

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.06.2019. godine, broj 9700/04-TŠJ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Uloga polimorfizama gena za endotelnu azot-oxid sintetazu, katehol-O-metil transferazu, glutathion S transferazu M1 i T1 i ekspresija proinflamatornih citokina u pojavi preeklampsije“

kandidata dr Tamare Šljivančanin Jakovljević, zaposlenog u Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni Front“ u Beogradu. Mentori su Prof. dr Olivera Kontić-Vučinić i Prof. dr Jelena Milašin.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Željko Miković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Ivana Novaković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Dimitrije Nikolić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
4. Doc. dr Jelena Martić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
5. Prof. dr Nenad Šulović, profesor Medicinskog fakulteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Tamare Šljivančanin Jakovljević napisana je na ukupno 217 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Disertacija sadrži ukupno 62 tabele, dve šeme i 13

slika. Doktorska disertacija ima i sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, zahvalnicu i biografiju kandidata.

U **Uvodu** su definisani hipertenzivni poremećaji u trudnoći i dat je vrlo temeljan opis preeklampsije. Dati su precizni epidemiološki podaci o učestalosti ovih poremećaja, njihova klasifikacija, a navedeni su i faktori rizika za nastanak preeklampsije, kao i mogućnosti za njenu prevenciju, predikciju i terapiju. Opisana su dosadašnja saznanja o etiopatogenezi preeklampsije, uključujući ulogu oksidativnog stresa, naslednih faktora, imunoloških faktora i zapaljenja, u pojavi ovog hipertenzivnog poremećaja.

Poseban akcenat je stavljen na ulogu enzima glutation S-transferaze (GST) T1 i M1, endotelne azot oksid sintetaze (eNOS) i katehol O-metiltransferaze (COMT) i polimorfizama u genima koji kodiraju ove enzime. Dalje, jasno su opisani mehanizmi kojima bi povišena ekspresija proinflamatornih citokina, faktora nekroze tumora- α (TNF- α), interleukina 1 β (IL-1 β) i interleukina 6 (IL-6), mogla učestvovati u etiopatogenezi preeklampsije.

Ciljevi rada su jasno i precizno definisani: ispitivanje učestalosti delecionih polimorfizama u GST T1 i GST M1 genima, polimorfizama eNOS gena (T-786C – u promotoru: rs2070744; G894T – Glu298Asp u egzonu 7: rs1799983; VNTR b/a u intronu 4), polimorfizma Val158Met u COMT genu (rs4680) i nivoa ekspresije proinflamatornih citokina TNF- α , IL-1 β i IL-6 u grupi pacijentkinja sa preeklampsijom i u kontrolnoj grupi, kao i u odnosu na kliničke karakteristike preeklampsije (rana/kasna, laka/teška) i epidemiološke faktore rizika trudnoće. Ciljevima je obuhvaćeno i ispitivanje povezanosti analiziranih genskih polimorfizama sa nivoom ekspresije proinflamatornih citokina u grupi trudnica sa preeklampsijom i u celom uzorku.

U poglavlju **Materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnoj studiji slučaj-kontrola sprovedenoj na Klinici za ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra Srbije i u Laboratoriji za bazična istraživanja Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Detaljno su opisani kriterijumi za uključenje i kriterijumi za isključenje iz studije, način prikupljanja podataka o pacijentkinjama sa preeklampsijom i zdravim trudnicama, toku trudnoće i njenim ishodima, kao i način prikupljanja uzoraka za laboratorijsku analizu. Molekularno genetičko istraživanje podrazumevalo je izolaciju genomske DNK i ukupne RNK iz limfocita krvi za obe grupe ispitanica. Sprovedena je analiza delecionih polimorfizama gena za GST M1 i GST T1 primenom metoda PCR (engl. polymerase chain reaction) i real-time PCR-a, polimorfizama pojedinačnog nukleotida u genima za eNOS i COMT primenom PCR-RFLP (engl.

polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) tehnike, kao i analiza relativne ekspresije gena za proinflatorne citokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) primenom real-time PCR metode. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključenja u studiju. Statistička analiza prikupljenih podataka izvršena je u statističkom softverskom paketu IBM SPSS Statistics for Windows Software (Version 25.0; IBM Corp, Armonk, NY, SAD).

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

Diskusija je napisana sveobuhvatno, jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja i njihovo temeljno poređenje sa rezultatima dobijenim u okviru ove doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz ove studije. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 595 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U istraživanje je uključeno ukupno 100 pacijentkinja podeljenih u dve grupe. Grupa slučajeva se sastojala od 50 žena sa postavljenom dijagnozom preeklampsije, dok je kontrolna grupa obuhvatila 50 normotenzivnih žena sa nekomplikovanim trudnoćama. U grupi preeklampsija, 25 trudnica je imalo karakteristike teške forme, dok je 25 imalo laki oblik. U odnosu na vreme ispoljavanja bolesti, 23 žene je imalo ranu, a 27 kasnu preeklampsiju. Ispitivane grupe su bile uparene za starosnu dob, gestacijsku starost trudnoće u trenutku uzimanja uzorka, paritet i graviditet. Uočene su statistički značajno veće vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, vrednosti indeksa telesne mase pre i u trudnoći, kao i veća učestalost pojave edema u trudnoći u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice. Od posmatranih laboratorijskih parametara vrednosti proteinurije i protein/kreatinin odnosa, nivoa uree, ukupnih proteina, aspartat aminotransferaze, fibrinogena, laktat dehidrogenaze, mokraćne kiseline, kreatin kinaze i hemoglobina u krvi su se značajno razlikovali u grupi slučajeva u odnosu na zdrave trudnice. U grupi žena sa preeklampsijom značajno je češći bio završetak porođaja carskim rezom, kao i završetak porođaja između 34 i 36 gestacijske nedelje, odnosno pre 34 nedelje. Intrauterusni zastoje rasta je bio 14 puta češći u grupi trudnoća komplikovanih preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice. Antropometrijske mere deteta na rođenju su bile značajno manje u grupi sa preeklampsijom u

odnosu na zdrave trudnoće. Novorođenčad majki sa preeklampsijom su imala značajno duži boravak u bolnici u odnosu na novorođenčad iz nekomplikovanih trudnoća. Svi posmatrani negativni neonatalni ishodi su bili značajno češći u grupi slučajeva u odnosu na kontrolu.

GSTM1 nulti genotip samostalno i u kombinaciji sa prisutnim GSTT1 genom je bio značajno češći u grupi sa preeklampsijom u odnosu na kontrolu i nosio je povećan rizik za pojavu preeklampsije, kao i za razvoj teške i kasne forme poremećaja. GSTT1 nulti genotip je nosio skoro 3,5 puta veći rizik za razvoj rane preeklampsije. Kombinacija genotipova GSTT1-/GST M1+ je bila povezana sa povećanim rizikom za pojavu teške i rane, dok su nosioci GST T1+/GST M1- imali povećan rizik za razvoj samo teške forme preeklampsije. GST1-/GST M1- genotip bio je povezan sa čak 12 puta većim rizikom za razvoj teške i rane forme preeklampsije. G894T polimorfizam gena za eNOS nije pokazao razliku u distribuciji genotipova i alela između preeklampsije i njenih podgrupa u odnosu na kontrolu. Varijantni alel u homozigotnom stanju eNOS polimorfizma T-786C bio je značajno češći u grupi preeklampsija u odnosu na kontrolu i nosio je povećan rizik za pojavu preeklampsije; ova distribucija je zadržana i u podgrupama preeklampsije prema stepenu težine i gestacijskoj nedelji javljanja simptoma i znakova poremećaja u odnosu na kontrolu. Alel C je bio značajno češći u grupi rane preeklampsije u odnosu na kontrolu i nosio je povećan rizik od razvoja ove forme poremećaja. VNTR polimorfizam u eNOS genu pokazao je značajno višu učestalost homozigotne mutacije u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu, i ona je nosila 7,5 veći rizik za pojavu poremećaja; recesivni model za VNTR eNOS polimorfizam (aa u odnosu na bb+ba) je pokazao povećan rizik za razvoj lake i kasne preeklampsije. Haplotip sa tri divlja tipa alela ispitivanih polimorfizama gena za eNOS, "G-T-b" pokazao je protektivni efekat, dok su nosioci haplotipa "G-C-b" imali 3 puta povećan rizik za pojavu ovog hipertenzivnog poremećaja u trudnoći. Homozigotna mutacija za Val158Met COMT polimorfizam je bila značajno češća u grupi preeklampsija u odnosu na kontrolu i nosila je povećan rizik za pojavu preeklampsije. Ovakva distribucija je zadržana i u podgrupama teške i rane preeklampsije, uz povećanje rizika od 9 puta za razvoj teške, odnosno skoro 7 puta za razvoj rane preeklampsije.

Relativna ekspresija TNF- α iRNK je bila značajno viša u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu. Ovaj trend je zadržan bez obzira na stepen težine preeklampsije (laka/teška) i gestacijsku nedelju ispoljavanja simptoma i znakova (rana/kasna). Relativna ekspresija IL-1 β je takođe bila značajno viša u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu. Nakon podele na podgrupe ovaj trend je zadržan u grupi teške i kasne preeklampsije u odnosu na zdrave trudnice. Relativna ekspresija IL-6 se nije značajno razlikovala između preeklampsije i

kontrolne grupe. Pozitivna korelacija proinflamatornih citokina zabeležena je između TNF- α i IL-1 β na nivou celog ispitivanog uzorka, i između IL-1 β i IL-6 u grupi preeklampsije.

Uočena je značajna povezanost između COMT GA i AA genotipova i povišene relativne ekspresije TNF- α na nivou celog uzorka. Uočena je i značajna povezanost između prisustva GSTT1 gena i povišene ekspresije IL-1 β u grupi preeklampsije, kao i povezanost između prisustva GSTM1 gena i povišene relativne ekspresije IL-6 u grupi preeklampsije. Nije uočena povezanost između epidemioloških faktora rizika trudnoće (indeks telesne mase, pušenje, prethodni pobačaji, intrauterusni zastoj u rastu ploda) sa genskim polimorfizmima u ispitivanim genima, kao ni sa ekspresijom proinflamatornih citokina.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Do danas je ostvaren veliki pomak u razumevanju etiopatogeneze preeklampsije, a literaturni podaci ukazuju na potencijalni značaj naslednih faktora i nekoliko genskih polimorfizama u pojavi ovog hipertenzivnog poremećaja u trudnoći. Ovo je prva studija na našoj populaciji trudnica koja je ispitivala ulogu polimorfizama u genima za eNOS, COMT, GSTM1 i GSTT1 u pojavi preeklampsije. Do sada je nekoliko studija pokušalo da ispita ulogu GST gena u preeklampsiji, ali je jedino delecija GSTP1 gena dovedena u vezu sa povećanim rizikom za pojavu ovog poremećaja (Zusterzeel PL i sar. 2000). Rezultati sprovedenih studija koje su ispitivale vezu između GSTM1 i GSTT1 polimorfizama i pojave preeklampsije pokazale su vrlo oprečne rezultate, što se može objasniti geografsko-etničkim specifičnostima (Zusterzeel PL i sar. 2000, Sandoval-Carrillo A i sar. 2014, Guan L i sar. 2016, Cetin M i sar. 2005, Anvar Z i sar. 2011, Zhang J i sar. 2008, Atalay MA i sar. 2012, Kim YJ i sar. 2005). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da homozigotni nosioci GSTM1 delecionog polimorfizma imaju značajno veći rizik za pojavu preeklampsije, a GSTM1- / GSTT1+ genotip je nosio 3.5 puta veći rizik za razvoj ovog poremećaja. Ovo je prvo istraživanje koje je ispitivalo vezu između težine preeklampsije i gestacijske nedelje njenog ispoljavanja sa genskim polimorfizmima za GST. GSTM1 delecija je pokazala povišen rizik za razvoj kasne i teške preeklampsije. Kombinacija genotipova GSTT1+/GSTM1- i GSTT1-/GSTM1+ je pokazala značajno povišen rizik od razvoja teške forme. Identifikacija žena sa teškom formom preeklampsije i dalje predstavlja izazov za kliničare, posebno što laki oblik može progredirati u teški za svega nekoliko dana od postavljanja dijagnoze. GSTT1 nulti genotip i kombinacija GSTT1-/GSTM1+ genotipa je u ovoj studiji povezana sa razvojem preeklampsije pre 34. nedelje gestacije.

Normalna trudnoća je praćena smanjenjem sistemske vaskularne rezistencije, koja je verovatno najvećim delom posledica dejstva NO (Dorup I i sar. 1999). Prisustvo polimorfizama eNOS gena utiče na NO produkciju preko različitih mehanizama. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je homozigotna mutacija za T-786C polimorfizam značajno češće bila prisutna u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice. Meta analiza 11 studija slučaj-kontrola pokazala je da je eNOS -786C/C genotip povezan sa povećanim rizikom za razvoj preeklampsije u odnosu na -786T/T genotip (Dai B i sar. 2013). Meta analiza iz 2016. godine pokazala je veliku interetničku varijabilnost u distribuciji T-786C polimorfizma, sa najjačom povezanošću između prisustva ovog polimorfizma i pojave preeklampsije u studijama na beloj rasi i Afrikancima (Zeng F i sar. 2016). Dobijeni rezultati ovog istraživanja pokazuju da se prisustvo homozigotne mutacije za T-786C ne može koristiti u predviđanju težine kliničke slike niti vremena ispoljavanja poremećaja, s obzirom na sličnu distribuciju ovog SNP-a u grupama lake i teške, kao i rane i kasne preeklampsije. Rezultati o povezanosti VNTR 4b/a polimorfizma u genu za eNOS i preeklampsije su takođe šaroliki. Ova studija je pokazala da je homozigotna mutacija bila značajno češća u grupi žena sa preeklampsijom, dok dve meta-analize nisu pokazale značajnu povezanost VNTR 4b/a polimorfizma i preeklampsije (Dai B i sar. 2013, Gannoun BAM i sar. 2015). Sa druge strane, pokazana je direktna veza između VNTR i nižih vrednosti NO metabolita u plazmi (Akhter MS i sar. 2009, Tsukada T i sar. 1998). Do sada je relativno mali broj studija ispitivao povezanost ovog polimorfizma sa stepenom težine i gestacijskom nedeljom razvoja preeklampsije (Rahimi Z i sar. 2013, Alpoim PN i sar. 2014, Chen Y i sar. 2014). Ispitivanje učestalosti eNOS haplotipova na našoj populaciji žena pokazalo je da haplotip sa sva tri divlja tipa alela, "G-T-b", ima protektivni efekat, dok nosioci haplotipa "G-C-b" imaju 3 puta povećan rizik za pojavu preeklampsije, što nije u saglasnosti sa istraživanjima na drugim populacijama (Serrano NC i sar. 2004, Gannoun BAM i sar. 2015, Sharma D i sar. 2014, Alpoim PN i sar. 2014, Coral-Vázquez RM i sar. 2013, Sandrim VC i sar. 2008, Díaz-Olguín L i sar. 2011), namećući teoriju o različitoj etničkoj predispoziciji za razvoj preeklampsije.

Jedan od polimorfizama kandidata nedavno predloženih u etiopatogenezi preeklampsije je i Val158Met polimorfizam COMT gena (Kanasaki K i sar. 2008). Met/Met genotip je nosio skoro 4 puta povećan rizik za razvoj preeklampsije u našoj populaciji trudnica. Ovi rezultati su u saglasnosti sa nedavnim studijama koje su pokazale vezu između Val158Met COMT polimorfizma i preeklampsije u različitim populacijama (Liang S i sar. 2012, Lim JH i sar. 2010). Meta-analiza šest studija (Taravati A i sar. 2017), je potvrdila da je COMT Val158Met

polimorfizam povezan sa povećanim rizikom za pojavu preeklampsije, posebno kod nosilaca homozigotne mutacije. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su nosioci AA genotipa imali 9 puta veći rizik za razvoj teškog oblika preeklampsije i skoro 7 puta veći rizik za razvoj rane preeklampsije. Učestalost alela A za Val158Met COMT polimorfizam se značajno razlikovala u do sada ispitivanim populacijama (Liang S i sar. 2012, Lim JH i sar. 2010, Roten LT i sar. 2011, Germain SJ i sar. 2007).

Ovo istraživanje je pokazalo da je relativna ekspresija TNF- α i IL-1 β iRNK bila viša u grupi slučajeva u odnosu na kontrolu. Posmatrano u odnosu na težinu poremećaja, relativna ekspresija TNF- α je bila značajno viša u obe podgrupe preeklampsije, dok je ekspresija IL-1 β bila veća u grupi teške preeklampsije u odnosu na nekomplikovane trudnoće. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Kalinderis M i sar. 2011, Ribeiro VR i sar. 2017, Vitoratos N i sar. 2010, Lau SY i sar. 2013, Mihui D i sar. 2015, Giorgi VS i sar. 2016, Dong W i sar. 2014, Udenze I i sar. 2015, Siljee JE i sar. 2013, Campos-Cañas J i sar. 2014, Alanbay I i sar. 2012). Ova studija je uočila postojanje značajne pozitivne korelacije između ekspresije IL-1 β i TNF- α na nivou čitavog ispitivanog uzorka, kao i na nivou grupe preeklampsija. Alanbay i saradnici (2012) su pokazali pozitivnu korelaciju između nivoa TNF- α i IL-1 β u grupi zdravih trudnih žena, ali se ovaj odnos nije zadržao i u grupi preeklampsije. Nasuprot Kalinderis-u i saradnicima (2011), naše istraživanje je pokazalo pozitivnu korelaciju između ekspresije IL-1 β i IL-6 u grupi žena sa preeklampsijom.

Ovo je prvo istraživanje koje je ispitivalo povezanost između genskih polimorfizama za GST, eNOS i COMT i ekspresije proinflamatornih citokina u pojavi preeklampsije. Značajna povezanost na nivou celog uzorka ustanovljena je između Val158Met polimorfizma u COMT genu i ekspresije TNF- α iRNK ukazujući da je prisustvo SNP polimorfizma za COMT u vezi za izraženijim proinflamatornim odgovorom u trudnoći generalno.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

*Šljivančanin Jakovljević Tamara, Kontić-Vucinić Olivera, Nikolić Nadja, Čarkić Jelena, Soldatović Ivan, Milasin Jelena. **Glutathione-S-transferase M1 polymorphism and proinflammatory cytokines tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β are associated with preeclampsia in Serbian women.** American Journal of Reproductive Immunology 2019; 81(5):e13105. (M21, IF 3,091)*

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Uloga polimorfizama gena za endotelnu azot oksid sintetazu, katehol O-metiltransferazu, glutation S-transferazu M1 i T1 i ekspresija proinflamatornih citokina u pojavi preeklampsije“ dr Tamare Šljivančanin Jakovljević, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uticaja polimorfizama pomenitih gena i ekspresije proinflamatornih citokina, TNF- α , IL-1 β i IL-6 u pojavi preeklampsije. Rezultati sprovedenog istraživanja doprinose boljem razumevanju etiologije preeklampsije i pružaju uvid u postojanje markera koji bi mogli poslužiti u identifikaciji žena koje pokazuju genetsku predispoziciju za razvoj preeklampsije. Takođe, ovo istraživanje pruža doprinos razvijanju novih dijagnostičkih, prognostičkih i terapijskih pristupa za ovu grupu trudnica.

Doktorska disertacija Tamare Šljivančanin Jakovljević urađena je prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, studija je dobro dizajnirana, a metodologija rada 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 Tamare Šljivančanin Jakovljević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 11.07.2019.

Članovi Komisije:

Prof. dr Željko Miković

Prof. dr Ivana Novaković

Prof. dr Dimitrije Nikolić

Doc. dr Jelena Martić

Prof. dr Nenad Šulović

Mentori:

Prof. dr Olivera Kontić-Vučinić

Prof. dr Jelena Milašin
