstavlja originalni naučni doprinos. Sprovedeno istraživanje je dalo podatke o najčešćim lokalizacijama i veličini unutargenskih delecija i duplikacija, kao i stopi novih i nasleđenih mutacija u DMD genu u populaciji Srbije. Takođe, rad daje informacije o učestalosti žena nosica mutacije kod DMD u odnosu na BMD, kao i u odnosu na tip mutacije kod obolelog. Indirektna detekcija mutacija omogućila je uvid u informativnost primenjenih markera, a dopunjeno ispitivanje MLPA analizom i stepen pouzdanosti predviđanja ishoda na osnovu analize vezanosti.

Sva sprovedena ispitivanja imaju i veliki praktični značaj za davanje genetskog saveta i prenatalnu dijagnozu. Budući da još uvek nema odgovarajuće terapije Dišenove i Bekerove mišićne distrofije, a tok bolesti je progresivan, odabir pouzdane metode za detekciju žena prenosioca DMD/BMD je od izuzetnog značaja jer čini osnovu genetičkog savetovanja.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo 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 Mr dr Jasmine Maksić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 14.06.2018.

Članovi Komisije:

Prof. dr Vidosava Rakočević Stojanović

Mentor:

Prof. dr Ivana Novaković

Doc. dr Nela Maksimović

Prof. dr Dragan Rapaić
