

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На VIII редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 15.06.2021. године, на основу молбе ментора, др Тамаре Ђурић Делић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке Винча - Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду и др Миљане Кецмановић, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Јоване П. Кувелић**, истраживач сарадник, Институт за нуклеарне науке Винча - Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду, под насловом: „**Повезаност гена *PNACTRI* са настанком и компликацијама атеросклерозе код човека**“, у саставу: др Тамара Ђурић Делић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке Винча - Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду, др Миљана Кецмановић, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду и др Маја Живковић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке Винча - Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација је написана на 71 страни и садржи 11 слика, 16 табела и 7 графика. Уводних страна (Насловна страна на српском и енглеском језику, Страна са информацијама о менторима и члановима комисије, Захвалница, Сажетак докторске дисертације на српском и енглеском језику и Садржај) има 8 и оне нису нумерисане. Дисертација се састоји из 7 поглавља: Увод (17 страна, 9 слика), Хипотеза и циљеви (1 страна), Материјал и методе (9 страна, 2 слике), Резултати (22 стране, 16 табела и 7 графика), Дискусија (10 страна), Закључци (1 страна) и Литература (150 референци на 8 страна). Следи Листа скраћеница на 2 стране и Биографија аутора на 1 страни. На крају дисертације су приложене: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу (4 стране које нису нумерисане).

#### Анализа докторске дисертације

Поглавље **УВОД** подељено је на четири дела. У првом делу детаљно је описан фенотип испитиван у овој докторској дисертацији, односно атеросклероза. Атеросклероза се налази у основи већине кардиоваскуларних болести (КВБ), укључујући исхемијску болест срца, која може довести до инфаркта миокарда (ИМ) и цереброваскуларне болести,

које могу довести до цереброваскуларног инсульта (ЦВИ). Приказана је смртност услед КВБ у свету и у Србији. Затим је описана грађа великих еластичних артерија, крвних судова у којима се развија атеросклероза. Патогенеза атеросклерозе објашњена је кроз фазе, од настанка до развоја узнапредовале атеросклерозе. Задржавање липида, ендотелна дисфункција и инфламација су кључни процеси у настанку атеросклерозе, а главне ћелије које учествују у развоју атеросклерозе су ендотелске ћелије, глатке мишићне ћелије (ГМЋ) и макрофаги. Макрофаги и ГМЋ се током процеса трансформишу у пенасте ћелије које су карактеристичне ћелије атеросклеротског плака. Такође је описан развој атеросклеротског плака и начини како се садржај може ослободити из плака и довести до тромбозе. Представљени су фактори ризика за развој атеросклерозе, који могу бити генски и средински. Уобичајени фактори ризика као што су старење, хипертензија, дијабетес, хиперхолестеролемија и пушење, утичу на адаптивне механизме који обезбеђују адекватну перфузију виталних органа и тако утицајем на структуру и функцију крвних судова омогућавају развој атеросклерозе. Затим је дат упоредни преглед атерогенезе у каротидним и коронарним артеријама, а такође су дефинисане главне компликације атеросклерозе (ИМ и ЦВИ). До исхемијског ЦВИ долази услед одумирања неурона изазваног закрчењем каротидних артерија, чиме је ослабљен или онемогућен доток кисеоника и хранљивих материја у мозак, док атеросклероза коронарних артерија доводи до инфаркта миокарда услед закрчења артерија које снабдевају срце нутријентима и кисеоником и омогућавају функционисање срчаног мишића. Након исхемијске повреде срца следи процес ремоделовања леве коморе срца који иницијално представља механизам за опоравак срца кроз уклањање остатака кардиомиоцита, стварање додатног, новог ванћелијског матрикса и формирање ожиљног ткива, што има за сврху рестаурацију претходне структуре и функције зида леве коморе срца. Уколико се процес ремоделовања пролонгира може се развити маладаптивно ремоделовање које потенцијално доводи до срчане инсуфицијенције. Затим је дат кратак преглед досадашњих истраживања на пољу генетике атеросклерозе и резултата студија асоцијације целокупног генома (eng. *Genome Wide Association Studies*, GWAS) у КВБ.

У другом делу поглавља УВОД говори се о карактеристикама протеина чији је ген основни предмет истраживања ове докторске дисертације, а то је регулатор протеин фосфатазе и актина 1 (eng. *protein phosphatase and actin regulator 1*, PHACTR1). Главне особине протеина PHACTR1 су да може да интерагује са протеин фосфатазом 1 и са актином. Преко специфичног домена на С-терминалном региону PHACTR1 везује каталитичку субјединицу протеин фосфатазе 1 и регулише њену активност у једру. За интеракцију са актином служе РПЕЛ мотиви којих има четири. Такође је представљена распрострањеност протеина и транскрипата PHACTR1 у ткиву и ћелијама анималних модела и код човека.

У трећем делу поглавља УВОД описане су асоцијационе и функционалне студије до сада урађене на тему PHACTR1 у атеросклерози. Дат је опсежан преглед GWA студија у којима су испитиване варијанте гена *PHACTR1* у кардиоваскуларним фенотиповима. У GWA студијама су варијанте из локуса *PHACTR1* прво повезане са раним ИМ. Затим је варијанта rs9349379 повезана са коронарном болешћу (КБ) и заједно са варијантом rs2026458 са калцификацијом коронарних артерија. Функционалне студије указале су на учешће *PHACTR1* у различитим процесима у организму, како физиолошким, тако и патолошким. Ендотелна дисфункција, инфламација, калцификација, неоваскуларизација,

организација цитоскелета и ефероцитоза, само су неки од процеса који указују на системску повезаност гена и протеина *PHACTR1* са процесом атеросклерозе.

У четвртом делу поглавља УВОД описан је ген *PHACTR1* и његове варијанте. Детаљно су описани транскрипти гена *PHACTR1*. Представљене су варијанте гена *PHACTR1* које су повезане са неким од кардиоваскуларних фенотипова, међу којима и интронске варијанте rs9349379, rs2026458 и rs2876300. Ове варијанте нису у јакој неравнотежи везаности ( $r^2 < 0,5$ ) па је омогућена и њихова хаплотипска анализа. Објашњен је могући механизам регулаторног ефекта rs9349379 и на ген *EDN1* (Ендотелин 1), који се налази на 1 Мб од *PHACTR1*, као и механизам деловања протеина EDN1 на васкуларне болести са којима је овај локус асоциран. Јасно је објашњен плејотропни ефекат генске варијанте rs9349379. Дат је преглед досадашњих истраживања о утицају варијанте rs9349379 на транскрипцију гена *PHACTR1*, као и могућег утицаја варијанте rs9349379 на транскрипцију гена *EDN1*.

У поглављу **ХИПОТЕЗА и ЦИЉЕВИ** јасно је дефинисан предмет и циљеви истраживања ове докторске дисертације. Хипотеза да су варијанте rs9349379, rs2026458 и rs2876300 гена *PHACTR1* као и ниво транскрипције гена *PHACTR1* укључени у настанак атеросклерозе у каротидним (АКА) и коронарним (АКОА) артеријама и да доприносе развоју узнапредовалог облика болести, те да су потенцијални маркер ризика за атеросклерозу, постављена је на основу повезаности гена *PHACTR1* са неколико кардиоваскуларних фенотипова у студијама асоцијације целокупног генома, као и укључености протеина *PHACTR1* у процесе који су повезани са хомеостазом кардиоваскуларног система.

Постављени су следећи циљеви:

1. Испитивање асоцијације варијанти гена *PHACTR1* са присуством каротидног плака.
2. Анализа удружености генских варијанти са претходним симптоматским догађајима и различитим, ултрасонографски дефинисаним, типовима атеросклеротског плака код испитаника са АКА.
3. Испитивање удружености изабраних генских варијанти са нивоом транскрипције гена *PHACTR1* у ткиву каротидног атеросклеротског плака код испитаника са АКА.
4. Анализа удружености генских варијанти са првим ИМ и параметрима тежине болести код испитаника са АКОА.
5. Испитивање удружености генских варијанти са маладаптивним ремоделовањем леве коморе срца и ехокардиографским параметрима структуре и функције срца код испитаника са АКОА шест месеци након првог ИМ.
6. Анализа удружености изабраних генских варијанти са нивоом транскрипције гена *PHACTR1* и гена *EDN1* у мононуклеарним ћелијама периферне крви код здравих испитаника и испитаника шест месеци након ИМ.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ и МЕТОДЕ** састоји се од два дела у којима су описани узорци на којима је вршено испитивање и методологија коришћена у истраживању. У делу МАТЕРИЈАЛ јасно су дефинисане и описане циљне групе које су учествовале у студији,

односно испитаници са АКА (n=501) и АКОА (n=537) артерија, као и група здравих (n=310) испитаника. Узорци испитаника са АКА су прикупљени у сарадњи са Клиником за васкуларну хирургију Института за кардиоваскуларне болести “Дедиње”, Београд и Клиником за васкуларну и ендоваскуларну хирургију Клиничког Центра Србије, Београд, а узорци испитаника са АКОА у сарадњи са Клиничким одељењем за кардиоваскуларне болести Клиничко-болничког центра “Звездара”, Београд и Клиником за кардиологију Клиничког Центра Србије, Београд, уз одобрења Етичких комитета ових институција. У делу МЕТОДЕ представљени су поступци коришћени за клиничку карактеризацију узорака: Доплер ултрасонографија каротидних артерија, електрокардиографија, Доплер ехокардиографија и перкутана коронарна интервенција. Јасно су дефинисани фенотипови испитивани у овој докторској дисертацији. Затим су описане методе коришћене за генетичку анализу узорака: екстракција ДНК и РНК, мерење концентрације и процена квалитета екстраховане ДНК и РНК, генотипизација варијанти гена *PHACTR1*, реверзна транскрипција информационе РНК и одређивање релативног нивоа транскрипције гена *PHACTR1* и *EDN1*. Такође су описане и статистичке методе коришћене за обраду резултата: Statistica 8, Thesias 3.1, LD link, GraphPad и PGA. Узорци периферне крви свих учесника коришћени су за генотипизацију варијанти rs9349379, rs2026458 и rs2876300, гена *PHACTR1*. Квантификација нивоа транскрипције гена *PHACTR1* урађена је на 44 узорака ткива каротидног плака, сакупљених приликом операције ендартеректомије. Квантификација нивоа транскрипције гена *PHACTR1* и *EDN1* урађена је на 74 узорака моноклеарних ћелија периферне крви (МћПК) испитаника са атеросклерозом коронарних артерија шест месеци након ИМ и на 35 узорака МћПК здравих испитаника.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** обухвата две целине: атеросклероза каротидних артерија и атеросклероза коронарних артерија. У њима су представљени резултати добијени у експерименталном делу ове докторске дисертације, приказани табеларно и графички. Резултати су представљени у складу са постављеним циљевима и фазама истраживања.

Прва целина, атеросклероза каротидних артерија, започиње прегледом основних демографских, биохемијских и клиничких података испитаника са АКА. Затим следи табела у којој је представљена дистрибуција фреквенција алела и генотипова варијанти гена *PHACTR1*: rs9349379, rs2026458 и rs2876300 у контролној групи и код испитаника са АКА. Потом следе табеле у којима је представљена асоцијација хаплотипова варијанти гена *PHACTR1* са присуством каротидног плака, као и са претходним симптоматским догађајима и ултрасонографски дефинисаним типовима атеросклеротског плака код испитаника са АКА. Показана је значајна и независна асоцијација хаплотипа АСА, варијанти rs9349379, rs2026458 и rs2876300, гена *PHACTR1* са присуством каротидног плака у односу на референтни хаплотип GТА. Затим следе резултати испитивања нивоа транскрипције гена *PHACTR1* у ткиву каротидног плака. Ткиво каротидног плака узето је од 44 испитаника са АКА током операције ендартеректомије, а у табели су представљени њихови основни демографски, биохемијски и клинички подаци. Графички је представљена анализа утицаја хаплотипова варијанти гена *PHACTR1* на ниво транскрипције гена *PHACTR1*. Хаплотип АСG гена *PHACTR1* повезан је са значајно вишим нивоом транскрипције гена *PHACTR1* у каротидном плаку, у односу на референтни хаплотип GТА. Такође је графички представљен ниво транскрипције гена у односу на појаву претходног симптоматског догађаја и тип ултрасонографски дефинисаног атеросклеротског плака.

Друга целина је атеросклероза коронарних артерија која започиње табелом са основним демографским, биохемијским и клиничким подацима испитаника са АКОА. У наредној табели приказана је дистрибуција фреквенција алела и генотипова варијанти гена *PHACTR1*: rs9349379, rs2026458 и rs2876300 у контролној групи и код испитаника са првим ИМ. Потом следи табела у којој је приказан утицај хаплотипова варијанти гена *PHACTR1* на појаву првог ИМ код испитаника са АКОА. Показано је да испитиване варијанте гена *PHACTR1* нису асоциране са инфарктом миокарда, ни појединачно ни у хаплотипу. Затим је представљена асоцијација варијанти гена *PHACTR1* са параметрима тежине болести, односно са вишесудовном болешћу и са SYNTAX скором. Ређи алел G, варијанте rs2876300, гена *PHACTR1* асоциран је са вишесудовном болешћу срца. Хаплотипови AT и GC, варијанти rs9349379 и rs2026458 гена *PHACTR1* показују значајан хомогени ефекат и независну асоцијацију са вишим вредностима SYNTAX скорa. Надаље су приказани резултати у оквиру испитивања процеса ремоделовања леве коморе (ЛК) срца у току шест месеци након првог ИМ на групи од 157 испитаника са АКОА. Дата је табела са вредностима основних параметара испитаника без и са развијеним маладаптивним ремоделовањем ЛК срца шест месеци након ИМ. Потом су приказане табеле са утицајем хаплотипова варијанти гена *PHACTR1* на развој маладаптивног ремоделовања ЛК срца код испитаника са АКОА шест месеци након првог ИМ, као и на промену ехокардиографских параметара структуре и функције ЛК срца током првих шест месеци од догађаја. Није показана асоцијација хаплотипова испитиваних варијанти гена *PHACTR1* са променама у ехокардиографским параметрима структуре и функције срца, нити са маладаптивним ремоделовањем леве коморе срца шест месеци након ИМ. Анализа нивоа транскрипције испитиваних гена *PHACTR1* и *EDN1* у МЋПК урађена је на узорцима периферне крви 35 испитаника из контролне групе и 74 испитаника са АКОА шест месеци након првог ИМ. Ниво транскрипције гена *PHACTR1* и *EDN1* у МЋПК код испитаника са АКОА шест месеци након ИМ значајно је повишен у односу на испитанике из контролне групе. Показано је да је хаплотип ACG гена *PHACTR1* повезан са значајно вишим нивоом транскрипције гена *PHACTR1* у МЋПК код испитаника са АКОА шест месеци након првог ИМ, у односу на референтни хаплотип GTA, док варијанте гена *PHACTR1* нису показале значајан утицај на транскрипцију гена *EDN1*.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, кандидаткиња је критички образложила добијене резултате, такође их анализирајући у контексту резултата експерименталних студија других истраживача. Поглавље **ДИСКУСИЈА** доприноси разумевању тумачења резултата овог истраживања и њихове будуће применљивости, допуњених резултатима објављеним у савременој научној литератури.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња сумира најважније закључке који произлазе из експерименталног дела докторске дисертације. На основу добијених резултата изведени су следећи закључци:

1. Хаплотип АСА, варијанти rs9349379, rs2026458 и rs2876300, гена *PHACTR1* значајно и независно је асоциран са присуством каротидног плака у односу на референтни хаплотип GTA.
2. Испитиване варијанте гена *PHACTR1* нису асоциране са акутним догађајима у атеросклерози (инфарктом миокарда и цереброваскуларним инсултом), ни појединачно ни у хаплотипу.

3. Ређи алел G, варијанте rs2876300, гена *PHACTR1* асоциран је са вишесудовном болешћу срца, односно тежим обликом атеросклерозе коронарних артерија.
4. Хаплотипови AT и GC, варијанти rs9349379 и rs2026458 гена *PHACTR1* показују значајан хомогени ефекат и независну асоцијацију са вишим вредностима SYNTAX скорa, односно лошијом прогнозом код испитаника са АКОА након перкутане коронарне интервенције.
5. Хаплотипови испитиваних варијанти гена *PHACTR1* нису асоцирани са променама у ехокардиографским параметрима структуре и функције срца, нити са маладаптивним ремоделовањем леве коморе срца шест месеци након инфаркта миокарда.
6. Хаплотип ACG гена *PHACTR1* повезан је са значајно вишим нивоом транскрипције гена *PHACTR1* у каротидном плаку, као и у мононуклеарним ћелијама периферне крви код испитаника са АКОА шест месеци након првог ИМ, у односу на референтни хаплотип GTA.
7. Ниво транскрипције гена *PHACTR1* и *EDN1* у МЋПК код испитаника са АКОА шест месеци након ИМ значајно је повишен у односу на испитанике из контролне групе.
8. Испитиване варијанте гена *PHACTR1* немају значајан утицај на транскрипцију гена *EDN1* у МЋПК код испитаника са АКОА шест месеци након ИМ.

Последње поглавље у докторској дисертацији је поглавље **ЛИТЕРАТУРА** у коме је дата листа библиографских јединица. Листа садржи 150 референци које су адекватно цитиране и на одговарајућим местима у тексту докторске дисертације.

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације**

#### **Б1. Радови у часописима међународног значаја**

**Jovana Kuveljic**, Tamara Djuric, Goran Stankovic, Milica Dekleva, Aleksandra Stankovic, Dragan Alavantic, Maja Zivkovic. Association of *PHACTR1* intronic variants with the first myocardial infarction and their effect on *PHACTR1* mRNA expression in PBMCs. *Gene* (2021) <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145428> **M22**

**Jovana Kuveljic**, Tamara Djuric, Aleksandra Stankovic, Igor Koncar, Dragan Alavantic, Maja Zivkovic. *PHACTR1* haplotypes are associated with carotid plaque presence and affect *PHACTR1* mRNA expression in carotid plaque tissue. *Gene* (2019) <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.06.020> **M22**

#### **Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја**

**Jovana Kuveljic**, Tamara Djuric, Milica Dekleva, Natasa Markovic Nikolic, Aleksandra Stankovic, Dragan Alavantic, Maja Zivkovic. *PHACTR1* mRNA expression is affected by

rs9349379 in PBMCs of patients six months after the first MI. European Human Genetics Virtual Conference “ESHG 2020.2 - Live in Your Living Room” June 6–9, 2020. **M34**

**Kuveljić J**, Djurić T, Životić I, Stanković A, Končar I, Alavantić D, Živković M. Rs9349379 affects *PHACTR1* mRNA expression in carotid atherosclerotic plaque. VI Congress of the Serbian Genetic Society, Vrnjačka Banja, Serbia, October 13<sup>th</sup> - 17<sup>th</sup>, 2019, page 106. **M34**

## **Провера оригиналности докторске дисертације**

Докторска дисертација кандидаткиње Јоване П. Кувелић Б3042/2011 послата је дана 26.05.2021. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор, др Тамара Ђурић Делић, добила је дана 27.05.2021.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Повезаност гена *PHACTR1* са настанком и компликацијама атеросклерозе код човека”, аутора Јоване П. Кувелић, ментор је констатовао да утврђено подударане текста износи 7%. Овај степен подударности последица је преклапања општих места и података, назива инструмената или метода коришћених током израде студије, назива клиника које су учествовале у студији, назива на енглеском језику у оквиру појашњења порекла скраћеница коришћених у тексту, као и претходно публикованих резултата истраживања који су проистекли из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника. Преклапања по сегментима износе 1% или мање од 1%.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, ментор је оценио да извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње Јоване П. Кувелић, под насловом „Повезаност гена *PHACTR1* са настанком и компликацијама атеросклерозе код човека”, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## **Мишљење и предлог Комисије**

Комисија сматра да је Јована П. Кувелић у изради докторске дисертације показала висок степен познавања научне основе проблематике, добро је дефинисала циљеве, применила адекватне методе у истраживању и обради добијених резултата које је критички дискутовала, уз исцрпне податке из литературе. Дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме и садржи све елементе прописане за завршену докторску дисертацију. Добијени резултати истраживања приказани у докторској дисертацији у складу су са постављеним циљевима истраживања, а закључци

произлазе из добијених резултата. Докторска дисертација Јоване П. Кувелић даје оригинални допринос испитивању генске основе кардиоваскуларних болести. У овој студији први пут је испитиван утицај варијанти на транскрипцију гена *PNACTR1* на нивоу хаплотипова као и њихова удруженост, појединачно и у хаплотипу, са настанком и компликацијама каротидне атеросклерозе. Ремоделовање леве коморе срца први пут је испитивано у хуманој популацији, а удруженост са инфарктом миокарда испитивана је ради провере и/или потврде асоцијације и у српској популацији. Резултати указују на то да ген *PNACTR1* доприноси развоју атеросклерозе и тежим облицима болести, али није директно повезан са акутним догађајима у атеросклерози, као ни са процесом ремоделовања срца након ИМ. Ген *PNACTR1* има улогу у атеросклерози у хуманој популацији, будући да су хаплотипови генских варијанти асоцирани са присуством плака у каротидним крвним судовима и да утичу на ниво транскрипције гена *PNACTR1* у каротидном плаку и у мононуклеарним ћелијама периферне крви испитаника са атеросклерозом коронарних артерија шест месеци након првог инфаркта миокарда. Резултати ове докторске дисертације објављени су у два научна рада (категорија M22) у којима је Јована Кувелић први аутор.

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 Јоване П. Кувелић под насловом „**Повезаност гена *PNACTR1* са настанком и компликацијама атеросклерозе код човека**“.

У Београду, 16.06.2021. године

**КОМИСИЈА:**

---

др Тамара Ђурић Делић, научни саветник  
Институт за нуклеарне науке Винча - Институт од  
националног значаја за Републику Србију,  
Универзитет у Београду

---

др Миљана Кецмановић, доцент  
Биолошки факултет,  
Универзитет у Београду

---

др Маја Живковић, научни саветник  
Институт за нуклеарне науке Винча - Институт од  
националног значаја за Републику Србију,  
Универзитет у Београду