

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRDU

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

**„Uticaj polimorfizma gena za angiotenzin konvertujući enzim, matriksnu metaloproteinazu, endotelnu azot oksid sintetazu, interleukin i faktor nekroze tumora na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi“**

kandidata dr Jelene Tošić Dragović, zaposlene u Kliničkom odeljenju za nefrologiju i poremećaje metabolizma sa dijalizom „Prof. dr Vasilije Jovanović“ Kliničko-bolničkog Centra „Zvezdara“ u Beogradu. Mentor je Prof. dr Nada Dimković.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Višnja Ležaić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Branislava Ivanović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Dejan Petrović, profesor Fakultata Medicinskih Nauka u Kragujevcu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Jelene Tošić Dragović napisana je na ukupno 69 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključak i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 10 tabela, 28 grafikona i dve sheme. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** je opisana epidemiologija kardiovaskularnih oboljenja kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi, kao i faktori rizika za nastanak pojedinih kardiovaskularnih oboljenja uz poseban osvrt na netradicionalne faktore rizika.

Detaljno je prikazan značaj genskih polimorfizama u nastanku kardiovaskularnih bolesti kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću, kao i u opštoj populaciji. Posebno su izdvojeni polimorfizmi gena endotelne funkcije i gena inflamatornog odgovora. Opisan je uticaj različitih polimorfizama gena za angiotenzin konvertujući enzim, matriksnu metaloproteinazu 3, endotelnu azot oksid sintetazu, interleukine 6 i 10 i faktor nekroze tumora na nastanak kardiovaskularnih bolesti i kardiovaskularni mortalitet uz detaljno pojašnjenje patogenetskih mehanizama. Analizirana su i dosadašnja saznanja o uticaju polimorfizama navedenih gena na kardiovaskularno oboljevanje i mortalitet bolesnika na hroničnom lečenju hemodijalizama.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se od: analize kardiovaskularnog morbiditeta i ukupnog i kardiovaskularnog mortaliteta u odnosu na genski polimorfizam za angiotenzin-konvertujući enzim (ACE), matriksnu metaloproteinazu 3 (MMP3), endotelnu azot oksid sintetazu (eNOS), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10) i faktor nekroze tumora (TNF), kao i utvrđivanja koji od ispitivanih genskih polimorfizama ili njihovih kombinacija ima najviše uticaja na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet bolesnika na hroničnoj hemodijalizi.

U poglavlju **materijal i metode** je detaljno opisana metodologija za oba dela istraživanja koja su sprovedena u Kliničkom odeljenju za nefrologiju i poremećaje metabolizma sa dijalizom „Prof. dr Vasilije Jovanović“ Kliničko-bolničkog Centra „Zvezdara“ u Beogradu. Prvi, retrospektivni deo istraživanja odnosio se na prikupljanje podataka o kardiovaskularnom morbiditetu iz istorija bolesti i njihovu korelaciju sa genskim polimorfizmima kod svakog bolesnika. Validacija retrospektivnog ispitivanja pretpostavljena je obzirom na konstantnost genskog miljea svake osobe. Drugi, prospektivni deo istraživanja vezan je za ispitivanje uticaja genskih polimorfizama na ukupni i kardiovaskularni mortalitet u trajanju pet godina nakon sprovođenja genotipizacije. Detaljno je opisana PCR metoda određivanja genskog polimorfizma u sva tri navedena gena. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobreno je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

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

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

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

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 99 reference.

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

U prvom, retrospektivnom delu ispitivanja pokazano je da je MMP3 genski polimorfizam značajno povezan sa nastankom koronarne arterijske bolesti i srčanih aritmija ( $p=0.05$ ), kao i da su heterozigoti za ovaj gen imali najviši rizik za nastanak koronarne arterijske bolesti, mada bez statističke značajnosti. U odnosu na ACE gen pokazano je da D alel značajno povećava rizik za nastanak cerebrovaskularnih događaja, hipertrofije leve komore, hiperlipidemije i periferne vaskularne bolesti, dok su I/I homozigoti za ovaj gen pokazali statistički značajno viši rizik za nastanak srčanih aritmija ( $p=0.05$ , OR 2.95, 95%CI 0.96-9.05). Rezultati retrospektivnog dela ispitivanja takođe su pokazali da nosioci TT genotipa dvostruko povećavaju rizik za nastanak koronarne bolesti ( $p=0.05$ , OR 1.96, 95%CI 0.49-4.6). U grupi gena inflamatornog odgovora, genski polimorfizam za IL-6 značajno je statistički povezan sa nastankom koronarne arterijske bolesti ( $p=0.05$ ) i cerebrovaskularnog insulta ( $p=0.03$ ) u ispitivanoj grupi bolesnika, dok su heterozigoti za ovaj gen pokazali značajno niži rizik za nastanak cerebrovaskularnog insulta u odnosu na CC homozigote ( $p=0.007$ , OR 0.096, 95%CI 0.017-0.53). Genski polimorfizam za IL-10 pokazao je statistički značajan uticaj na nastanak infarkta miokarda ( $p=0.04$ ), a GG homozigoti za ovaj gen imali su niži rizik za nastanak koronarne bolesti ( $p=0.05$ , OR 0.18, 95%CI 0.03-1.07), infarkta miokarda ( $p=ns$ , OR 0.36, 95%CI 0.07-1.9), periferne arterijske bolesti ( $p=ns$ , OR 0.5, 95%CI 0.04-7.1) i srčanih aritmija ( $p=ns$ , OR 0.38, 95%CI 0.12-1.22), mada je među nosiocima ovog genotipa pronađen viši rizik za nastanak hipertenzije ( $p=ns$ , OR 3.6, 95%CI 0.34-38.3) i cerebrovaskularnog insulta ( $p=ns$ , OR 3.76, 95%CI 0.37-37.8). U odnosu na gen za TNF, nosioci A alela imali su statistički značajno viši rizik za nastanak hiperlipidemije ( $p=0.006$ , OR 5.95, 95%CI 1.66-21.37), dok su nesignifikantno viši rizik imali i za nastanak infarkta miokarda ( $p=ns$ , OR 2.5, 95%CI 0.7-8.9) i cerebrovaskularnog insulta ( $p=ns$ , OR 3.4, 95%CI 0.59-19.4).

U drugom, prospektivnom delu istraživanja, najviši ukupni i kardiovaskularni mortalitet za MMP3 gen imali su 5A homozigoti, dok su II homozigoti za ACE gen imali najkraće ukupno preživljavanje, a najviši kardiovaskularni mortalitet je pokazan u grupi D/D homozigota za ovaj gen. U odnosu na eNOS ukupni mortalitet bio je najviši u grupi heterozigota, dok su TT homozigoti imali najviši kardiovaskularni mortalitet. U odnosu na gene inflamatornog

odgovora ukupni mortalitet bio je najviši među heterozigotima za IL-6 gen i GG homozigotima za IL-10 gen, dok u odnosu na TNF genske polimorfizme nije bilo razlike u preživljavanju. Kardiovaskularni mortalitet je bio najvišinkod AA homozigota za IL-10 gen i GG homozigota za TNF gen, dok među IL-6 genotipovima nije bilo razlike u kardiovaskularnom preživljavanju.

Genski polimorfizam za eNOS je jedini od svih ispitivanih genskih polimorfizama pokazao uticaj na ukupne kardiovaskularne događaje u ispitivanoj grupi bolesnika. Nijedna od mogućih kombinacija ispitivanih genskih polimorfizama nije pokazala uticaj na nastanak kardiovaskularnih događaja niti mortaliteta u ispitivanoj grupi bolesnika.

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

Ovo je prvo istraživanje iz ove oblasti u našem regionu u populaciji dijaliznih bolesnika. Rezultati prikazani u radu dr Tošić Dragović pokazuju da je u grupi ispitanika najzastupljeniji 5A/6A genotip gena za matriksnu metaloproteinazu 3, kao i I/D genotip ACE gena, što je u skladu sa literaturnim podacima koji ne ukazuju na razlike u distribuciji gena za MMP3 i ACE između opšte populacije i hemodijaliznih bolesnika. U ovom radu pokazana je statistički značajna povezanost između genskog polimorfizma za MMP3 i nastanka koronarne arterijske bolesti i srčanih aritmija kod pacijenata na hemodijalizi. Nosioci 5A/6A genotipa za MMP3 imali su 3 puta veći rizik za nastanak koronarne bolesti i srčanih aritmija u odnosu na 6A homozigote, što je takođe praćeno statističkom značajnošću. Osobe sa 5A alelom ovog gena imale su 1,8 puta veći rizik za razvoj infarkta miokarda u odnosu na 6A homozigote, ali bez statističke značajnosti. Ova saznanja u saglasnosti su sa prethodnim istraživanjima koji su se bavili ispitivanjem povezanosti polimorfizma MMP3 gena i koronarne bolesti, kao i akutnog infarkta miokarda. Procenom rizika za nastanak koronarne bolesti i infarkta miokarda većina studija iz Istočne Azije i pojedine evropske studije pokazale su da prisustvo 5A alela povećava rizik za nastanak akutnog infarkta.

Rezultati ovog rada pokazuju da je relativni rizik za razvoj cerebrovaskularnog insulta 1,6 puta veći kod 5A/5A homozigota u odnosu na 6A/6A homozigote, međutim bez statističke značajnosti. Dobijeni rezultati su takođe u skladu sa dosadašnjim saznanjima, koja ukazuju na to da bolesnici sa 5A/5A genotipom imaju veći rizik za razvoj akutnih događaja. Kardiovaskularni i ukupni mortalitet je u radu dr Tošić Dragović značajno viši u grupi bolesnika sa 5A/5A genotipom, što je u skladu sa prethodno navedenim saznanjima da je ovaj

alel češće dovođen u vezu sa akutnim kardiovaskularnim događajima koji često mogu rezultirati smrtnim ishodom.

Rezultati ovog rada nisu dokazali povezanost ACE gena sa pojavom koronarne bolesti niti njegov uticaj na nastanak akutnog infarkta miokarda. Pozitivna korelacija između ACE polimorfizma i pojave koronarne bolesti, kao i akutnog infarkta miokarda prikazana je u dosadašnjim literaturnim podacima, međutim ima i brojnih studija koje su pokazale kontroverzne rezultate.

Prikazani rezultati u radu dr Tošić Dragović pokazuju da I/I homozigoti imaju statistički značajno veći rizik za nastanak srčanih aritmija, i to čak tri puta više u odnosu na D/D homozigote ( $p=0.05$ ). Potpuno suprotno osobe sa I/I genotipom imale su čak 5 puta niži rizik za nastanak cerebrovaskularnog insulta, a skoro duplo manji rizik za perifernu vaskularnu bolest, hipertrofiju leve komore i hiperlipidemiju u odnosu na nosioce D/D genotipa. Ovakvi nalazi su u saglasnosti sa dosadašnjim istraživanjima gde je dokazana povezanost D alela ovog gena sa visokim rizikom za cerebrovaskularne događaje.

Razlog nepostojanja asocijacije između ACE genotipa i hipertenzije dr Tošić Dragović objasnila je mnogostrukim potencijalnim uzrocima ove bolesti, koji su prisutni kod pacijenata na hroničnoj hemodijalizi. Kod hemodijaliznih pacijenata povišen krvni pritisak može biti posledica neregulisane volemije i neadekvatne ekskrecije soli. Prva meta-analiza na ovu temu publikovana 1997. godine od strane Staessena i sar. uključila je 23 studije sa ukupno 6923 ispitanika i pokazala je da je rizik za razvoj hipertenzije za 10% veći kod nosilaca DD alela u odnosu na II genotip. Međutim, ovaj nalaz nije bio statistički značajan. U skladu sa tim, u ovom radu najviši kardiovaskularni mortalitet u grupi naših bolesnika, tokom praćenja od 60 meseci, iako bez statističke značajnosti, pokazali su upravo D/D homozigoti.

U odnosu na genski polimorfizam za eNOS rezultati istraživanja dr Tošić Dragović nisu pokazali statistički značajnu povezanost sa kardiovaskularnim oboljenjima, međutim pronađen je dva puta veći rizik za nastanak koronarne bolesti kod TT homozigota u odnosu na heterozigote, dva puta veći rizik za hipertrofiju leve komore i 1,5 puta veći rizik za infarkt miokarda i cerebrovaskularni insult kod GG homozigota u odnosu na heterozigote. Svi ovi rizici međutim, nisu pokazali statističku značajnost. Slično rezultatima ovog istraživanja, u studiji Szaba i saradnika pokazano je da TT homozigoti imaju smanjenu produkciju NO i češću pojavu endotelne disfunkcije, što rezultuje povišenim rizikom za razvoj ateroskleroze, a takođe je pokazano i da su osobe sa TT genotipom imale 4 puta veći rizik za nastanak infarkta

miokarda i povišen rizik za cerebrovaskularni insult. Dosadašnje studije pokazale su da nosioci mutiranog alela (T) sa više od tri faktora rizika za kardiovaskularne bolesti, imaju veću endotelnu disfunkciju od onih koji imaju manje faktora rizika. Takođe, kod zdravih osoba u intenzivnom fizičkom naporu, pokazana je manja enzimaska aktivnost ukoliko su osobe bile nosioci T alela. U studiji Philipa i sar. pokazana je značajna povezanost ovog polimorfizma sa povišenim krvnim pritiskom, gde su GT i TT genotipovi imali viši krvni pritisak u odnosu na GG homozigote.

Rrada dr Tošić Dragović ukazuju na statistički značajnu povezanost infarkta miokrada sa polimorfizmom gena za IL-10, gde se genotip GG izdvojio kao protektivni, jer su ovi homozigoti pokazali 3 puta niži rizik za nastanak akutnog infarkta miokarda u odnosu na AA homozigote. Takođe, GG homozigoti imali su statistički značajno manji rizik za nastanak koronarne bolest, koji je čak 5 puta niži u odnosu na AA homozigote. Protektivno dejstvo ovaj genotip pokazao je i u odnosu na perifernu vaskularnu bolest sa 2 puta nižim rizikom u odnosu na AA genotip, međutim bez statističke značajnosti. Kontradiktorno rizik za cerebrovaskularni insult i hipertenziju u grupi nosioca ovog genotipa bio je 3.5 puta viši u odnosu na AA homozigote, a za nastanak hipertrofije leve komore 1.5 puta viši, međutim bez statističkih značajnosti. Iako bi IL-10 trebalo da ima ateroprotektivna dejstva, kliničke studije pokazale su kontroverzne rezultate. Dve studije su pronašle niže nivoe ovog citokina u plazmi kod bolesnika sa nestabilnom anginom, međutim druga istraživanja nisu potvrdila ovakve rezultate. U odnosu na opštu populaciju, do sada se nije uspelo u pokušajima da se pronađe tačan obrazac delovanja ovog genskog polimorfizma na kardiovaskularni rizik. Kontradiktorne rezultate dobila je i dr Tošić Dragović u svom istraživanju analizom kardiovaskularnog i ukupnog mortaliteta, gde su nosioci A alela (AA homozigoti i heterozigoti GA) imali najniže preživljavanje kada je u pitanju kardiovaskularni mortalitet, a najviše kada se posmatrao ukupni mortalitet na petogodišnjem nivou.

Ovaj rad je kada je u pitanju TNF gen, pokazao da nosioci A alela imaju statistički značajno viši rizik za nastanak hiperlipidemije, čak 6 puta, dok je pokazan i 2.5 puta veći rizik za nastanak infarkta miokarda i 3.4 puta veći rizik za razvoj cerebrovaskularnog insulta, međutim ova dva saznanja nisu pokazala statističku značajnost. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je A alel povezan sa većom produkcijom TNF-a i povećanim rizikom za pojavu kardiovaskularnih komplikacija kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću. Nekoliko skorijih studija ukazalo je na jaku korelaciju između ovog citokina i endotelne disfunkcije kod bolesnika sa koronarnom bolešću, dok je studija Kimmela i saradnika pokazala da se porast

nivoa TNF u krvi može smatrati prediktorom smrtnog ishoda kod dijaliznih bolesnika. Nešto slično je pokazano i u istraživanju dr Tošić Dragović, analizom kardiovaskularnog mortaliteta, gde su upravo nosioci A alela (AA homozigoti i heterozigoti GA) imali najniže preživljavanje, mada statistička značajnost nije dokazana.

U ovom istraživanju u odnosu na genski polimorfizam za IL-6 pokazano je da heterozigoti imaju čak 10 puta niži rizik za nastanak cerebrovaskularnog insulta u odnosu na CC homozigote, sa statističkom značajnošću. Suprotno, nosioci GC genotipa imali su 3 puta veći rizik za koronarnu bolest, a 3,8 puta viši rizik za nastanak periferne arterijske bolesti, međutim ovaj rezultat nije pokazao statističku značajnost. Homozigoti za GG alel u odnosu na CC homozigote imali su 2 puta manji rizik za nastanak srčanih aritmija, takođe bez statističke značajnosti. Veći broj studija dokazao je da nosioci G alela proizvode veću količinu ovog citokina, međutim ukupni rezultati iz ove oblasti istraživanja su još uvek kontroverzni. Jedna relativno skorija studija koja je ispitivala bolesnike sa završnim stadijumom bubrežne bolesti ukazala je na značajno više nivoe IL-6 u plazmi i veći broj komorbiditeta kod GG homozigota, dok je druga pokazala da heterozigoti i CC homozigoti imaju povišen dijastolni pritisak i hipertrofiju leve komore. Slično je pokazano i u ispitivanju dr Tošić Dragović, gde najveći kardiovaskularni mortalitet imaju upravo GG homozigoti, dok najviši ukupni mortalitet imaju heterozigoti. Takođe, pokazano je da pored genetskih faktora, sama dijaliza, kako hemodijaliza tako i peritonealna, dovode do povećane sekrecije IL-6, te je tako i u studiji Caglara i saradnika pokazan porast cirkulišućeg IL-6 nakon hemodijalizne sesije.

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

1. Dragovic JT, Popovic J, Djuric P, Bulatovic A, Jankovic A, Buzadzic I, Dimkovic N. The 5A allele of the MMP3-gene promoter polymorphism is a risk factor for poor outcome of hemodialysis patients. *Tohoku J Exp Med.* 2017 Aug;242(4):273-279. Doi: 10.1620/tjem.242.273
2. Tosic Dragovic J, Popovic J, Djuric P, Jankovic A, Bulatovic A, Barovic M, Pravica V, Marinkovic J, Dimkovic N. Relative risk for cardiovascular morbidity in hemodialysis patients regarding gene polymorphism for IL-10, IL-6 and TNF. *Can J Physiol Pharmacol.* 2016 Oct;94(10):1106-1109. Epub 2016 Aug 7.

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Uticaj polimorfizma gena za angiotenzin konvertujućii enzim, matriksnu metaloproteinazu, endotelnu azot oksid sintetazu, interleukin i faktor nekroze tumora na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet kod bolesnika na hroničnoj hemodijalizi“

dr Jelena Tošić Dragović, predstavlja rad koji je dao originalni naučni doprinos razumevanju uticaja genetskih polimorfizama na kardiovaskularna oboljenja I mortalitet u grupi bolesnika koji se leče hemodijalizama. Kvalitet rada se ogleda i u dužini praćenja bolesnika na hemodijalizi. Uticaj genetskog polimorfizma na kardiovaskularni morbrbiditet i mortalitet nije dovoljno istraživan na našem podneblju. Poznato je da rezultati ovakvih istraživanja zavise i od grografskog podneblja, rase i ostalih individualnih karakteristika samog bolesnika, te bi stoga ova studija mogla biti podstrek za dalja, detaljnija i veća istraživanja u našoj zemlji ili regionu. Ono što je sigurno jeste da određeni geni u kombinaciji sa spoljašnjim faktorima ili u specifičnom genskom miljeu mogu kompleksnim međusobnim interakcijama dovesti do razvoja pojedinih oboljenja.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Jelene Tošić Dragović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 07.06.2018.

Članovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Višnja Ležaić

Prof. dr Nada Dimković

---

Prof. dr Branislava Ivanović



---

Prof. dr Dejan Petrović

---