

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IV редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 25.1.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Маје Живковић и проф. др Горана Брајушковића о урађеној докторској дисертацији Ивана Р. Животића, истраживача сарадника, запосленог у Институту за нуклеарне науке “Винча”, Универзитета у Београду, под насловом: **“Асоцијација генских варијанти на хромозому 9p21 и транскрипције гена за CDKN2B и HACD4 са настанком атеросклерозе и њеним клиничким компликацијама код човека”**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Маја Живковић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке “Винча”, Универзитет у Београду, проф. др Горан Брајушковић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, др Тамара Ђурић Делић, виши научни сарадник, Институт за нуклеарне науке “Винча”, Универзитет у Београду. Комисија је прегледала написану докторску дисертацију кандидата и Већу доноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Ивана Животића **“Асоцијација генских варијанти на хромозому 9p21 и транскрипције гена за CDKN2B и HACD4 са настанком атеросклерозе и њеним клиничким компликацијама код човека”** представља оригинално истраживање које за тему има проучавање асоцијације генетичких фактора и експресије гена једног од најважнијих хромозомских региона (9p21) са настанком атеросклерозе и релевантним клиничким компликацијама у два различита огранка васкуларног система (каротидна и коронарна циркулација).

Ова докторска дисертација урађена је у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику Института за нуклеарне науке “Винча”, Универзитет у Београду, у оквиру пројекта “Интегрална студија идентификације регионалних генетских фактора ризика и фактора ризика животне средине за масовне незаразне болести хумане популације у Србији (ИИИ41028)”.

Докторска дисертација садржи: Насловну страну на српском и енглеском језику, Податке о менторима и члановима комисије, Резиме на српском и енглеском језику са кључним речима, Садржај, Текст по поглављима, Списак литературе, Прилоге,

Биографију аутора и приложене изјаве. Докторска дисертација написана је на 136 страна, садржи 6 слика, 10 графика, 34 табела (од којих 4 у прилогу). Дисертација је подељена на 8 поглавља: **Увод** (1-23 стране), **Хипотеза и циљеви** (24 страна), **Материјал и методе** (25-46 стране), **Резултати** (47-78 стране), **Дискусија** (79-95 стране), **Закључци** (96-97 стране), **Литература** (98-130 стране) и **Прилози** (131-136 стране).

Уз докторску дисертацију приложени су и Стручна биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штапане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу (странице нису нумерисане).

2. АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У **Уводу** који је подељен на неколико тематских делова кандидат Иван Животић представља основне податке о атеросклерози и генетичким факторима ризика из хромозомског региона (ХР) 9p21 који су испитани у оквиру докторске дисертације.

На почетку увода износи основне податке о патофизиолошким процесима у атеросклерози, који доводе до настанка атеросклеротског плака и клиничких компликација, међу којима су најзначајније инфаркт миокарда (ИМ) и исхемијски шлог. Изнети су доступни епидемиолошки подаци о исхемијском инфаркту миокарда и ИМ у популацији Србије. Наведени су најзначајнији фактори ризика за настанак атеросклерозе и презентована је њихова биолошка улога у самом процесу.

Описан је значај генетичке основе атеросклерозе. Описана су најзначајнија досадашња знања о ХР 9p21 и његовом значају за настанак и фенотипске компликације атеросклеротске болести. Наведене су најзначајније генетичке варијанте у које се убрајају и rs10757278 и rs518394 које су испитане у овој студији. Истакнуто је да генетичке варијанте и гени имају плејотропни ефекат и да могу утицати на настанак болести које у основи немају атеросклерозу. Поред тога, наведени су молекуларни механизми за које се сматра да подлежу модификацијама услед ефеката које испољавају гени и генетичке варијанте ХР 9p21, а утичу на настанак и прогресију атеросклерозе и њених клиничких компликација. Посебно је описан значај промена у експресији гена ХР 9p21 за процес атеросклерозе. Представљене су релевантне информације о генима *CDKN2B* и *HACD4*, као и њиховим протеинским продуктима. Описана је молекуларна основа атеросклерозе кроз сагледавање улоге и ефеката гена *CDKN2B* и његов утицај на биолошке процесе који се налазе у основи атеросклерозе. Описани су познати биолошки ефекти *HACD4* протеина, који до сада није испитиван у контексту кардиоваскуларних болести (КВБ), и објашњени механизми којима би могао остваривати улогу у настанку и прогресији атеросклерозе.

Описане су генетичке варијанте у ХР 9р21 које су испитане у оквиру докторске дисертације. Описана су досадашња сазнања и о утицају генетичких варијанти rs10757278 и rs51894 у гену *ANRIL* на настанак и клиничке манифестације атеросклерозе и других комплексних болести човека. Приказом досадашњих сазнања о генетичким варијантама rs2275888 и rs36212560 у гену *HACD4*, које до сада нису изучаване у контексту КВБ, истакнут је њихов потенцијални значај за настанак атеросклерозе и могући механизми деловња, у оквиру којих је истакнута регулаторна функција варијанти и утврђена улога варијанте rs2275888, као eQTL, у модификацији експресије гена *FOCAD* у ткиву аорте човека.

У поглављу **Хипотеза и циљеви** дефинисана је хипотеза и из ње проистекли главни научни циљеви докторске дисертације, који гласе:

1. Испитати асоцијацију варијанти rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL* и варијанти rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4*, и њихових хаплотипова са ризиком за настанак каротидног плака и инфаркта миокарда.
2. Испитати асоцијацију варијанти rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL* и варијанти rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* са фенотипом каротидног плака и клиничким компликацијама каротидне атеросклерозе.
3. Испитати асоцијацију варијанти rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL* и варијанти rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* са класичним факторима ризика за настанак атеросклерозе
4. Испитати да ли је ниво експресије гена *CDKN2B*, *HACD4* и *FOCAD* на нивоу иРНК асоциран са генотиповима варијанти rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL* и варијанти rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* у ткиву каротидног атеросклеротског плака.
5. Испитати да ли је ниво експресија гена *CDKN2B* и *HACD4* на нивоу иРНК асоциран са инфарктом миокарда и генотиповима варијанти rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL* и варијанти rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* у мононуклеарним ћелијама периферне крви болесника са инфарктом миокарда, 6 месеци након клиничког догађаја.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** описане су експерименталне методе молекуларне генетике коришћене у реализацији наведених циљева. У оквиру описа материјала дефинисан је број испитаника укључен у студију и институције које су у студији учествовале. Студија је укључила 500 болесника са каротидним плаком (КП) подвргнутих операцији ендартеректомије, 540 болесника са првим исхемијским акутним инфарктом миокарда, 325 здравих контрола за генетичку анализу. Од 40 болесника са каротидним плаком узети су узорци ткива плака за екстракцију РНК. Од 27 контрола и 73 болесника са ИМ узети су узорци периферне крви за екстракцију РНК, за анализу релативне експресије гена у мононуклеарним ћелијама периферне крви. Наведено је да су прикупљени лични и анамнестички подаци и да је студија одобрена од стране етичких комитета институција у којима су регрутовани учесници студије. Експериментални део студије (генетичко-епидемиолошка анализа генетичких варијанти на молекулу ДНК и експресија нивоа иРНК испитиваних гена) урађен је комплетно у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику Института за нуклеарне науке „Винча”, Универзитета у Београду.

Описане су ултрасонографске методе коришћене у карактеризацији каротидног плака, које је урађено у институцијама у којима су испитаници лечени. Описани су критеријуми за карактеризацију болесника са каротидним плаком на симптоматске и асимптоматске, као и критеријуми за дефинисање инфаркта миокарда. Описани су протоколи и методе за екстракцију ДНК (из пуне периферне крви) и РНК (из пуне периферне крви и из ткива каротидног плака), као и метода за проверу концентрације и чистоће узорака ДНК односно РНК. Дат је опис метода коришћених за детекцију и одређивање генотипова варијанти, као што су PCR анализа и анализа ДНК на полиакриламидном гелу за инсерцино-делециону (I/D) варијанту rs36212560 у гену *HACD4*; алел-дискриминишући q-PCR уз употребу TaqMan[®] есеја за варијанте rs10757278 (A/G) и rs518394 (C/G) у гену *ANRIL* и rs2275888 (T/C) у гену *HACD4*. Описане су методе реверзне транскрипције помоћу Dnase I и релативне квантификације помоћу q-PCR употребом TaqMan[®] технологије.

У посебном делу су наведене статистичке методе коришћене за обраду добијених резултата.

У поглављу **Резултати** приказане су слике и табеле које уз одговарајуће описе и објашњења представљају резултате добијене у оквиру истраживања. Резултати су подељени у седам потпоглавља.

У првом потпоглављу описана је детекција генотипова испитиваних варијанти које су успешно генотипизоване коришћењем адекватних метода за анализу.

У другом потпоглављу су представљени резултати анализе асоцијације генотипова испитиваних варијанти са биохемијским и клиничким факторима ризика за

настанак атеросклерозе (старост, пол, индекс телесне масе, тотални холестерол, холестерол високе и холестерол ниске густине, триглицериди). Асоцијација је испитана независно у групи здравих контрола и у групама болесника са КП и ИМ. Кандидат је навео да није установљена статистички значајна асоцијација испитиваних генотипова са факторима ризика за атеросклерозу.

У трећем потпоглављу изнети су резултати асоцијације генетичких варијанти са ризиком за настанак КП. Испитана је разлика између контрола и болесника са КП у односу на клиничке и биохемијске факторе ризика. Све анализе асоцијације су кориговане на ефекат фактора ризика који су били статистички значајно различити између тестираних група. Установљена је статистички значајна асоцијација G алела варијанте rs10757278 у гену *ANRIL* по рецесивном моделу наслеђивања са повишеним ризиком за настанак КП код жена. Генетичка варијанта rs36212560 у гену *HACD4* је статистички значајно асоцирана са настанком КП код мушкараца. Поред тога, установљена је статистички значајна асоцијација хаплотипа DT генетичких варијанти rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* са повишеним ризиком за настанак каротидног плака у целокупној групи и групи мушкараца.

У четвртом потпоглављу, генетичке варијанте су испитане у асоцијацији са компликацијама и клиничким карактеристикама КП (тип плака, симптоматска каротидна болест, улцерација на плаку). Статистички значајна асоцијација је установљена између генетичке варијанте rs10757278 у гену *ANRIL* и фенотипа каротидног плака код мушкараца, где је утврђено да носиоци ређег алела варијанте имају повећани ризик за настанак ехолуцентног плака. Установљена је статистички значајна асоцијација хаплотипа IC и DT у целој групи као и хаплотипа IC у групи мушкараца са повишеним ризиком за настанак симптоматске каротидне болести, код болесника са каротидним плаком. Такође је установљено да хаплотипови IC и DT носе повишени ризик за настанак улцерације на каротидном плаку у целокупној групи.

У петом потпоглављу су представљени резултати асоцијације испитиваних генетичких варијанти са настанком ИМ. Није установљена статистички значајна асоцијација варијанти rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL* са ризиком за настанак ИМ. Генетичка варијанта rs36212560 у гену *HACD4* асоцирана је са настанком ИМ у целој групи и групи мушкараца, док је генетичка варијанта rs2275888 у гену *HACD4* асоцирана са настанком ИМ у групи мушкараца. Хаплотип DT генетичких варијанти rs36212560 и rs2275888 је статистички значајно асоциран са повишеним ризиком за настанак ИМ у целокупној и групи мушкараца. Испитивањем асоцијације са тежином клиничке слике - изражене у виду броја оболелих коронарних судова - добијена је статистички значајна асоцијација алела G генетичке варијанте rs518394 у гену *ANRIL* са тежом клиничком сликом, у групи болесника са ИМ.

У шестом потподпоглављу представљени су резултати транскрипције испитиваних гена, одређених путем квантификације релативне експресије испитиваних гена на нивоу иРНК. Установљена је статистички значајно повишена експресија *FOCAD* иРНК код носилаца С алела генетичке варијанте rs2275888 у гену *HACD4*, по доминантном моделу наслеђивања. Није установљена значајна асоцијација других варијанти са експресијом испитиваних гена. Такође, није установљена статистички значајна асоцијација експресије гена у ткиву каротидног плака са фенотипом каротидног плака.

У седмом потподпоглављу испитана је квантификација експресије *CDKN2B* и *HACD4* гена у мононуклеарним ћелијама периферне крви болесника са ИМ, 6 месеци након акутног догађаја. Установљен је нижи ниво иРНК гена *CDKN2B* код болесника у односу на контроле. Код болесника са ИМ детектован је нижи ниво иРНК гена *CDKN2B* код носилаца G алела, односу на носиоце генотипа AA варијанте rs10757278. Статистички значајна разлика у нивоу иРНК детектована је између најчешћег генотипа GG у односу на генотип CG варијанте rs518394 у гену *ANRIL*. Није установљена статистички значајна асоцијација генетичких варијанти rs2275888 и rs36212560 у гену *HACD4* са експресијом гена *HACD4*.

У поглављу **Дискусија**, добијени резултати су критички дискутовани у складу са актуелним сазнањима из тематике. Поглавље је систематизовано тако да дискусија прати ток представљених резултата. Изнета су оригинална разматрања поткрепљена постојећим подацима и најновијим експерименталним доказима. У првом делу дискусије кандидат је дискутовао резултат који говори у прилог томе да генетичке варијанте XR 9p21 нису значајно асоциране са познатим атеросклеротским факторима ризика (ниво холестерола, триглицерида и др.), што је у складу са постојећим хипотезама и резултатима из литературе. Резултати асоцијације варијанти упоређени су са претходним публикацијама, продискутоване су сличности и разлике, као и могући узроци добијених разлика, укључујући етничку припадност и епидемиолошке карактеристике испитаника, као и фенотип болести. С обзиром да генетичке варијанте rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* нису до сада испитиване у контексту кардиоваскуларних болести њихов значај је тумачен на релевантан начин, користећи савремене научне публикације. Уз то је истакнута потреба и значај додатних репликационих и валидационих студија. Такође, изнет је значај испитивања генетичких варијанти уз сагледавање потенцијалних разлика у односу на пол. Дискутован је значај варијанти rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL* на настанак болести путем утицаја на експресију гена *CDKN2B*. Систематично су изнети резултати претходних студија и продискутовани у складу са добијеним резултатима докторске дисертације. Кандидат је истакао да је урађен мали број студија у којима је испитивана разлика у експресији *CDKN2B* на нивоу иРНК између болесника са кардиоваскуларним патологијама (инфаркт миокарда и исхемијски шлог) и здравих контрола и да су резултати конкордантни са резултатом докторске дисертације.

У поглављу **Закључци** сумирани су најважнији закључци који произлазе из експерименталних резултата приказаних у оквиру докторске дисертације. На основу резултата изведени су следећи закључци:

1. Утврђене су фреквенције алела и генотипова варијанти rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL*, rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* у узорку контрола и болесника са атеросклерозом из популације Србије.
2. Није детектована значајна асоцијација варијанте rs518394 са настанком каротидног плака и варијанти rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL* са инфарктом миокарда.
3. Уочена је полно специфична асоцијација генетичких варијанти са ризиком за настанак атеросклерозе:
 - а. генотипа GG варијанте rs10757278 у гену *ANRIL* са повећаним ризиком за настанак каротидног плака у групи жена.
 - б. ређег алела D варијанте rs36212560 у гену *HACD4* са повећаним ризиком за настанак каротидног плака код мушкараца и повећаним ризиком за настанак инфаркта миокарда у целој групи испитаника и у групи мушкараца.
4. Хаплотип DT варијанти rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* је независни фактор ризика за настанак каротидног плака и инфаркта миокарда, у целој групи испитаника и код мушкараца.
5. Присуство алела G варијанте rs10757278 у гену *ANRIL* представља фактор ризика за развој компликованог (ехолуцентни) каротидног плака код болесника са каротидним плаком.
6. Хаплотип IC варијанти rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* је протективан за испољавање симптома болести код болесника са каротидним плаком, у целом испитаном узорку и у групи мушкараца.
7. Хаплотипови IC и DT варијанти rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* имају протективан ефекат за улцерацију каротидног плака.
8. Није утврђена асоцијација варијанти rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL*, rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* са класичним кардиоваскуларним факторима ризика.
9. Утврђена је асоцијација алела C варијанте rs2275888 у гену *HACD4* са повишеним нивоом експресије гена *FOCAD* у ткиву каротидног плака.

10. Утврђен је снижен ниво експресије гена *CDKN2B* у мононуклеарним ћелијама периферне крви код болесника са ИМ, 6 месеци након инфаркта у односу на здраве контроле.
11. Утврђена је асоцијација алела G варијанте rs10757278 у гену *ANRIL* са сниженим нивоом експресије гена *CDKN2B* у мононуклеарним ћелијама периферне крви болесника са ИМ, 6 месеци након инфаркта.

У оквиру поглавља **Литература** дата је листа од 230 библиографских јединица адекватно коришћених и наведених у дисертацији. У оквиру поглавља **Прилози** приказани су резултати тестова асоцијације испитиваних генетичких варијанти, rs10757278 и rs518394 у гену *ANRIL*, rs36212560 и rs2275888 у гену *HACD4* са биохемијским, демографским, хематолошким и инфламаторним факторима ризика за атеросклерозу, код болесника са каротидним плаком.

3. БИБЛИОГРАФИЈА

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. **Zivotić I**, Djurić T, Stanković A, Ivančević I, Končar I, Milasinovic D, Stankovic G, Alavantić D, Zivković M. The *HACD4* haplotype as a risk factor for atherosclerosis in males. *Gene*. 2018;641:35-40. **M22 IF 2.498 (2018)**
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29031776>
2. **Zivotić I**, Djurić T, Stanković A, Djordjević A, Končar I, Davidović L, Alavantić D, Zivković M. 9p21 locus rs10757278 is associated with advanced carotid atherosclerosis in a gender-specific manner. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(11):1210-6. **M22 IF 2.688 (2016)**
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26941057>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја:

1. **Zivotic I**, Djuric T, Stankovic A, Stankovic G, Milasinovic D, Dekleva M, Markovic N, Alavantic D, Zivkovic M. H4CD4 haplotype confers risk of myocardial infarction among males in the population of Serbia, *Atherosclerosis*, Volume 275, Pages e210 - e211, DOI: org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.657; pages e210-e211 **(M34)**
2. **Zivotic I**, Stankovic A, Alavantic D, Zivkovic M. Chromosomal region 9p21 in cardiovascular disease: Results from Serbian population. The 9th International Symposium on Neurocardiology; The 8th International Symposium on Noninvasive Electrocardiology, September 22nd – 23rd 2017, Belgrade, Serbia. ISSN 2069-0169; ISSN-L 2069-0169. page 55 **(M34)**
3. Živković M, **Životić I**, Djurić T, Stanković A, Djordjević A, Končar I, Davidović L, Dekleva M, Markovic Nikolic N, Alavantić D. The 9p21 chromosomal locus in atherosclerosis. 2nd European section meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences "Heart disease: how new research may lead to new treatments", Belgrade, Serbia, October 8th – 10th 2015. Page 148 **(M34)**
4. **Životić I**, Đorđević A, Đurić T, Končar I, Alavantić D, Stanković A, Živković M. Polymorphism rs10757278 in 9p21 region is associated with severe carotid atherosclerosis in sex specific manner: Preliminary study. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, September 28th – October 2nd 2014. page 59 **(M34)**

Мишљење и предлог Комисије:

Комисија сматра да је кандидат Иван Р. Животић током израде дисертације показао висок степен познавања научне основе проблематике, добро дефинисао циљеве, применио адекватне методе у истраживању и обради добијених резултата које је критички дискутовао, уз исцрпне податке из литературе. Докторска дисертација даје оригинални допринос истраживањима у области молекуларне генетике кардиоваскуларних болести. Ово је прва студија случајева и контрола у којој су испитане генетичке варијанте у гену *HACD4*, варијанта rs518394 у гену *ANRIL* и прва студија у популацији Србије у којој је испитана генетичка варијанта rs10757278 у гену *ANRIL*. Студија је допуњена анализом транскрипције гена *CDKN2B* и *HACD4* у ткиву каротидног плака и мононуклеарним ћелијама периферне крви здравих контрола и болесника са ИМ. Резултати студије представљају основу за креирање модела израчунавања ризика за настанак атеросклерозе, који би укључивао полигени скор ризика (eng. *polygenic risk score*).

На основу укупне оцене дисертације, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације Ивана Р. Животића под насловом „**Асоцијација генских варијанти на хромозому 9p21 и транскрипције гена за CDKN2B и HACD4 са настанком атеросклерозе и њеним клиничким компликацијама код човека**“.

У Београду, 31.01.2019. године.

Комисија:

др Маја Живковић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке “Винча”, Универзитет у Београду

др Горан Брајушковић, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Тамара Ђурић Делић, виши научни сарадник, Институт за нуклеарне науке “Винча”, Универзитет у Београду