

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03.11.2020. godine, broj 9700/11-AĆ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Epigenetika u preeklampsiji: meta-analiza sa meta-regresijom“**

kandidata dr Anđe Ćirković, zaposlene na Institutu za medicinsku statistiku i informatiku Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor je Prof. dr Dejana Stanisavljević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Nataša Milić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Željko Miković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Vesna Garović, Mejo klinika, Ročester, SAD

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 Anđe Ćirković napisana je na ukupno 179 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 23 tabele i 38 figura. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** su definisani hipertenzivni poremećaji u trudnoći. Kao jedan od najvažnijih entiteta koji pripadaju ovoj grupi poremećaja u trudnoći, definisana je i preeklampsija. Dat je detaljan osvrt na do sada ispitivane faktore rizika za nastanak preeklampsije, kao i na kratkoročne i dugoročne efekte preeklampsije na zdravlje deteta i žene. Iako je patogeneza preeklampsije prilično detaljno ispitivana u prethodnim istraživanjima, i dalje postoje nejasnoće koje ukazuju na multifaktorsko poreklo bolesti. Epigenetika, sa svoja četiri najčešće ispitivana markera (metilacija DNK molekula, ekspresija miRNK, izmena histona i genetičko

utiskivanje), je prikazana kao važan faktor koji nedvosmisleno igra ulogu u nastanku preeklampsije.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se od sprovođenja sistematskog pregleda literature i meta-analize studija u kojima je ispitivana povezanost epigenetskih nalaza (utvrđenih analizom metilacije DNK, izmene histona, genetičkim utiskivanjem i pojavom mikroRNK) sa spontanom pojavom preeklampsije kod žena u trudnoći kao i sa eksperimentalno izazvanom preeklampsijom na životinjskim modelima. Takođe kao ciljevi rada navedeni su izdvajanje značajnih karakteristika povezanih sa nastankom preeklampsije kod žena u trudnoći tj. u eksperimentalnim modelima primenom meta-regresije.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o sistematskom pregledu literature sa meta-analizom. Navedene su elektronske baze koje su pretraživane, kriterijumi za uključenje, kao i kriterijumi za isključenje studija. Detaljno je opisan tok prikupljanja, uklanjanja duplikata, skrininga prikupljenih publikacija (čitanje naslova i sažetaka, a zatim i radova u celosti, od strane dva nezavisna recenzenta uz uključivanje trećeg u cilju razrešavanja neslaganja) i postupak ekstrakcije podataka, kao i varijable koje će biti ekstrahovane. Jasno su obrazložene statističke metode koje će se koristiti. ORA analiza je primenjena za ispitivanje asocijacije različito metilisanih gena kod žena sa težom, lakšom ili nespecifičnom formom preeklampsije. Za kvantifikaciju veličine razlike u nivou ekspresije miRNK između grupe žena sa i bez preeklampsije korišćena je standardizovana prosečna razlika sa fiksnim ili slučajnim efektima u zavisnosti od nivoa heterogenosti među studijama koja je ispitivana  $I^2$  metodom.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni 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 446 referenci.

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

Pretragom tri elektronske baze literature (*PubMed*, *Web of Science*, *EMBASE*), prikupljeno je ukupno 2331 publikacija. Nakon uklanjanja duplikata i skrininga naslova i sažetaka, primenom definisanih kriterijuma za uključenje i isključenje, preostalo je ukupno 436

publikacija. Čitanjem svih publikacija u punom tekstu uz dodatno isključenje određenog broja publikacija utvrđeno je da je njih 94 ispitivalo nivo metilacije DNK molekula, 174 nivo ekspresije miRNK, sedam izmenu histona i sedam genetičko utiskivanje u populaciji žena i životinja.

Rezultati sistematskog pregleda 90 publikacija u kojima je ispitivan nivo metilacije DNK molekula u populaciji žena su ukazali na visok stepen heterogenosti između studija u okviru metodoloških karakteristika (studijski dizajn, definicija preeklampsije, karakteristike kontrolne grupe, veličina uzorka, pridruženi faktori), implementacije (tip uzorkovanog tkiva, kvantifikacioni metod za utvrđivanje nivoa DNK molekula, prečišćavanje ekstrahovanog DNK lanca, validacija metilacije), analize (analitički metod, beč efekat, genotipizacija, genska ekspresija) i prikazivanja podataka (mera kvantifikacije metilacije, mera varijabiliteta, izveštavanje rezultata), nakon čega je izvedeno meta-istraživanje. Nakon izvedenog sistematskog pregleda, sprovedeno je meta-istraživanje iz koga su proistekle preporuke za buduće studije asocijacije metilacije DNK molekula i preeklampsije: 1) Izvoditi prospektivne (kohortne) studije ili eventualno ugnježdene studije slučajeva i kontrola u kohortnoj studiji kad god je moguće, pre nego retrospektivne studije; 2) Za definisanje preeklampsije koristiti neki od preporučenih vodiča i uzeti u obzir težinu oboljenja (rana PE, kasna PE, laka PE, teška PE); 3) prilikom formiranja kontrolne grupe voditi računa o gestacionoj starosti, zdravstvenom stanju ciljne populacije (zdrave žene, žene bez hipertenzivnih poremećaja/preeklampsije), uključenju/isključenju žena sa hroničnom hipertenzijom; 4) Voditi računa o pridruženim faktorima (starost majke, gestaciona starost, paritet, etnička pripadnost, pol deteta, udružena oboljenja, sredinski faktori – izloženost hemikalijama, ishrana, stil života – pušački status, konzumiranje alkohola i narkotika); 5) Prema definisanom cilju istraživanja izabrati odgovarajuće tkivo i voditi računa o ćelijskoj raznovrsnosti u istom (odabrati uzorak homogene ćelijske kulture) i ispitivati nivo metilacije u vremenu kroz gestaciju; 6) Navesti detalje o prečišćavanju ekstrahovane DNK; 7) EWAS studije mogu biti korisne za postavljanje hipoteze (obično zahtevaju veći uzorak); 8) Ciljano bisulfitno sekvenciranje otkriva model DNK metilacije u region na kome se može vršiti dalja analiza; 9) Koristiti validacionu kohortu, po mogućstvu odabranu iz druge populacije; 10) Ekspresija gena bi trebalo da bude sastavni deo ovih istraživanja; 11) Nivo metilacije prikazati adekvatnom merom kvantifikacije i navesti originalnu vrednost sa odgovarajućom merom varijabiliteta (aritmetička sredina sa standardnom devijacijom ili medijana sa interkvartilnim opsegom); 12) Detaljno opisati primenjene analitičke statističke metode; 13)

Biti transparentan u prikazivanju podataka i originalne podatke sačuvati u otvorenim repozitorijumima; 14) Minimizirati odstupanja izveštavanjem svih relevantnih meta podataka i uzimanjem u obzir svih izvora varijabiliteta.

Nakon izvedenog sistematskog pregleda na 170 publikacija koje su ispitivale nivo ekspresije miRNK kod žena sa i bez preeklampsije, izvedena je meta-analiza koja je utvrdila sledeće. Nivo ekspresije miRNK-16 u placenti žena sa preeklampsijom je bio značajno viši nego kod žena bez preeklampsije (SMD=0,59, (95%CI=0,25-0,92); p=0,001). Nije postojala statistički značajna razlika u nivou ekspresije miRNK-17 u placenti žena sa u poređenju sa ženama bez preeklampsije (SMD=0,22 (95%CI=-1,35-1,79); p=0,790). Nivo miRNK-20b, kao i nivo miRNK-29b u placenti žena sa preeklampsijom je bio značajno viši nego kod žena bez preeklampsije (SMD=0,89 (95%CI=0,33-1,45); p=0,002) i (SMD=1,37 (95%CI=0,36-2,37); p=0,008). Ekspresija miRNK-30a-3p je takođe imala značajno viši nivo ekspresije u placenti (bazalna ploča) kod žena sa preeklampsijom u poređenju sa ženama bez ovog oboljenja (SMD=1,00 (95%CI=-0,50-2,51); p=0,190), dok ova razlika nije bila značajna u horionskoj ploči placente (SMD=1,52 (95%CI=-0,13-3,17); p=0,070). Nivo miRNK-155 i miRNK-195 u placenti žena sa i bez preeklampsije se nije značajno razlikovao (SMD=2,99 (95%CI=0,83-5,14); p=0,007) i (SMD=-0,16 (95%CI=-1,35-1,02); p=0,780). Meta-analiza je utvrdila postojanje statistički značajno višu ekspresiju miRNK-210 i u placenti i u perifernoj krvi žena sa preeklampsijom u poređenju sa ženama bez oboljenja (SMD=1,62 (95%CI=0,78-2,46); p<0,001 u placenti i SMD=1,04 (95%CI=0,49-1,58); p<0,001 u perifernoj krvi). Jedina miRNK sa značajno sniženim nivoom ekspresije u placenti žena sa preeklampsijom u poređenju sa ženama bez preeklampsije je bila miRNK-376c (SMD=-4,86 (95%CI=-9,51- -0,20); p=0,040).

Meta-regresijom je utvrđeno da ispitivane karakteristike (starost majke, gestaciona starost u vreme porođaja, BMI, sistolni pritisak u vreme postavljanja dijagnoze PE, dijastolni pritisak u vreme postavljanja dijagnoze PE i telesna masa novorođenčeta) nisu bile značajano povezane sa procenjenom veličinom efekta (SMD) u studijama koje su ispitivale nivo ekspresije miRNK-210 u placenti žena sa i bez preeklampsije.

Sistematski pregledi 5 publikacija koje su ispitivale izmenu histona i 6 publikacija koje su ispitivale genetičko utiskivanje u populaciji žena sa i bez preeklampsije su pokazali da su najčešće ispitivani H3K9me3 i H3K27me3 izmenjeni histon i da je nivo ovih izmenjenih

histona bio povišen kod žena sa preeklampsijom, dok se nije izdvojio ni jedan specifičan gen koji podleže genetičkom utiskivanju.

Epigenetski mehanizmi od interesa u ovoj studiji su retko ispitivani i upoređivani između eksperimentalno izazvane preeklampsije na životinjskim modelima i zdravih životinja. Najčešće su ispitivani na pacovima i laboratorijskim miševima, a stanje preeklampsije je indukovano mehaničkim, hemijskim, imunološkim i genetskim uticajima.

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

Do danas nije izveden ni jedan sistematski pregled naučne literature koja ispituje povezanost epigenetskih markera (metilacija DNK molekula, nivo ekspresije miRNK, izmena histona, genetičko utiskivanje) i preeklampsije. U ovoj oblasti, još niko nije primenio meta-istraživanje, a takođe nema ni objedinjenih detaljnih preporuka za unapređenje dizajna, implementacije, analize i prikazivanja podataka u studijama asocijacije nivoa metilacije i preeklampsije. Prethodna istraživanja su, bez dokaza na nivou sistematskog pregleda literature, dala šturu preporuku za poboljšanje metodologije, uzorkovanja i prikazivanja rezultata nivoa metilacije DNK molekula (Hogg i sar., 2014). Naučnici su se uglavnom bavili pojedinačnim pitanjima, ali svoje zaključke nisu potkrepljivali sistematskim pregledom svih relevantnih publikacija za definisano istraživačko pitanje, niti meta-istraživanjem (Michels i sar., 2018, Kurdyukov i sar., 2016, Hogg i sar., 2014). Takođe, niti jedna sveobuhvatna meta-analiza nivoa ekspresije mikroRNK poreklom iz placentalnog tkiva kao i iz periferne krvi majke, nije izvedena. Jedna studija je obuhvatila samo miRNK-210 (Koushki i sar., 2018), a druga, najsvježijeg datuma publikovanja, se bavila samo cirkulišućim miRNK (Yin i sar., 2020). U poređenju sa dve prethodno publikovane meta-analize nivoa ekspresije miRNK kod žena sa i bez preeklampsije, rezultati ovog istraživanja su u određenoj meri konzistentni. Međutim, rezultati se ne mogu u potpunosti porediti, jer je studija koja je ispitivala nivo ekspresije miRNK-210 za izvođenje meta-analize koristila sveobuhvatno, kako vrednosti dobijene na nivou tkiva placentne, tako i vrednosti na nivou periferne krvi majke, a ovo istraživanje je podatke grupisalo u dve meta-analize zasebno, iz placentalnog tkiva i iz periferne krvi majke, a takođe je sprovedena i podgrupna analiza u zavisnosti od težine preeklampsije (teže forme, lakše forme i nespecifična forma preeklampsije). Ovo istraživanje je utvrdilo značajno viši nivo miRNK-210 u placenti žena sa teškom i nespecifičnom formom, ali ne i u placenti žena sa lakšom formom preeklampsije u poređenju sa ženama bez ovog oboljenja, što nije analizirano u prethodnim istraživanjima. Takođe, studija koja je

podrazumevala meta-analizu cirkulišućih miRNK se bavila isključivo dijagnostičkom tačnošću istih, ali ne i njihovim vrednostima u perifernoj krvi majke, za razliku od našeg istraživanja koje je utvrdilo značajno viši nivo miRNK-210 u perifernoj krvi majke sa preeklampsijom u poređenju sa ženama bez preeklampsije.

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

**Cirkovic A, Garovic V, Milin Lazovic J, Milicevic O, Savic M, Rajovic N, Aleksic N, Weissgerber T, Stefanovic A, Stanisavljevic D, Milic N. Systematic review supports the role of DNA methylation in the pathophysiology of preeclampsia: a call for analytical and methodological standardization.** Biol Sex Differ. 2020 Jul 6;11(1):36. doi: 10.1186/s13293-020-00313-8.

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

Doktorska disertacija „Epigenetika u preeklampsiji: meta-analiza sa meta-regresijom“ dr Anđe Ćirković, kao prvo ovakvo istraživanje u našoj zemlji i u svetu, predstavlja originalni naučni doprinos u utvrđivanju povezanosti epigenetskih nalaza i preeklampsije. Rezultati ovog istraživanja imaju višestruk naučni značaj. Meta-istraživanje, kao nov i sofisticiran naučni metod, je za rezultat dao jedinstvene i svrsishodne preporuke za buduće studije asocijacije metilacije DNK molekula i ispitivanog oboljenja. Meta-analize rezultata publikacija koje su ispitivale nivo ekspresije mikroRNK je obezbedilo dokaze koji nedvosmisleno govore u prilog značajnoj ulozi ovih molekula (miRNK-16, miRNK-17, miRNK-20b, miRNK-29b, miRNK-30a-3p, miRNK-155, miRNK-181a, miRNK-195, miRNK-210 i miRNK-376c) u patogenezi preeklampsije. Obzirom da, osim navedenih mikroRNK, za koje je bilo moguće izvesti kvantitativnu sintezu podataka, postoji još veliki broj mikroRNK molekula, utvrđenih sistematskim pregledom literature, a koji se dovode u vezu sa preeklampsijom u pojedinačnim studijama, ovo istraživanje usmerava buduća istraživanja u oblasti ispitivanja povezanosti mikroRNK i preeklampsije.

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 Anđe Ćirković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 23.11.2020.

Članovi Komisije:

Prof. dr Nataša Milić

---

Prof. dr Željko Miković

---

Prof. dr Vesna Garović

---

Mentor:

Prof. dr Dejana Stanisavljević

---