

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU  
KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 18.02.2016. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

1. Dr Svetlana Ignjatović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor rada
2. Dr Ljiljana Mirković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, mentor rada
3. Dr Vesna Spasojević – Kalimanovska, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Utvrdivanje povezanosti genskog polimorfizma COMT, TNF- $\alpha$ , TNFR1, IL-1 $\alpha$  i IL-10 sa rizikom pojave rane preeklampsije i njenih komplikacija**” kandidata diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Tijane Krnjeta, zaposlene u kompaniji Roche Diagnostics International Ltd, u Rotkreuz-u, Švajcarska. Komisija je pregledala priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

## **IZVEŠTAJ**

### **A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Tijane Krnjeta pod nazivom „**Utvrdivanje povezanosti genskog polimorfizma COMT, TNF- $\alpha$ , TNFR1, IL-1 $\alpha$  i IL-10 sa rizikom pojave rane preeklampsije i njenih komplikacija**” napisana je jasnim i preglednim stilom na 134 strane, ima 87 tabela, i 177 literaturnih navoda. Sadržaj doktorske disertacije je izložen u sledećim poglavljima: Uvod, Ciljevi rada, Metode rada, Rezultati, Diskusija, Zaključci, i Literatura.

**Uvod** se sastoji iz trinaest delova. U prvom delu objašnjena je klasifikacija i postavljanje dijagnoze preeklampsije, u drugom delu epidemiološki podaci vezani za preeklampsiju, u trećem delu opisan je mehanizam nastanka preeklampsije, u četvrtom i petom delu opisano je predviđanje razvoja preeklampsije i kako se definiše idealan test za predviđanje razvoja preeklampsije, u šestom delu objašnjeni su faktori rizika za razvoj preeklampsije, u sedmom delu objašnjena je predikcija razvoja preeklampsije koja je obuhvatila merenje doplera uterusnih arterija, merenje protoka u fetalnim arterijama, merenje protoka u ostalim arterijskim sudovima, primenu ehokardiografskih indeksa, u osmom delu je objašnjena primena biomarkera u predikciji razvoja preeklampsije koja je obuhvatila između ostalih angiogene biomarkere i placentalni protein 13, u devetom delu je opisana prevencija preeklampsije koja je obuhvatila objašnjenje vezano za redukciju fizičke aktivnosti, mirovanje, smanjen unos soli, primenu suplemenata kalcijuma, vitamina D i antioksidanasa i

primenu antitrombocitne terapije, u desetom delu je objašnjen tretman pacijentkinja sa preeklampsijom i HELLP sindromom, u jedanaestom delu je opisana posebno eklampsija, u dvanaestom HELLP sindrom a u trinaestom delu objašnjeni su genetski faktori rizika uključujući COMT polimorfizam i polimorfizam inflamatornih citokina.

Hipertenzivni poremećaji u trudnoći predstavljaju heterogenu grupu oboljenja koji se klasifikuju na: preeklampsiju-eklampsiju, hroničnu hipertenziju, hroničnu hipertenziju sa superponiranom preeklampsijom i gestacionu hipertenziju. Preeklampsija (PE) se definiše kao novonastala hipertenzija plus novonastala proteinurija posle 20-te nedelje trudnoće. U odsustvu proteinurije, dijagnoza PE se može postaviti na osnovu novonastale hipertenzije prema prethodno definisanim kriterijumima uz pojavu trombocitopenije, oštećene funkcije jetre, novorazvijene bubrežne insuficijencije, plućnog edema ili novonastalih vizuelnih odnosno cerebralnih poremećaja. Težak oblik PE se definiše ispunjavanjem bilo kod od navedenih kriterijuma: sistolni KP od 160 mm Hg ili viši ili dijastolni KP od 110 mm Hg ili viši, trombocitopenija, oštećena funkcija jetre, progresivna bubrežna insuficijencija, plućni edem ili novonastali vizuelni odnosno cerebralni poremećaji. Skorije studije ukazuju na minimalnu korelaciju između veličine proteinurije i ishod trudnoće u preeklampsiji, pa tako masivna proteinurija (> 5 g / 24h) nije više kriterijum za tešku PE.

PE predstavlja jedan od vodećih uzroka mortaliteta i morbiditeta pacijentkinja kao i perinatalnog mortaliteta i morbiditeta. Posebnu pažnju potrebno je posvetiti ranoj PE i teškom obliku PE, jer je potvrđena njihova korelacija sa jako visokim stepenom morbiditeta i čestom pojavom teških zdravstvenih komplikacija. Kod žena sa PE u čak 20-25% slučajeva pokazano je da dolazi do pojave zastoja u rastu (small for gestational age – SGA) kod prevremenih porođaja, odnosno u 14-19% slučajeva SGA kod porođaja u terminu. Studije u Americi su pokazale jaku povezanost PE sa pojavom kongenitalnih anomalija. Više multicentričnih studija pokazalo je da se uspešnim nadzorom pacijentkinja značajno smanjuje morbiditet, mortalitet kao i nivo komplikacija koje se javljaju kod PE. Uspešni nadzor podrazumeva identifikaciju visoko rizičnih pacijentkinja za razvoj PE što je moguće pre, možda čak i pre začeća. Do danas nisu utvrđene metode kojima se precizno može vršiti identifikacija visoko rizičnih pacijentkinja pre začeća. U cilju ispitivanja i predlaganja potencijalnih markera za ranu pouzdanu identifikaciju visokorizičnih pacijentkinja, potrebno je razmotriti mehanizam nastanka PE.

Mehanizam nastanka PE do danas nije u potpunosti razjašnjen, iako su postignuta značajna otkrića na tom polju. Smatra se da je osnova patogeneze PE abnormalni razvoj placente. Kod trudnica kod kojih će se razviti PE dolazi do nedovoljne i plitke invazije citotrofoblasta koja dovodi do razvoja defektne uteroplacentalne cirkulacije i posledično placentalne ishemije. Do sada je predložen veliki broj različitih etiologija nedovoljne (plitke) invazije trofoblasta, međutim i dalje je glavni uzrok ostao nejasan. U prošlosti su postojale tri hipoteze nastanka PE. Prva hipoteza se zasnivala na ideji placentalne ishemije. Smatralo se da je PE dvofazna bolest placente. Naime, u prvoj fazi dolazi do neadekvatne invazije citotrofoblasta placente, koji ugrožava spiralne arterije i dovodi do nedovoljnog snabdevanja placente krvlju. Ishemija placente u drugoj fazi dovodi do sistemske endotelne disfunkcije. Međutim ova hipoteza je naišla na niz ograničenja. Nije dokazana neophodna veća korelacija između majčinskih i

fetalnih komponenti u kliničkoj praksi i hronologija pojave majčinskih komponenti sindroma se ne uklapa u hipotezu placentalne ishemije. Druga hipoteza je podrazumevala poremećaj toksično protektivnih aktivnosti lipoproteina veoma male gustine (VLDL). Slično zabrinutosti prethodne hipoteze, teško se može povezati toliko jaka potražnja za energijom koja će dovesti do preteranog oslobađanja slobodnih masnih kiselina i ispoljavanja citotoksičnih aktivnosti VLDL endotelne ćelije sa ranom disfunkcijom endotela još u prvom trimestru trudnoće. Treća hipoteza je imunomaladaptacija – interakcija između leukocita decidue i citotrofoblasta, kojima se može uzrokovati plitka invazija spiralnih arterija od strane citotrofoblastnih ćelija i endotelna disfunkcija posredovana povećanim oslobađanjem citokina, proteolitičkih enzima i slobodnih radikala u deciduu. Međutim i ova hipoteza je naišla na ograničenja sa pitanjem da li je ova imunološka abnormalnost uzrok ili posledica PE. U poslednjih nekoliko godina izdvojile su se dve kao potencijalne teorije nastanka PE, teorija “prekomernog inflamatornog odgovora” i teorija “disbalansa angiogenih faktora”. Međutim Hill i saradnici su predložili hipotezu kombinovanog prekomernog inflamatornog odgovora i disbalansa angiogenih faktora. Ta hipoteza se može objasniti privremenom povezanošću i pravilom da uzrok mora da se javi pre kliničkih znaka.

Postoji čitav niz faktora rizika koji dovode do pojave PE: prethodna istorija PE, antifosfolipidni sindrom, dijabetes, blizanačka trudnoća, prva trudnoća, porodična istorija PE, povišen krvni pritisak na prijemu, povišen BMI pre trudnoće i na prijemu i starost trudnice > 40 god. Mnoge studije su pokazale da je genetski faktor rizika jedan od najpotentnijih faktora rizika za razvoj PE. Dosadašnjim studijama ispitivan je veliki broj različitih gena i njihovih polimorfizama u cilju otkrivanja potencijalnog markera za detekciju visokorizičnih trudnica (genetski markeri imunološke maladaptacije, markeri povezani sa vaskularnom i endotelnom funkcijom, trombofilijama, oksidativnim stresom itd.).

Katehol-O-metil transferaza (COMT; EC 2.1.1.6) gen predstavlja jedan od gena kandidata za PE sa izuzetnim potencijalom. COMT je jedan od glavnih enzima uključen u inaktivaciju katehol estrogena, koji imaju važnu ulogu u fiziološkom procesu trudnoće i fetalnom razvoju. Pokazano je da kod trudnica sa PE dolazi do smanjene aktivnosti COMT enzima i smanjene produkcije 2-metoksiestradiola (2-MeO-E2), koja najverovatnije dovodi do akumulacije faktora 1 alfa indukovano hipoksijom (HIF-1 $\alpha$ ) i pojačane produkcije sFlt-1. Genetičkom analizom je pokazano da je jedan od funkcionalnih polimorfizama gena koji kodira sintezu membranskog COMT-a, jedna tačkasta genetska mutacija tj. prisustvo guanina (G) umesto adenina (A) baze na poziciji 472 (COMT 472 A>G), koja dovodi do zamene aminokiseline valin sa metioninom na kodonu 158 (COMT Val158Met) i krajnjeg smanjenja aktivnosti COMT enzima. Različite studije pokazale su povezanost tačkaste genetske varijante COMT 472 A>G i razvoja PE odnosno SGA. Lim i saradnici i Liang i saradnici su pokazali povezanost tačkaste genetske varijante COMT 472 A>G sa povećanim rizikom pojave PE. Roten i saradnici su pokazali povezanost tačkaste genetske varijante COMT 472 A>G sa ponovljenom PE. Suprotne rezultate dobili su Hil i saradnici. Oni su pokazali da je majčinski ACCG COMT haplotip, koji ima smanjenu aktivnost COMT enzima i smanjenu produkciju 2-MeO-E2 kod majke, povezan sa smanjenim rizikom pojave PE. Nasuprot tome fetalni ATCA COMT haplotip koji ima smanjenu aktivnost COMT enzima i koji dovodi do smanjene

produkcije 2-MeO-E2 na nivou fetusa, dovodi do povećanog rizika pojave PE. Kao potencijalno objašnjenje predlaže se u vidu smanjene aktivnosti COMT enzima na nivou majke koji pokazuje protektivnu ulogu jer omogućava veću aktivnost COMT enzima i veću produkciju 2-MeO-E2 na nivou placentе. Potrebno je ispitati da li tačkasta genetička varijanta COMT 472 A>G na nivou majke pokazuje protektivnu ulogu ili predstavlja faktor rizika u razvoju rane PE i njenih komplikacija.

Geni koji utiču na ekspresiju i/ili funkcionalnu aktivnost inflamatornih citokina predstavljaju takođe grupu gena kandidata za PE sa izuzetnim potencijalom. Tokom analize 775SNP u 190 gena, Goddard i saradnici su pokazali da tačkasta genska mutacija rs3783550 u genu za IL-1 $\alpha$  korelira sa rizikom razvoja PE, pri čemu citozin (C) alel dovodi do porasta rizika razvoja PE (OR 1,6; 95% CI 1,19 - 2,07;). Hagerty i saradnici su ispitivali povezanost tačkaste genske mutacije interleukina 1-alfa (IL-1 $\alpha$ ) 4845 G>T i rizika razvoja PE. Oni su pokazali da GG genotip značajno povećava rizik razvoja PE (kod crnkinja: OR 11,6; 95% CI 1,5-89,3; kod belkinja: OR 1,7; 95% CI 0,7-3,9). Sledeća grupa tačkastih genskih mutacija kod kojih je ispitivana povezanost sa PE bila je grupa tačkastih genskih mutacija TNF- $\alpha$  -857 C>T i receptora faktora nekroze tumora-alfa tip 1 (TNFR1) 36 A>G. U jednoj studiji je pokazan njihov sinergistički efekat sa tačkastom genskom mutacijom IL-1 $\alpha$  4845 G>T, koja dovodi do povećanja rizika razvoja PE 2.3 puta. Ista studija je pokazala povezanost TNFR1 36 AG/GG genotipa sa povećanim rizikom razvoja PE. Finalno, najviše se ispitivala tačkasta genska mutacija interleukina 10 (IL-10) -1082 A>G, sa najvećim brojem publikovanih studija o povezanosti sa rizikom razvoja PE. Međutim meta-analiza je pokazala da ne postoji povezanost tačkaste genske mutacije IL-10 -1082 A>G i rizika razvoja PE.

U skladu sa tim, **Cilj** doktorske disertacije je bio da se za svaku tačkastu genetičku varijantu: COMT 472 G>A, TNF- $\alpha$  -857 C>T, TNFR1 36 A>G, IL-1 $\alpha$  4845 G>T i IL-10 -1082 A>G ispita udruženost sa rizikom razvoja rane preeklampsije i njenih komplikacija, teškog oblika rane preeklampsije i rane preeklampsije komplikovane zastojem u rastu. Prvo je bilo potrebno da se ispita genotipski model, nekorigovan pa korigovan za uticaj kofaktora (godine i telesna masa). Zatim za svaku tačkastu genetičku varijantu: COMT 472 G>A, TNF- $\alpha$  -857 C>T, TNFR1 36 A>G, IL-1 $\alpha$  4845 G>T i IL-10 -1082 A>G bilo je potrebno da se ispita njena udruženost sa rizikom razvoja rane preeklampsije i komplikacija, teškog oblika rane preeklampsije i rane preeklampsije komplikovane zastojem u rastu kao alelski model, alelski recesivni i alelski dominantni model. Svaki model je bilo potrebno prvo ispitati nekorigovanog, pa onda korigovanog za uticaj kofaktora. Na kraju, za tačkaste genetičke varijante koje su pokazale statistički značajnu korelaciju, bilo je potrebno da se ispita njihova potencijalna interakcija i udruženost te interakcije sa rizikom razvoja rane preeklampsije i njenih komplikacija.

U poglavlju **Metode rada** dati su podaci o vremenu i mestu istraživanja, ispitanicima – jedinicama posmatranja, kliničkoj metodologiji i statističkoj metodologiji.

Studija je sprovedena na Klinici za ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra Srbije u Beogradu u periodu između septembra 2012. godine i decembra 2013. godine.

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije. Svi ispitanici su detaljno informisani o studiji i samo ispitanici koji su potpisali informativni pristanak su ušli u studiju.

Studija je obuhvatila dve grupe ispitanika. Prvu grupu je činilo 47 pacijentkinja sa ranom PE, dok je drugu grupu činilo 47 zdravih ispitanica (kontrolna grupa). Grupa pacijentkinja sa PE je podeljena u dve podgrupe prema dva različita kriterijuma. Prema prvom kriterijumu, prva podgrupa čini 33 pacijentkinje sa teškim oblikom PE, dok drugu podgrupu čini 14 pacijentkinja sa oblikom PE bez teških karakteristika. Podela pacijentkinja prema drugom kriterijumu je takođe na dve podrupe, s tim što je umesto prema težini PE, podela bazirana prema težini novorođenčeta. Prvu podgrupu čini 12 pacijentkinja koje su rodile dete sa težinom adekvatnom za gestacionu starost, AGA (eng. Appropriate for Gestational Age, AGA), dok drugu podgrupu čini 35 pacijentkinja sa težinom novorođenčeta manjom za gestacionu starost, SGA (eng. Small for Gestational Age, SGA). PE, rana PE i teška PE su definisane prema Radnoj grupi Američkog koledža za ginekologiju i akušerstvo za hipertenziju i trudnoću (ACOG 2013). AGA i SGA su definisani prema distribuciji telesne težine novorođenčadi u srpskoj populaciji (Zavod za statistiku Republike Srbije) za 2010. godinu. Kriterijumi za uključanje bili su: potpisan pristanak za ulazak u studiju, starost trudnice veća od 18 godina i klinički potvrđena dijagnoza PE (za eksperimentalnu grupu). Kriterijumi za isključenje iz studije bili su: trudnoća sa poznatim abnormalnim fetalnim kariotipom, trudnoća sa poznatom hromozomskom aberacijom, multifetalna gestacija, gestaciona hipertenzija bez proteinurije, hronična hipertenzija, dijabetes mellitus, kardiovaskularna bolest, autoimuno oboljenje i hronična bolest bubrega jer se one smatraju faktorima rizika za razvoj PE. Kontrolnu grupu su činile trudnice sa zdravom jednoplodnom trudnoćom koje su trudnoću i porođaj vodile, odnosno sprovele na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Ove ispitanice imale su kriterijum za uključanje gestacionu starost 37 i više nedelja u vreme porođaja i trudnoća koja je prošla bez komplikacija.

Prenatalna nega je sprovedena prema vodičima i protokolima Klinike. Pacijentkinje su po prijemu na Kliniku pregledane i uzeta im je kompletna anamneza. Pregled je obuhvatio ginekološki i osnovni internistički pregled. Na osnovu anamnestičkog podatka o poslednjoj menstruaciji izračunat je gestacijski uzrast. Svakoj pacijentkinji su uzete antropometrijske mere, visina i telesna masa (TM), i na osnovu njih izračunat je indeks telesne mase (ITM). Indeks telesne mase izračunat je po formuli:  $ITM = TM \text{ (kg)} / TV^2 \text{ (cm)}$ . Sistolni i dijastolni krvni pritisak su mereni u miru, pola sata nakon dolaska u bolnicu, u sedećem položaju. Svakoj pacijentkinji je uzeta krv za analizu. Analize iz krvi obuhvatile su osnovne laboratorijske analize (krvna slika i biohemija) i specifične (DNK analiza).

Deo analizirane EDTA pune krvi je zamrznut na temperaturu od  $-70^{\circ}\text{C}$  za DNK ekstrakciju i genotipizaciju. Izolacija DNK iz  $200\mu\text{L}$  periferne krvi je urađena komercijalnim setom za izolaciju DNK (Roche Diagnostics), u skladu sa uputstvima proizvođača. Detekcija prisustva mutacije inflamatornih citokina i COMT je urađena pomoću amplifikacije lančane reakcije DNK. Amplifikacija je urađena PCR metodom pomoću GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Produkt PCR reakcije za polimorfizam inflamatornih citokina je

razgrađen EXOsap IT enzimom. Sanger sekvencioni metod je korišćen da bi se analizirali očekivani polimorfizmi pomoću uređaja Genetic Analyzer Applied Biosystem 3130. Sekvence su analizirane u Software Sequencing Analysis 5.2 sa 36 cm kapilarnom i POP7 polimerom. Proizvod PCR reakcije za COMT polimorfizam je sečen pomoću enzima NlaIII (HinIII Thermo SCIENTIFIC). Elektroforetska separacija je urađena u 2.5% agar gelu koji sadrži etidijum bromid. Nakon digestije fragmenti enzima su vizualizovani pod ultraljubičastom svetlošću na transiluminaciji (Wilber Lourmat).

Na porođaju je beležen tip porođaja (carski rez ili vaginalni), gestacijska starost je izračunata i merena je telesna težina novorođenčadi. Pored navedenih, APGAR skor je beležen.

U ovoj studiji korišćene su deskriptivne i analitičke statističke metode. Od deskriptivnih, korišćeni su: apsolutni i relativni brojevi (n,%), mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere disperzije (standardna devijacija, interval varijacije, interkvartilni raspon). Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike i analiza povezanosti. Testovi razlike korišćeni u ovoj studiji su parametarski (t test) i nemaparametarski (Mann-Whitney U test, Chi-kvadrat test).

Empirijska frekvencija genotipova testirana je u odnosu teorijsku (Hardy-Weinberg equilibrium) pomoću Chi kvadrat testa slaganja za dva stepena slobode. Genotipska i alelska frekvencija je komparirana između svih slučajeva PE i njihovih kontrola Chi-kvadrat testom i binarnom logističkom regresijom. U regresionoj analizi, kao zavisna uzeta je varijabla PE (da/ne), oblik PE (lakši/teži) i težina novorođenčeta (AGA/SGA). Kao nezavisne, korišćeni su genetski polimorfizmi i aleli. U svakoj analizi je računat količnik šansi (eng. Odds Ratio) sa 95% intervalom poverenja. Kao referentna kategorija u analizi uzet je homozigot za češći alel. U situaciji da neka od kategorija ima frekvenciju 0, korišćena je egzaktna logistička regresiona analiza.

Uzimajući u obzir da se radi o dominantnom modelu i učestalost retkog alela 0.34, moć studije da se detektuje efekat genetike  $OR=0.2$  za grešku prvog tipa od 0.05 iznosi  $1-\beta=0.78$ . Moć studije izračunata je na pomoću kalkulatora Genetic Power Calculator

Svi podaci su obrađeni u R softverskom paketu verzija 3.1.0 (R Core Team 2014).

Poglavlje **Rezultati** sastoji se iz sedam delova. U prvom delu ispitivane su opšte karakteristike pacijentkinja. Od opštih karakteristika koje su analizirane, praćena je starost u godinama, gestacijski uzrast u danima, indeks telesne mase, krvni pritisak (sistolni i dijastolni), proteinurija i telesna masa na rođenju. Svaka karakteristika je prikazana kao sredna vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

Prvo je izvršeno poređenje kliničkih karakteristika pacijentkinja sa PE sa kontrolnom grupom. Ispitivano je da li postoji statistički značajna razlika za svaku od navedenih opštih karakteristika i navedeno je koje su to karakteristike.

Zatim su posebno ispitivane kliničke karakteristike pacijentkinja sa oblikom PE bez teških karakteristika i posebno pacijentkinja sa teškim oblikom PE. Vršeno je njihovo poređenje u odnosu na kontrolnu grupu, i analiziralo se gde je uočena statistički značajna razlika.

Posebno su ispitivane kliničke karakteristike pacijentkinja sa PE AGA i vršeno je njihovo poređenje karakteristika u odnosu na kontrolnu grupu. Isti postupak ponovljen je za pacijentkinje sa PE SGA i vršeno je poređenje u odnosu na kontrolnu grupu. Analizirana je pojava statistički značajne razlike.

Testiranje Hardy-Weinberg ravnoteže na genskim lokusima COMT, IL-1 $\alpha$ , IL10, TNF- $\alpha$ , TINFRI u kontrolnoj grupi ispitanica bilo je neophodno zbog malog broja ispitivanih pacijentkinja i procene da li postoji ozbiljna devijacija od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE) u ispitivanim lokusima. Ona bi trebalo da pomogne u ispitivanju da li je odabran reprezentativan uzorak. U slučaju kada je devijacija od HWE mala za određeni lokus u kontrolnoj grupi, ona može da ukaže da dobijeni zaključci za taj lokus mogu da se iplementiraju na veći populaciju.

Ispitan je COMT polimorfizam kod pacijentkinja sa PE i podrupama PE u poređenju sa kontrolnom grupom. Izvršeno je ispitivanje učestalosti COMT polimorfizma prema opštem, alelskom, autozomno dominantnom i autozomno recesivnom tipu nasleđivanja.

Prvo je rađen genotipski model: ispitana distribucija pacijentkinja po COMT genotipovima (wild type, heterozigot, homozigot) prema opštem modelu. Dalja analiza obuhvatila je ispitivanje učestalosti COMT genotipova (wild type, heterozigota, homozigota) prema podgrupama pacijentkinja sa lakšim i teškim oblikom u poređenju sa kontrolnom grupom. Urađen je logistički regresioni model sa teškom PE i PE bez teških karakteristika kao zavisnim i genotipom COMT kao nezavisnom. Ispitivane su učestalosti COMT genotipova (wild type, heterozigota, homozigota) prema podgrupama pacijentkinja sa PE AGA i PE SGA u poređenju sa kontrolnom grupom. Dalja analiza predstavljala je logistički regresioni model sa AGA i SGA kao ishodima, odnosno šansom da dođe do PE AGA ili PE SGA u odnosu na kontrolnu grupu.

Zatim je ispitivan alelski model za COMT gen u grupi pacijentkinja sa PE i kontrolnoj grupi i distribucija i količnik šansi. Dalja analiza u alelskom modelu predstavljala je logistički regresioni model sa teškom PE i PE bez teških karakteristika kao ishodima, odnosno šansa da dođe do teške PE ili PE bez teških karakteristika u odnosu na kontrolnu grupu. Za kraj alelskog modela ispitana je distribucija alela COMT gena prema podgrupama PE (AGA i SGA). Urađena je logistička regresiona analiza za svaki ishod (SGA i AGA) posebno.

Sledeći je ispitivan autozomno dominantni (AD) model. Ispitivana je distribucija pacijentkinja u odnosu na varijante COMT alela (ValVal vs Val-Met, Met-Met), prema autozomno dominantnom modelu. U sledećoj analizi je ispitivana distribucija alela COMT gena prema podgrupama PE (lakši i teži oblik) prema AD tipu nasleđivanja. Dalja analiza predstavlja logistički regresioni model sa teškom PE i PE bez teških karakteristika kao ishodima, odnosno šansa da dođe do teške PE ili PE bez teških karakteristika u odnosu na kontrolnu grupu. Ispitivana je distribucija alela COMT gena prema podgrupama PE (AGA i SGA) prema AD tipu nasleđivanja. Dalja analiza je predstavljala logistički regresioni model sa AGA i SGA kao ishodima, odnosno šansa da dođe do AGA ili SGA u odnosu na kontrolnu grupu.

Za kraj je ispitivan autozomno recesivni (AR) model. Ispitivana je distribucija pacijentkinja u odnosu na varijante COMT alela (ValVal vs Val-Met, Met-Met), prema autozomno recesivnom modelu. U sledećoj analizi je ispitivana distribucija alela COMT gena prema podgrupama PE (lakši i teži oblik) prema AR tipu nasleđivanja. Dalja analiza predstavlja logistički regresioni model sa teškom PE i PE bez teških karakteristika kao ishodom, odnosno šansa da dođe do teške PE ili PE bez teških karakteristika u odnosu na kontrolnu grupu. Ispitivana je distribucija alela COMT gena prema podgrupama PE (AGA i SGA) prema AR tipu nasleđivanja. Dalja analiza je predstavljala logistički regresioni model sa AGA i SGA kao ishodom, odnosno šansa da dođe do AGA ili SGA u odnosu na kontrolnu grupu.

Postupak ispitivanja uključujući genotipski model, alelski model, AD i AR model je ponovljen za svaki pojedinačno od ispitivanih polimorfizama (TNF- $\alpha$ , TNFR1, IL-1 $\alpha$  i IL-10).

Za kraj je prikazan multivarijantni binarni logistički model sa PE kao ishodom, kada se analiza koriguje za indeks telesne mase i starost pacijentkinje. Nakon ovoga je ispitana interakcija između navedenih polimorfizama radi kreiranja potencijalnog modela za procenu genetskog rizika za razvoj PE. Ako su ova dva lokusa nezavisni, tada osoba koja nosi oba alela ima OR1\*OR2 puta veću šansu da oboli po čisto aditivnom modelu. Ako pak, postoji neki oblik interakcije između ta dva lokusa, u smislu da uticaj jednog na uticaj drugog utiče na pojavu PE, tada će observirani OR (OR računat direktno iz podataka) biti znatno različit u odnosu na prost umnožak OR1 i OR2. Tada će, takođe interakcija za neku od kombinacija genotipa/lokusa biti značajna ( $p < 0.05$ ) u logističkim regresionim modelima.

## **B. Opis postignutih rezultata**

Pacijentkinje sa PE su u proseku bile starije i imale veći indeks telesne mase, više vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska u poređenju sa pacijentkinjama iz kontrolne grupe. Pacijentkinje iz kontrolne grupe nisu imale prisutne proteine u urinu, za razliku od pacijentkinja sa PE. Novorođenčad majki sa PE su imala u proseku, dvostruko manju telesnu masu i manji gestacijski uzrast u poređenju sa novorođenčadima majki iz kontrolne grupe. Pacijentkinje sa teškim oblikom PE su bile u proseku starije i imale veći indeks telesne mase, u poređenju sa pacijentkinjama iz kontrolne grup, dok su pacijentkinje sa oblikom PE bez teških karakteristika imale samo više prosečne vrednosti ITM dok starost nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolnu grupu.

Testiranje Hardy-Weinberg ravnoteže na genskim lokusima COMT, IL-1 $\alpha$ , IL10, TNF- $\alpha$ , TNFR1 u kontrolnoj grupi ispitanica je pokazalo sledeće: D vrednosti za IL10, TNF- $\alpha$  i TNFR1 ukazuju da verovatno postoji ozbiljna devijacija od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE) u ispitivanim lokusima, međutim uzorak je premali da bi to bilo dokumentovano i statističkim testom. Sa druge strane, sa priličnom sigurnošću možemo da tvrdimo da su HWE pretpostavke održive u slučaju COMT lokusa i, u nesto manjoj meri, IL-1 $\alpha$  lokusa.



U genotipskoj analizi COMT genskog polimorfizma, učestalost PE je bila najveća u heterozigotnoj grupi (nije uočena statistička značajnost,  $p=0,756$ ), dok je bila najmanja u homozigotnoj grupi ( $OR=0,308; 95\%IP=0,096-0,984$ ), što je bilo i statistički značajno ( $p=0,047$ ). Logističkom regresionom analizom nije uočena statistički značajna povezanost heterozigota odnosno homozigota sa rizikom razvoja teške odnosno PE bez teških karakteristika ( $p=0,062$ ;  $p=0,465$  i  $p=0,268$  respektivno). Isto je pokazano i u odnosu na rizik razvoja PE sa SGA odnosno AGA ( $p=0,691$ ;  $p=0,268$ ;  $p=0,842$  i  $p=0,062$  respektivno). U alelskoj analizi, Hi-kvadrat testom je utvrđeno da je razlika između alela statistički značajna ( $X^2=4,801$ ;  $p=0,028$ ), a količnik šansi pokazuje da ukoliko se radi o Met alelu, šansa da dođe do PE je dva puta manja u odnosu na Val alel ( $OR=0,524; 95\%IP=0,294-0,937$ ). Ako se poredi teška PE sa kontrolnom grupom, Met alel ima veću učestalost u kontrolnoj grupi ( $OR=0,509; 95\%IP=0,269-0,963$ ) a logističkom regresijom je pokazano da prisustvo ovog alela dva puta smanjuje šansu da dođe do razvoja teške PE i ova šansa je statistički značajna ( $p=0,038$ ). Kod oblika PE bez teških karakteristika, izostaje statistička značajnost ( $p=0,185$ ). U logističkoj regresionoj analizi sa AGA i SGA, uočena je statistički značajna šansa ( $p=0,039$ ) da dođe do PE sa AGA. Šansa je dva puta manja ukoliko se radi o Met alelu u odnosu na Val alel. U autozomno recesivnom modelu, pokazano je da šansa da dođe do PE je gotovo četiri puta manja ukoliko se radi o Me-Met u odnosu na Val-Val/Met-Val ( $OR=0,277; 95\%IP=0,107-0,720$ ). Navedena šansa je bila statistički značajna ( $p=0,008$ ). Šansa da dodje do razvoja teške PE je manja ukoliko je prisutan Met-Met ( $OR=0,300; 95\%IP=0,104-0,863$ ), a ova šansa je bila statistički značajna ( $p=0,026$ ). Grupa Met-Met ima takođe četiri puta manju šansu za PE sa AGA u odnosu na Val-Val/Met-Val ( $OR=0,279; 95\%IP=0,098-0,800$ ) i ova šansa je statistički značajna ( $p=0,018$ ).

IL-1 $\alpha$  GT genotip je u genotipskoj analizi pokazao povezanost sa manjom učestalošću PE u heterozigotnoj grupi ( $OR=0,225; 95\%IP=0,081-0,624$ ), dok je još manja bila u homozigotnoj grupi ( $OR=0,165; 95\%IP=0,032-0,867$ ). U oba slučaja je uočena statistička značajnost ( $p=0,004$  i  $p=0,033$ ). Na osnovu Hi-kvadrat testa utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ove tri grupe po ishodu ( $X^2=11,884$ ;  $p=0,002$ ). Logističkom regresionom analizom je pokazano da je manja šansa da dođe do teške PE ( $OR=0,282; 95\%IP=0,095-0,834$ ) odnosno PE bez teških karakteristika ( $OR=0,102; 95\%IP=0,012-0,860$ ) ukoliko se radi o GT genotipu. Statistički najznačajnija razlika uočena je u autozomno dominantnom modelu. Pokazano je da šansa da dođe do PE je gotovo pet puta manja ukoliko se radi o GT i TT u odnosu na GG ( $OR=0,208; 95\%IP=0,083-0,526$ ), uz statističku značajnost  $p=0,001$ . Šansa da dođe do razvoja teške PE odnosno PE bez teških karakteristika je četiri ( $OR=0,237; 95\%IP=0,086-0,652$ ), odnosno deset puta manja ( $OR=0,105; 95\%IP=0,021-0,513$ ) ukoliko se radi o GT i TT alelima u odnosu na GG. Obe ove šanse su statistički značajne ( $p=0,005$  u oba slučaja). Šansa da dođe do PE sa SGA, odnosno PE sa AGA je četiri ( $OR=0,261; 95\%IP=0,098-0,691$ ), odnosno dvanaest puta manja ( $OR=0,080; 95\%IP=0,010-0,670$ ) ukoliko se radi o GT i TT grupi u odnosu na GG grupu. Obe šanse su statistički značajne ( $p=0,020$  i  $p=0,004$  respektivno).

Za IL-10, TNF- $\alpha$  i TNFR1 logističkom regresionom analizom nigde nije uočena statistički značajna razlika u asocijaciji genotipova odnosno alela (dominantni i recesivni model) sa rizikom razvoja PE i njenih komplikacija, teškog oblika PE i PE sa SGA.

Distribucija pacijentkinja po IL-10 genotipovima (GG, GA i AA) prema opštem modelu je na osnovu Chi-kvadrat testa pokazala da nema statistički značajne razlike između ove tri grupe po ishodu ( $X^2=0.503$ ;  $p=0,791$ ). Iz rezultata se vidi da je učestalost PE vrlo slična u sve tri ispitivane grupe sa malim varijacijama. distribucija pacijentkinja sa teške PE veća nego PE bez teških karakteristika, a distribucija grupa po ishodu je vrlo slična. Testirajući ove distribucije hi-kvadrat testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa ( $X^2=1,006$ ;  $p=0,922$ ). Logističkom regresionom analizom je pokazano da je šansa da dođe do teške PE i PE bez teških karakteristika je veća ukoliko se radi o GA umesto GG genotipu. Istom analizom je utvrđeno da je šansa da dođe do teške PE dva puta manja ukoliko se radi o AA umesto GG, a za 38% da dođe do PE bez teških karakteristika je veća ukoliko se radi o AA umesto GG. Ipak, nijedna od navedenih šansi nije statistički značajna. Na osnovu distribucije pacijentkinja utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između grupa po učestalostima kontrolne grupe, PE sa AGA i PE sa SGA ( $X^2=1,108$ ;  $p=0,906$ ). Videlo se da se radi o sličnim distribucijama sa manjim varijacijama u određenim grupama. šansa da dođe do AGA i SGA nešto veća ukoliko se radi o GA umesto GG. Nasuprot, šansa da dođe do SGA je dva puta manja ukoliko se radi o AA umesto GG genotipu, a za 38% veća da dođe do AGA ukoliko se radi o istom genotipu. Nijedna od navedenih šansi nije statistički značajna. U alelskom modelu, Chi-kvadrat testom je utvrđeno da između alela nema statistički značajne razlike ( $X^2=0.027$ ;  $p=0,870$ ), a količnik šansi pokazuje da ukoliko se radi o A alelu, šansa da dođe do PE je vrlo malo veća (za 5%) u odnosu na G alel. Ova šansa nije statistički značajna. Logističkom regresijom je pokazano da prisustvo A alela ne utiče na pojavu teške PE, dok ima veću šansu da dođe do PE bez teških karakteristika ali obe šanse nisu statistički značajne. U autozomno dominantnom modelu distribucija pacijentkinja sa PE je vrlo slična u obe grupe, a statističkom analizom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike po učestalosti PE ( $X^2=0,170$ ;  $p=0,680$ ). Logističkom regresionom analizom je potvrđen mali uticaj GA i AA za PE u odnosu na GG grupu. Šansa da dođe do teške PE je beznačajno veća ukoliko se radi o GA i AA u odnosu na GG, dok je za gotovo 50% veća da dođe do PE bez teških karakteristika ukoliko se radi o GA i AA umesto GG, ali nijedna od navedenih šansi nije statistički značajna. Kao i u prethodnoj analizi i ovde nema statističke značajnosti ali je evidentno da prisustvo GT i TT u blagom stepenu favorizuje AGA i SGA. U autozomno recesivnom modelu, distribucija pacijentkinja je vrlo slična, a statističkom analizom je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa ( $X^2=0.211$ ;  $p=1.000$ ). Šansa da dođe do teške PE je dva puta manja ukoliko se radi o AA umesto GG i AA, dok je šansa da dođe do PE bez teških karakteristika je neznatno veća ukoliko se radi o istoj grupi. Nijedna od navedenih šansi nije statistički značajna. Kao i u svim prethodnim analizama, nema značajnih šansi ali je evidentno da je veća šansa da bude AGA, odnosno manja da bude SGA ukoliko se radi o AA alelu umesto GG i GA.

Ispitivanje TNF polimorfizama kod pacijentkinja sa preeklamsijom i podrupama PE u poređenju sa kontrolnom grupom je pokazalo sledeće: Na osnovu Hi-kvadrat testa utvrđeno je

da nema statistički značajne razlike između ove tri grupe po ishodu ( $X^2=0.729$ ;  $p=0,817$ ). Iz rezultata se vidi da je učestalost PE vrlo slična u sve tri ispitivane grupe sa malim varijacijama. Distribucija pacijentkinja sa teškom PE je veća nego sa PE bez teških karakteristika, a distribucija grupa po ishodu je vrlo slična. Testirajući ove distribucije hi-kvadrat testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa ( $X^2=1.727$ ;  $p=0,797$ ). Šansa da dođe do teške PE i PE bez teških karakteristika je veća ukoliko se radi o CT umesto CC genotipu. Istom analizom je utvrđeno da je šansa da dođe do TPE za 75% veća ukoliko se radi o TT umesto CC genotipu (75% veća). Nema statistički značajne razlike između grupa po učestalostima kontrolne grupe, PE sa AGA i PE sa SGA ( $X^2=1.605$ ;  $p=0,816$ ). Šansa da dođe do AGA i SGA je nešto veća ukoliko se radi o CT umesto GG. Isti rezultati dobijaju se i kada je u pitanju TT vezano za SGA. Ipak, nijedna od šansi nije statistički značajna. U alelskom modelu, Hi-kvadrat testom je utvrđeno da između alela nema statistički značajne razlike ( $X^2=0.461$ ;  $p=0,497$ ), a količnik šansi pokazuje da ukoliko se radi o T alelu, šansa da dođe do PE je veća (za 25%) u odnosu na C alel. Ova šansa nije statistički značajna. Logističkom regresijom je pokazano da prisustvo T alela ima za 40% veću šansu za pojavom teške PE, dok na PE bez teških karakteristika ne utiče, odnosno utiče zanemarljivo malo, ali obe šanse nisu statistički značajne. Šansa da dođe do AGA je manja dok je šansa da dođe do SGA veća ukoliko se radi o T alelu u odnosu na C alel. Regresionim modelom je utvrđeno da nijedna šansa nije statistički značajna. U autozomno dominantnom modelu, distribucija pacijentkinja sa PE je vrlo slična u obe grupe, a statističkom analizom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike po učestalosti PE ( $X^2=0.689$ ;  $p=0,407$ ). Logističkom regresionom analizom je potvrđen mali uticaj CT i TT za PE u odnosu na CC grupu. Šansa da dođe do teške PE je za 56% veća ukoliko se radi o CT i TT umesto CC, dok je za 10% veća da dođe do PE bez teških karakteristika ukoliko se radi o CT i TT umesto CC, ali nijedna od navedenih šansi nije statistički značajna. Nema statističke značajnosti ali je evidentno da prisustvo CT i TT u blagom stepenu, gotovo zanemarljivo, favorizuje AGA i u većem stepenu favorizuje SGA. U autozomno recesivnom modelu, distribucija pacijentkinja je identična, pa nema potrebe da se radi statistička analiza. Šansa da dođe do teške PE je za 45% veća ukoliko se radi o TT umesto CC i CT. Ova šansa nije statistički značajna. Nema značajnih šansi ali je evidentno da je veća šansa da bude SGA, odnosno manja da bude AGA ukoliko se radi o TT alelu umesto CC i CT.

U multivarijantnom regresionom modelu, prisustvo COMT-Met alela u homozigotnom stanju smanjuje 3.2 puta šansu za razvoj PE ( $OR=0,308$ ;  $95\%IP=0,091-0,960$ ), kao i IL-1 $\alpha$  "T" alel, koji smanjuje šansu za razvoj PE skoro šest puta ( $OR=0,167$ ;  $95\%IP=0,048-0,508$ ). To je efekat koji postoji čak i kada se isključi uticaj ITM i starosti. Uočena je značajna interakcija između COMT (Met) i TNF- $\alpha$  (T) alela, tj. da ako su oba alela prisutna, to povećava šansu za PE još 2.765 puta u odnosu na prosti umnožak OR za svaki lokus posebno. Problem nastaje kada se koriguje za starost i ITM, jer se značajnost gubi ( $p>0,05$ ). Interakcija između COMT (Met) i IL-10 (A) je na granici konvencionalnog nivoa značajnosti od 0,05 i kada je nekorigovana i kada je korigovana za starost i ITM. Količnik šansi za kombinaciju se u ovom slučaju znatno razlikuje od umnoška OR-ova za svaki alel posebno, tj. skoro tri puta je veći, što govori o tome da istovremeno prisustvo IL-10 A alela smanjuje protektivni efekat COMT Met alela na razvoj PE 2.71 puta.

U genotipskom modelu kao ključni polimorfizmi gena koji se mogu dovesti u asocijaciju sa ranom PE su COMT 472 G>A i IL-1 $\alpha$  4845 G>T. Homozigot za COMT gen povezan je sa smanjenim rizikom razvoja PE, dok su i homozigot i heterozigot za IL-1 $\alpha$  pokazali značajnu vezu sa razvojem rane PE u smislu manjeg rizika. Heterozigot za IL-1 $\alpha$  jedini je polimorfizam od ispitivanih gena koji pokazuje povezanost sa teškim oblikom PE i sa PE sa manjom telesnom masom za gestacijski uzrast. Povezanost IL-10 i TNF- $\alpha$  i nastanka rane PE i njenih komplikacija nije dokazana ovom studijom.

### **C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature**

U doktorskoj disertaciji je pokazano da u genotipskom modelu ključni polimorfizmi gena koji se mogu dovesti u asocijaciju sa ranom PE su COMT 472 G>A i IL-1 $\alpha$  4845 G>T. Homozigot za COMT gen povezan je sa smanjenim rizikom razvoja PE, dok su i homozigot i heterozigot za IL-1 $\alpha$  pokazali značajnu vezu sa razvojem rane PE u smislu manjeg rizika. Heterozigot za IL-1 $\alpha$  je jedini polimorfizam od ispitivanih gena koji pokazuje povezanost sa teškim oblikom PE i sa PE sa manjom telesnom masom za gestacijski uzrast. Povezanost IL-10 i TNF $\alpha$  i nastanka rane PE i njenih komplikacija nije dokazana ovom studijom.

Statističkim genetskim analizama je testirana distribucija genotipova u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu. Međutim, navedeni model ima nekoliko pretpostavki od kojih je i ta da populacija treba da bude velika (Hartl DL, et al. Sinauer Assoc Inc. 2000). Uzorak se sastojao od 47 pacijentkinja kontrolne grupe što predstavlja mali uzorak, kada su u pitanju epigenetske analize. Ipak, na osnovu dobijenih rezultata jasno je da u slučaju COMT i IL1 postoji ravnoteža po HWE, dok su IL10 i TNF alpha diskutabilni. To je jedan od razloga za moguću distorziju rezultata prilikom ispitivanja ova dva gena u etiologiji Pe u studiji.

Jedan od gena koji se u poslednjoj dekadi pojavio kao potencijalni kandidat za razvoj PE i može se povezati sa angiogenetskim disbalansom je COMT gen (Kanasaki K, et al. Nature 2008). Kanasaki i saradnici su pioniri ispitivanja uticaja genetske osnove COMT-a na razvoj PE (150). Oni su na animalnom "nok-aut" mišjem modelu pokazali značaj smanjene ekspresije COMT gena u razvoju PE. Ali, iako je ova studija bila revolucionarna na polju PE kada je u pitanju genetska osnova, najveća limitacija iste je bila odsustvo diferencijacije majčine i fetalne aktivnosti COMT-a. Studije novijeg datuma pokazale su da postoji različit uticaj COMT aktivnosti majke i placente (Hill ED, et al. PloS One 2011). U studiji Hill i saradnici pokazano je da je snižena aktivnost COMT-a protektivan faktor u razvoju PE zato što isti stimuliše placentu da produkuje 2-ME. Nasuprot majčinom COMT aktivnosti, placentalna niska aktivnost COMT gena je ključni faktor u razvoju PE. Sada je jasno da postoje dijametralno suprotni efekti COMT-a zavisno da li se radi o majčinom ili placentalnom.

Pokazano je da je COMT među ključnim enzimima koji su zaduženi za inaktivaciju katehol-estrogena (Zhu BT, et al. Drug Metab Dispos 2010). Katehol-estrogeni igraju važnu ulogu u toku trudnoće i razvoju fetusa. Naime, značajno povećanje u produkciji katehol-estrogena u trudnoći je verovatno zbog povećane aktivnosti placentne. Placenta ima visoku aktivnost

estrogen 2-hidroksilaze koja produkuje 2-hidroksiestradiol i 4-hidroksiestradiol i COMT enzim koji konvertuje ova dva u 2-metoksiestradiol. U prisustvu COMT-a, 2-metoksiestradiol suprimira hipoksija-inducibilni faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) nakupljanje i produkciju solubilne tirozin kinaze 1 (sFLT-1) (Zhu BT, et al. *Curr Drug Metab* 2002). Utvrđeno je da kod PE, COMT ima smanjenu aktivnost koja dovodi do smanjene produkcije 2-metoksiestradiola, akumuliranja HIF-1 $\alpha$  i povećane produkcije sFlt-1 (Barnea ER, et al. *Am J Perinatal* 1988). Animalni model je pokazao da kod COMT -/- miševa, povećana koncentracija HIF-1 $\alpha$  uzrokuje povećanu produkciju sFlt-1 a time uzrokuje i inflamatornu reakciju i endotelnu disfunkciju (Kanasaki K, et al. *Nature* 2008).

U studiji Lim i saradnika je pokazano da postoji povezanost između Val158Met COMT polimorfizma i povećanog rizika za nastanak PE u različitim grupama pacijentkinja (Lim JH, et al. *Pharmacogenet Genomics*. 2010). Studija koja se nastavlja na navedenu ukazuje da fetalni Val158Met COMT polimorfizam korelira sa povećanim rizikom za PE, a majčin Val158Met COMT polimorfizam ima protektivnu ulogu, kada je u pitanju nastanak PE (Hill ED, et al. *PLoS One* 2011). Studija Roten i saradnika pokazala je da postoji korelacija između Val158Met genotipa i rekurentne PE, ali nije pronađena veza između Val158Met genotipa i ne-rekurentne PE (Roten LT, et al. *Mol Hum Reprod*. 2011).

Rezultati teze ukazuju da su pacijentkinje sa COMT heterozigotom u nešto većem riziku za nastanak preeklampsije (ali bez statističke značajnosti), dok pacijentkinje sa homozigotom imaju tri puta manju šansu za razvoj PE i ova šansa je statistički značajna. Dodatno kada se analize urade posebno za teški oblik PE i oblik PE bez teških karakteristika u odnosu na kontrolnu grupu dobijaju se isti zaključci. Homozigot u ovim analizama takođe ima tri puta manju šansu za razvoj PE u odnosu na WT. I analiza sa AGA i SGA u odnosu na kontrolnu grupu pokazuje gotovo identične rezultate kao i kada je u pitanju težina PE, odnosno homozigot ima tri puta manju šansu za razvoj PE sa SGA, dok heterozigot nema statističku značajnost. U prethodnim analizama je pokazano da težina PE korelira sa telesnom masom na rođenju, pa je evidentno da ukoliko je homozigot, logično je da je manja šansa da dođe do PE, a takođe i manja šansa da dođe do teškog, odnosno oblika PE bez teških karakteristika. Može se zaključiti da smanjena aktivnost COMT gena ima protektivan efekat na nastanak PE, kao i na smanjenu telesnu masu na rođenju za uzrast kod pacijentkinja sa PE u odnosu na kontrolnu grupu.

Alelski model je pokazao da prisustvo Met alela umanjuje šansu da dođe do PE gotovo dva puta u odnosu na Val alel. Isti zaključak se dobija i kada je u pitanju težina PE i AGA i SGA u odnosu na kontrolnu grupu. Autozomno dominantni model ukazuje da je šansa da dođe do PE manja ukoliko se radi o Met-Met/Met-Val u odnosu na Val-Val. Isto se može zaključiti i kada je u pitanju težina, odnosno oblik PE bez teških karakteristika u odnosu na kontrolnu grupu, kao i AGA i SGA u odnosu na kontrolnu grupu. Ipak, u autozomno dominantnom modelu nije dobijena statistička značajnost ni u jednoj analizi. Nasuprot autozomno dominantnom modelu, u recesivnom modelu postoji značajan uticaj Met-Met u odnosu na Val-Val/Met-Val. Naime, šansa da dođe do PE je gotovo četiri puta manja u koliko se radi o Met-Met. Isti zaključak je dobijen kada je u pitanju težina PE i težina deteta na rođenju.

Analogno zaključku Hill i saradnika, da je smanjena maternalna COMT aktivnost protektivan faktor tako što stimuliše placentu da produkuje 2-ME, u ovoj doktorskoj tezi COMT Met-Met genotip u recesivnom modelu pokazuje protektivnu ulogu tako što smanjuje šansu za ranu PE (Hill ED, et al. PloS One 2011).

Potencijal Val158Met genotipa u stratifikaciji rizika za nastanak PE, kao i težinu PE, je nesumnjiv, ali postoji relativno mali broj studija koji se bave ovom problematikom. U ovoj tezi je utvrđeno da je Met-Met genotip protektivni faktor za razvoj PE. Nasuprot ovim rezultatima, Lim i saradnici su pokazali da je Met-Met genotip povezan sa povećanim rizikom za razvojem teže forme PE (Lim JH, et al. Pharmacogenet Genomics. 2010 ). Za razliku od njega, Liang i saradnici nisu našli razliku između distribucije pacijentkinja sa različitim genotipovima, odnosno alelima i nastanka PE (Liang S, et al. Arch Med Res. 2012).

Povezanost COMT genotipa i telesne težine na rođenju u PE ili same SGA je pokazana različitim studijama. U doktorskoj tezi je pokazano je da pacijentkinje sa PE imaju značajno drugačiju distribuciju COMT alela u odnosu na kontrolnu grupu. Ali nasuprot ovim rezultatima, Sata i saradnici su pokazali da pacijenti sa homozigotnim COMT alelima imaju gotovo tri puta veći rizik za nisku telesnu masu novorođenčeta (Sata F, et al. Pharmacogenet Genomics. 2006). Zaključeno je da niska COMT aktivnost može da uzrokuje akumulaciju katehol-estrogena zbog nemogućnosti da ih inaktivira i posledično tome izazove oksidativno oštećenje DNK (Yager JD, et al. Rev Pharmacol Toxicol. 1996; Malins DC, et al. Cancer 1993; Malins DC, et al. Proc Natl Acad Sci 1996). Oksidativno DNK oštećenje na kraju trudnoće može biti povezano sa smanjenom telesnom masom na rođenju (Scholl TO, et al. J Matern Fetal Med. 2001).

Pored COMT gena, po teoriji povećanog inflamatornog odgovora, nekoliko polimorfizama inflamatornih citokina je pokazalo povezanost sa PE (Haggerty CL, et al. Am J Obstet Gynecol. 2005; Laroche M, et al. Univesite Laval 2012; Lee YH, et al. European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology. 2014). Navedeni inflamatorni citokini koji su ispitivani u našoj studiji su Interleukin 1a (IL-1 $\alpha$ ), Interleukin 10 (IL-10) i Tumor nekrotizirajući faktor alfa (TNF- $\alpha$ ).

Interleukin-1 $\alpha$  je važan medijator inflamacije i imunog odgovora, a poznato je i da uzrokuje nakupljanje leukocita u tkivu, kao i produkciju drugih citokina (Stylianou E, et al. Int J Biochem Cell Biol. 1998). Studije na trudnicama su pokazale da su žene koje imaju PE u većem procentu bile nosioci 4845GT genotipa, kada se uporede sa normotenzivnim trudnicama (Haggerty CL, et al. Am J Obstet Gynecol. 2005). Nekoliko studija je ispitivalo vezu između IL-1 i PE, ali problem malih uzoraka doveo je do toga da nema statističke značajnosti. Jedino je studija Haggerty i saradnika studija koja je obuhvatila dovoljno veliki uzorak da vi zaključci bili validni.

U doktorskoj tezi utvrđeno je da je šansa da dođe do PE četiri do osam puta manja ukoliko se radi o GT ili TT genotipu u odnosu na GG genotip. Uzorak je dovoljno veliki da se dobije statistička značajnost u ovoj analizi. Kada se ispituje težina PE, takođe se dobija da je GT, odnosno TT genotip protektivan u smislu manje šanse za nastanak teške, odnosno PE bez teških karakteristika u poređenju sa kontrolnom grupom. Isti zaključak dobija se i kada se

analizira telesna težina novorođenčeta. Analogno težini PE manja je šansa da novorođenče ima smanjenu težinu za gestacioni uzrast ukoliko se radi o GT i TT genotipu. Sve ovo samo potvrđuje protektivnu ulogu GT i TT genotipova.

U alelskom modelu je jasno uočljivo da je, zapravo, T alel taj koji ima protektivnu ulogu. Naime, u statističkim analizama je utvrđeno da prisustvo T alela četiri puta smanjuje šansu da dođe do PE. Isti zaključak u alelskom modelu dobija se i kada se analizira težina PE, kao i SGA.

Kada je u pitanju autozomno dominantni model, utvrđeno je da je šansa da dođe do PE gotovo pet puta manja ukoliko se radi o GT i TT u odnosu na GG genotip. Slični rezultati dobijaju se i kada se analiza uradi za težinu PE, odnosno SGA i AGA. Naime, šansa da dođe do teške PE je četiri puta manja ukoliko se radi o GT i TT alelima, dok je šansa da dođe do oblika PE bez teških karakteristika gotovo deset puta manja. Šansa da dođe do SGA je četiri puta manja u odnosu na kontrolnu grupu, a za AGA čak dvanaest puta.

U autozomno recesivnom modelu rezultat koji se odnosi na model sa GG i GT u odnosu na TT je paradoksalan i pokazuje da TT nema protektivan već efekat koji vodi ka PE (Tabela 40). Ipak, objašnjenje ovakvog rezultata je da se rad o malom uzorku pacijenata koji imaju TT, njih petnaest i da količnik šansi je blizu jedan i naravno, nije statistički značajan. Ako analiziramo interval poverenja količnika šansi, jasno se vidi da je on veoma širok i da ide od tri puta manje šanse za nastanak PE do tri puta veće šanse za nastanak PE, pa je samim tim i ovaj rezultat diskutabilan za tumačenje i uzimanje u dalje razmatranje. Ipak, u daljim modelima sa težinom PE i težine novorođenčeta, dobijaju se rezultati koji su logični i govore u prilog protektivnog dejstva TT alela, ali takođe bez statističke značajnosti. Razlog je već pomenuti uzorak koji je nedovoljan da bi mogao da otkrije značajnost za ovakav model.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studije Haggerty i saradnika (Haggerty CL, et al. *Am J Obstet Gynecol.* 2005). Analizirajući uticaj IL-1 $\alpha$  utvrđeno je da je šansa da dođe do PE 2 puta veća ukoliko se radi o GG genotipu u odnosu na TT. Oni su, takođe, pokazali da nema razlike između TT i TG genotipova u riziku za nastanak PE. Sve ovo samo potvrđuje hipotezu o protektivnom efektu T alela u patogenezi PE.

Mnoge studije ispitivale efekte TNF $\alpha$  i pokazano je da ekscesivno oslobađanje TNF $\alpha$  je povezano sa endotelnom aktivacijom a potvrđena je i veza između TNF $\alpha$  i PE, jer je isti značajno veći kod trudnica sa PE (Sharma A, et al. *Am J Reprod Immunol.* 2007). Studije su pokazale da TNF- $\alpha$  igra važnu ulogu u razvoju PE, ateroskleroze, dijabetesa, Kronove bolesti i reumatoidnog artritisa (Heiskanen J, et al. *J Assist Reprod Genet.* 2002; Yamashina M, et al. *Tohoku J Exp Med.* 2007; Kubaszek A, et al. *Diabetes* 2003; Negoro K, et al. *Gastroenterology.* 1999). Povećana produkcija TNF $\alpha$ , takođe doprinosi povećanju metabolizma glukoze i insulinske rezistencije povezane sa gojaznošću, a smatra se da igra i jednu od važnijih uloga u razvoju metaboličkog sindroma. Studija Freeman i saradnika je pokazala da su nivoi IL-10 i TNF $\alpha$  povišeni u periodu između prvog i trećeg trimestra u zdravih kontrola isto kao i kod trudnica sa PE (Freeman DJ, et al. *Hypertension* 2004). Zbog kontradiktornih rezultata studija, dovodi se u pitanje uloga inflamatornih citokina u procesu inflamacije kao glavnog uzroka PE. Naime, mnoge studije nisu uspele da nađu jaku i

konzistentnu povezanost između inflamatornog statusa i kliničkih znakova PE (Daher S, et al. Am J Reprod Immunol. 2006; Stonek F, et al. J Reprod Immunol. 2008). Ipak, velika studija Haggerty i saradnika potvrđuje značajnu vezu između TNF $\alpha$  i PE (Haggerty CL, et al. Am J Obstet Gynecol. 2005). Na osnovu rezultata ove studije utvrđeno je da je šansa da dođe do PE dva puta veća ukoliko se radi o GG genotipu u odnosu na TT, dok TG i TT ne pokazuju značajnu razliku.

U doktorskoj tezi prisustvo CT ili TT genotipa u malom stepenu doprinosi nastanku PE. Ipak, analize sa ovim genotipovima nisu statistički značajne, bilo da se radi o malom efektu (CT), bilo da se radi o malom uzorku (TT). Naime, TT grupa ima samo četiri pacijentkinje, od kojih su dve sa PE, pa je gotovo nemoguće dobiti statističku značajnost, kao i validan zaključak. Isti zaključak dobijen je kada se analizira težina PE i težina novorođenčeta. Naime, u oba slučaja postoji efekat CT i TT genotipova na nastanak teške PE, odnosno PE bez teških karakteristika u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti.

Alelski model ukazuje da prisustvo T alela promoviše nastanak PE, ali i u našem ispitivanju bez značajnosti, jer iako se radi o adekvatnom uzorku, takođe se radi o maloj razlici. Isti rezultati dobijaju se i kada se analizira težina PE i težina novorođenčeta i u svakom modelu nema statističke značajnosti. Sve ovo govori u prilog da TNF $\alpha$  možda ima uticaj na PE, ali je on zanemarljiv i verovatno deluje sinergički sa ostalim faktorima jer u univarijantnim analizama ne dobijamo značajnost, niti kvantitativno veliki uticaj.

Autozomno dominantni model pokazuje da CT i TT imaju značajno veću šansu za nastanak PE, tešku PE i SGA, ali i ovde izostaje statistička značajnost. U autozomno recesivnom modelu postoji problem malog uzorka jer je TT alel prisutan samo kod četiri pacijentkinje, od kojih dve imaju PE, pa je modelovanje gotovo nemoguće i svaka analiza daje rezultate koji su pod velikom sumnjom.

Moguće da bi značajnost postojala kada bi uzorak bio veći jer je evidentno da postoji pozitivan uticaj TNF- $\alpha$  na nastanak PE, ali je efekat mali da bi mogli da dobijemo značajnost. Zato se i genetske studije rade na velikim uzorcima, gde postoji mogućnost da se univarijantno dobije značajnost povezanosti gena sa ishodom, a dodatno se može raditi i modelovanje sa prilagođavanjem. U ovom slučaju to neće dati pozitivan rezultat jer je uzorak nedovoljan za takve analize. Druga bitna stvar je da je analizom distribucije genotipova u kontrolnoj grupi utvrđeno odstupanje od HWE pa je i to jedan od mogućih razloga zašto se ne dobija značajnost razlike ili je bar ograničavajući faktor u ovim analizama.

IL-10 predstavlja multifunkcionalni citokin koji ima antiinflamatorna svojstva i koji smanjuje antigenu prezentaciju i aktivaciju makrofaga (Moore KW, et al. Annu Rev Immunol. 2001). U trudnoći ima važnu ulogu u balansiranju između proinflamatornog i antiinflamatornog ogovora. Naime, interleukin 10 smanjuje inflamacijom uzrokovanu vaskularnu disfunkciju, a igra i važnu ulogu u regulaciji trofoblasta (Didion SP, et al. Hypertension 2009). Poznato je da je produkcija IL-10 smanjena u placentalnom tkivu kod pacijentkinja sa PE (Wilczyński JR, et al. Mediators Inflamm 2002). Na osnovu svega navedenog dovodi se u pitanje koliki je uticaj interleukina 10 u patogenezi PE.



U doktorskoj tezi je pokazano da ne postoji značajna povezanost između IL-10 i PE. Naime, šansa da dođe do PE je malo veća ukoliko se radi o GA genotipu u odnosu na GG, ali je manja ukoliko se radi o AA genotipu. Međutim, bitno je napomenuti da je ograničenje naše studije u tome što ima mali broj pacijentkinja sa AA genotipom, samo pet, od kojih su dve sa PE. Kada se analizira uticaj genotipa na nastanak teške PE i PE bez teških karakteristika, takođe se dobijaju kontradiktorni rezultati, što sve može biti posledica već pomenutog malog uzorka, ali i odsustva povezanosti IL-10 sa PE.

Alelski model ne pokazuje nikakvu povezanost IL-10 sa PE, bilo da se radi o autozomno dominantnom, bilo da se radi o autozomno recesivnom modelu.

Nekoliko studija se bavilo povezanošću interleukina 10 i PE, ali dobijeni rezultati su dosta kontradiktorni. Haggerty i saradnici nisu našli značajnu povezanost IL-10 i rizika od nastanka PE (Haggerty CL, et al. Am J Obstet Gynecol. 2005). Velika meta-analiza Lee i saradnika ustanovila je na uzorku od 3500 pacijentkinja da ne postoji povezanost između IL-10 i PE (Lee YH, et al. European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology 2014). Ista studija je ustanovila jedino povezanost u stratumu žena iz Irana, ali ne i u Evropskoj populaciji. U istoj meta-analizi ponovljena je analiza samo sa studijama u kojima je kontrolna grupa imala distribuciju genotipova u HWE, ali ni to nije dalo pozitivan rezultat kada je u pitanju povezanost IL-10 i PE.

Kao siže svih rezultata, kreirani su multivarijantni regresioni modeli sa PE kao ishodom varijablom i značajnim prediktorima u univarijantnim analizama kao nezavisnim varijablama. Rezultati multivarijantnih analiza ukazuju da su COMT i IL-1 $\alpha$  značajani prediktori nastanka PE, kada se izvrši prilagođavanje za starost i ITM. Modelovanjem je, takođe pokazano da IL-10 i TNF $\alpha$  nemaju značajnu povezanost sa PE, bilo da se radi o univarijantnim modelima, bilo da se radi o modelima korigovanim za starost i ITM.

## **D. Objavljeni i saopšteni rezultati**

### **Radovi koji čine deo doktorske disertacije sa SCI liste**

1. **Krnjeta T**, Mirković LJ, Ignjatović S, Tomašević D, Lukić J, Topalov D, Soldatović I, Majkić-Singh N. Protective role of maternal P.Val158Met catechol-o-methyltransferase polymorphism against early-onset preeclampsia and its complications. J Med Biochem 2016; 35:1-7. DOI

Tip rada: Original article (originalan naučno istraživački rad)

IF: 1,045 (2014); ISSN: 1452-8258

Rang časopisa 257/290 u kategoriji Biochemistry & Molecular Biology

1. **Krnjeta T**, Mirković LJ, Ignjatović S, Tomašević D, Lukić J, Topalov D, Majkić-Singh N. Association between Val158Met COMT, TNF- $\alpha$  -857 C>T, TNFR1 36 A>G, IL-1 $\alpha$  4845 G>T and IL-10 -1082 A>G Polymorphisms and Risk of Early-Onset Preeclampsia

and Its Complications. Vojnosanitetski pregled: Military Medical and Pharmaceutical Journal of Serbia. 2016 (Epub ahead of print)

Tip rada: Original article (originalan naučno istraživački rad)

IF: 0,292 (2014); ISSN: 0042-8450

Rang časopisa 141/150 u kategoriji Medicine, General & Internal

## E. Zaključak

Preeklampsija predstavlja kompleksno multifaktorsko oboljenje gde pojedinačni faktori nemaju tako veliki uticaj kao što imaju zajedno, odnosno njihov sinergički efekat dovodi do pojave ovog oboljenja. Mehanizam razvoja bolesti nije u potpunosti poznat, a s tim u vezi doktorska teza je imala za cilj da ispita genetsku osnovu ove bolesti.

Na osnovu rezultata doktorska studija je zaključila sledeće:

U genotipskom modelu kao ključni polimorfizmi gena koji se mogu dovesti u asocijaciju sa ranom PE su COMT 472 G>A i IL-1 $\alpha$  4845 G>T. Homozigot za COMT gen povezan je sa smanjenim rizikom razvoja PE, dok su i homozigot i heterozigot za IL-1 $\alpha$  pokazali značajnu vezu sa razvojem rane PE u smislu manjeg rizika. Heterozigot za IL-1 $\alpha$  jedini je polimorfizam od ispitivanih gena koji pokazuje povezanost sa teškim oblikom PE i sa PE sa manjom telesnom masom za gestacijski uzrast.

Povezanost IL-10 i TNF $\alpha$  i nastanka rane PE i njenih komplikacija nije dokazana ovom studijom.

U alelskom modelu povezanost sa rizikom razvoja rane PE pokazuju aleli COMT 472 G>A i IL-1 $\alpha$  4845 G>T gena. Kod COMT gena, prisutvo Met alela je povezanost sa smanjenim rizikom razvoja rane PE i rane PE sa manjom telesnom masom za gestacijski uzrast. U alelskom dominantnom modelu nije pokazana značajna povezanost COMT gena sa ranom PE i njenim komplikacijama, dok je u alelskom recesivnom modelu Met-Met genotip je povezan sa smanjenim rizikom razvoja rane PE, teškog oblika rane PE i rane PE sa manjom telesnom masom za gestacijski uzrast. Kod IL-1 $\alpha$  gena, prisustvo T alela je povezano sa smanjenim rizikom razvoja rane PE, teškog oblika rane PE i rane PE sa manjom telesnom masom za gestacijski uzrast. Oba alelska modela, dominantni i recesivni, su pokazali povezanost sa rizikom razvoja rane PE, teškog oblika rane PE i rane PE sa manjom telesnom masom za gestacijski uzrast.

Tačkaste genetičke varijante koje su pokazale statistički značajnu asocijaciju sa rizikom razvoja PE i njenih komplikacija su COMT 472 G>A i IL-1 $\alpha$  4845 G>T geni.

Nije uočena interakcija između polimorfizama ova dva gena, odnosno njihov sinergistički ili antagonistički efekat na rizik razvoja rane PE i njenih komplikacija. Međutim, uočena je interakcija između polimorfizama COMT 472 G>A i IL-10 -1082 A>G gena, kao i COMT 472 G>A i TNF- $\alpha$  -857 T>T.

## **F. Mišljenje i predlog komisije**

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je kandidat u svom istraživanju opravdao postavljene ciljeve istraživanja i zato predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivnu ocenu doktorske disertacije pod naslovom " **Utvrđivanje povezanosti genskog polimorfizma COMT, TNF- $\alpha$ , TNFR1, IL-1 $\alpha$  i IL-10 sa rizikom pojave rane preeklampsije i njenih komplikacija** " i omogući kandidatu da pristupi javnoj odbrani iste.

### **ČLANOVI KOMISIJE:**

1. Dr Svetlana Ignjatović, mentor  
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr Ljiljana Mirković, mentor  
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet
3. Dr Vesna Spasojević – Kalimanovska,  
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

U Beogradu, 17.04.2016. godine