

НАСТАВНО – НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На X редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.09.2014. године, прихваћен је извештај ментора др Марије Гућ-Шћекић о урађеној докторској дисертацији **Нине Илић**, запослене у Институту за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“ у Београду, под насловом: „**Дистрибуција мутација у F8 гену код пацијената из Србије оболелих од хемофилије А**” и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Марија Гућ-Шћекић, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, др Наста Танић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду- Институт за нуклеарне науке „Винча”, др Добрила Вељковић, научни сарадник у пензији, Институт за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“, др Милош Кузмановић, доцент, Универзитет у Београду-Медицински факултет, др Катарина Зељић доцент, Универзитет у Београду-Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Нине Илић** под насловом „**Дистрибуција мутација у F8 гену код пацијената из Србије оболелих од хемофилије А**” написана је на 163 стране. Дисертацију чине седам поглавља: **Увод** (36 страна), **Циљ рада** (1 страна), **Материјал и методе** (39 страна), **Резултати** (36 страна), **Дискусија** (28 страна), **Закључци** (4 стране) и **Литература** (14 страна). Дисертација садржи 37 слика и 36 табела.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

У **уводном делу** докторске дисертације изнет је општи приказ проблематике и најважнији литературни подаци релевантни за разумевање истраживања изнетог у тези. Описан је клинички аспект хемофилије А (ХА) и класификација пацијената према лабораторијским параметрима и тежини клиничке слике. Наведен је начин наслеђивања и учесталост појаве обољења код особа оба пола.. Након тога приказана је молекуларна основа болести, што је обухватило детаљан опис структуре и функције гена F8, као и свих до сада описаних мутација које се налазе у основи патогенезе ХА. Механизам настанка мутација и њихов ефекат на фенотип је такође детаљно описан. На крају је приказана, поред клиничке и молекуларно генетичка дијагностика ХА са основним принципима метода које се користе у ове сврхе.

У поглављу **циљ рада** су представљени сви циљеви обухваћени овом дисертацијом и детаљан план рада да би се они остварили. Основни циљ

истраживања био је утврђивање генетичке основе ХА код пацијента са територије Србије, путем откривања мутација у *F8* гену и дефинисања њихове дистрибуције. Следећи циљ ове доктрске тезе био је анализа добијене дистрибуције мутација у односу на клиничке карактеристике обољења у које спадају клинички облик болести и присуство инхибитора фактора коагулације VIII. Наредни циљ истраживања био је одређивање статуса здравих хетерозиготних носилаца мутације ради давања адекватног генетичког савета и спровођења пренаталне дијагностике у случајевима где је то оправдано.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** кандидаткиња је детаљно описала групу анализираних пацијената као и примењене експерименталне технике. Истраживање је обухватило групу од 71 ХА пацијента код којих је прво спроведена анализа за детекцију инверзија интрона 22 (инв22) и интрона 1 (инв1) гена *F8*. Код 20 пацијенат код којих инверзије нису детектоване, спроведена је анализа за детекцију великих делеција и дупликација. Након тога, у узорку од 46 пацијената са негативним статусом у предходним анализама, спроведен је пресеквенциони скрининг, а потом анализа секвенце делова *F8* гена код 3 пацијента. Студија је такође обухватила анализу статуса носиоца мутација код 42 особе, што је омогућило спровођење пренаталне дијагностике код 9 фетуса у 6 породица. Кандидаткиња је након тога дала детаљан опис реагенаса и процедура за изолацију ДНК из различитих коришћених ткива, а потом је описала методе примењене у истраживању: инверзне ланчане реакције полимеразе за детекцију инв22 и инв1 (Енгл. *inverse shifting PCR - IS PCR*), мултиплекс лигационо-зависне амплификације проба (Енгл. *multiplex ligation-dependent probe amplification-MLPA*) за детекцију великих делеција и дупликација кодирајућег дела *F8* гена, конформационог полиморфизма једноланчане ДНК (Енгл. *single strand conformation polymorphism-SSCP*) у циљу пресеквенционог скрининга, методе секвенцирања и PCR методе за детекцију пола током пренаталне дијагностике. Како би се дефинисао узрок болести у специфичном случају жене оболеле од ХА током студије су такође премењене и описане: цитогенетичка анализа кариотипа и молекуларно-цитогенетичка анализа применом флуоресцентне хибридизације *in situ* (Енгл. *Fluorescence in situ hybridisation - FISH*) на узорку лимфоцита периферне крв. Статистичка обрада добијених резултата урађена је применом χ^2 -теста.

У поглављу **Резултати** кандидаткиња је систематски и јасно изнела резултате према постављеним циљевима који су детаљно описани и табеларно и графички представљени. У првом делу су приказани резултати анализе за детекцију инв22 и инв1 гена *F8*, који су показали учесталост инв22 од 28,1% (20/71) (тип 1 22,5% (16/71), тип 2 5,6% (4/71)) и учесталост инв1 од 4,2% (3/71), док делеције и дупликације интрона 22 нису детектоване. Велике делеције кодирајућег региона *F8* гена детектоване су са учесталошћу од 15% (3/20); код једног пацијента је уочено постојање делеције егзона 7, док је код два пацијента детектована делеција егзона 2-3. Пресеквенционим скринингом издвојена су три пацијента са сумњом на постојање тачкасте мутације, код којих је секвенцирањем код два оболела (2/71; 2,8%) потврђено присуство следећих мутација: (с.6532С>Т) и (с.1332_1332delА). Расподела учесталости детектованих мутација је даље дефинисна у односу на клиничке карактеристике: клинички облик болести и присуство инхибитора за FVIII. Утврђена је учесталост инв22 код пацијента са тешком ХА од 39,1% (18/46)

и код пацијента са умереном ХА од 14,3% (2/4), док код пацијента са благим обликом болести ова мутација није детектована. На основу статистичких анализа ових резултата доказана је позитивна корелација присуства инв22 и тешког клиничког облика ХА. Присуство инв1 детектовано је искључиво код пацијента са тешком ХА (3/46; 6,5%), а позитивна генотип-фенотип корелација није утврђена. Велике делеције уочене су код пацијената са тешком (2/15; 13%) и умереном ХА (1/5; 25%), а статистичка анализа такође није потврдила постојање позитивне корелације. Код пацијента са присутним инхибитором FVIII, детектована је учесталост инв22 од 37,5% (3/8), док је код 12,5% (1/8) пацијента утврђено присуство велике делеције. Спроведена статистичка анализа корелације инв22 генотипа и фенотипа са инхибитором код оболелих од тешке ХА дала је негативне резултате. Статус носилаца мутација дефинисан је код свих анализираних особа и показао је присуство генотипа инв22/н код 93% (14/15) мајки, 45% (10/22) сестара и 100% (4/4) ћерки оболелих, генотипа инв1/н код 100% (1/1) мајки оболелих и делеција егзона 2-3/н код 100% (1/1) анализираних сестара. Пренатална анализа у 9 трудноћа показала је присуство 6 фетуса женског пола, и у тим случајевим даљу пренаталну дијагностику није било потребно радити, док су пренаталне анализе код 3 фетуса мушког пола показале присуство инв22. Као посебан, изузетно редак случај, у овој студији су претстављени резултати анализа спроведених код једне пацијенткиње, особе женског пола оболеле од ХА. Пацијенткињи је дефинисано хетерозиготно присуство делеције интрона 22 и делеције егзона 1-22 гена F8, а цитогенетичке и молекуларно цитогенетичке анализе су показале постојање мозаичног кариотипа:

a) цитогенетичка анализа: mos 47,XX,+mar(2)/47,XXX(2)/46,XX(47);

b) FISH анализа:

- mos nuc ish (DXZ1x1)(15/162)/(DXZ1x3)(12/162)/(DXZ1x2)(135//162);
- mos ish (DXZ1x4)(1/28)/(DXZ1x3)(2/28)/

(DXZ1x1)(5/28)/ (DXZ1x2)(20/28).

У поглављу **Дискусија** разматрани су резултати истраживања, упоређени су са досадашњим доступним литературним подацима и истакнут је њихов значај. Она је написана садржајно и јасно, и на критички начин сагледава резултате приказане у претходном поглављу. Цитирана литература је адекватна за тумачење резултата ове дисертације и на прави начин осликава тренутна сазнања из области. У складу са претходним поглављем кандидаткиња у првом делу дискутује резултате анализе детекције мутација у F8 гена. Детектована учесталост инв22 код оболелих у Србији одговара до сада регистрованој учестлости ове мутације у другим обрађеним популацијама, као и детектована учесталост инв1. Уочена учесталост великих делеција је значајно виша него што се у литератури наводи што кандидаткиња дискутује као могућу последицу малог броја обрађених пацијента. Детектоване тачкасте мутације у литератури су такође већ описане као узок настанак ХА и кандидаткиња о њима дискутује као о спорадичним случајевима у популацији хемофиличара из Србије, што одговара истраживањима у другим популацијама. Након анализе дистрибуције учесталости детектованих мутација у односу на

клинички облик обољења, кандидаткиња истиче да је учесталост инв22 највећа код оболелих од тешког клиничког облика обољења и статистички се не разликује од учесталости у другим етничким популацијама. Такође наводи, да је потврђена позитивна корелација генотипа са инв22 и фенотипа са тешком клиничком сликом у складу са досадашњим истраживањима, а објашњена је утицајем мутације на потпуни губитак нормалне функције гена. Постојање инв22 код пацијената оболелих од умерене ХА, на основу литературних података представља редак случај, а њихову детекцију током ове студије кандидаткиња објашњава као последицу специфичног механизма настанка ове промене и могућег присуства соматског мозаицизма код оболелих. За детектовану учесталост инв1, искључиво код пацијената са тешком ХА, током ове студије, кандидаткиња истиче да је у складу са објављеним резултатима код других етничких група, а негативне резултате генеотип-фенотип корелације оправдава ниском учесталошћу ове мутације. Нешто виша учесталост великих делеција детектована код пацијената са тешком ХА у односу на друге популације, објашњена је као последица малог броја обрађених пацијената. Дистрибуција мутација код пацијената са инхибитором за FVIII у сагласности је са резултатима из доступне литературе, као и детектована негативна корелација инв22 генотипа и фенотипа са инхибитором. Добијене негативне резултате статистичких анализа кандидаткиња дискутује као последицу већ потврђене мултифакторијалне природе развоја инхибитора. Након анализе статуса носилаца потврђена је до сада у литератури регистрована стопа *de novo* инв22 и инв1, а објашњена је механизмом настанка ових промена током сперматогенезе. У породицама код којих су женске особе дефинисане као хетерозиготни носиоци саветовано је спровођење пренаталне дијгностике. Током спровођења пренаталне дијгностике код трудница код којих је детектовано присуство женског фетуса даља анализе нису саветоване што је објашњено чињеницом да су случајеви женских особа оболелих од ХА ретки. Код фетуса мушког пола, због вероватноће од 50% да оболе од ХА, детекција мутација је спроведена, а позитивни резултати су показали оправданост оваквог приступа. На основу резултата посебног дела студије, где је анализиран редак случаја женске особе оболеле од ХА, откривен је узрок настанка болести, и дефинисан присуством мутације у F8 гену као и постојањем аберантног, мозаичног кариотипа.

На основу добијених резултата изнети су **Закључци** ове докторске дисертације који одговарају постављеним циљевима и сажимају најважније ставове изнете у дискусији. Закључено је да се утврђена дистрибуција мутација у гену F8 код оболелих од ХА са територије Србије не разликује (осим за случај великих делеција) од дистрибуције у другим анализираним етничким групама. Уочена је корелација тешког клиничког облика болести и инв22, док иста корелација за инв1 и велике делеције није утврђена, као ни позитивна генотип – фенотип корелација инв22 и присуства инхибитора FVIII. Потврђен је значај анализа за детекцију статуса носиоца у циљу давања генетичког савета и спровођења пренаталне дијагностике, а добијени резултати такође су и потврда ефикасности примењених метода и спроведене дијагностичке стратегије.

У поглављу **Литература** наведене су референтне публикације које обухватају 108 наслова који се адекватно наводе у тексту.

БИБЛИОГРАФИЈА

Кандидат је публиковала 5 научних радова, учествовала са 11 саопштења на међународним и 6 на домаћим научним скуповима, и објавила три рада у тематским зборницима националног значаја, што укупно чини 25 библиографских јединица. Публиковани радови и саопштења су из уже научне области дисертације, а 4 библиографске јединице је проистекло из теме дисертације, од чега један рад са СЦИ листе.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја: М23

Шић N, Krstić A, Kuzmanović M, Mičić D, Konstandinidis N, Guć-Ščekić M: Identification of intron 1 and intron 22 inversions of factor VIII gene in Serbian patients with hemophilia A. Genetika 2013;45(1): 207-216

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја: М34

Lakić N, A. Krstić, M. Guć-Sčekić, D. Micic, M. Kuzmanovic, N. Rasovic, N. Konstantinidis: Molecular analyses of F8 gene in Serbian hemophilia A patients. European Journal of Human Genetics 2010; 18 (1) : 322

Шић N, Krstić A, Djurisić M, Kuzmanović M, Mičić D, Guć-Sčekić M: Postnatal and prenatal detection of recurrent inversions of F8 gene in hemophilia A patients using IS-PCR .V Congress of Serbian Genetic Society 2014

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја: М64

Lakić N, Krstić A, Guć-Ščekić M, Mičić D, Kuzmanović M, Jovanović A, Rašović N: Detekcija inverzije introna 22 i introna 1 u F8 genu kod pacijenata sa Hemofilijom A. Pedijatrijski dani Srbije, Niš. Zbornik radova 2009;155-166.

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертације Нине Илић под називом „**Дистрибуција мутација у F8 гену код пацијената из Србије оболелих од хемофилије А**”, представља оригиналан научни допринос у истраживањима молекуларно генетичке основе хемофилије А (ХА).

Начин истраживања, методе и обрада добијених резултата представљају модел за поуздану и прецизну молекуларно генетичку дијагностику ХА. Са аспекта примене, добијени резултати ће омогућити у будућности формирање националног регистра болесника оболелих ХА, са потпуно дефинисаном молекуларно генетичком основом, кроз које ће овим пацијентима бити омогућено укључивање у светска преклиничка и клиничка испитивања нових терапијских приступа. Велики значај ових резултата представља и чињеница да они омогућавају пружање адекватног генетичког савета породицама са ХА, могућност пренаталне дијагностике и на тај начин планирање добијања здравог потомства.

Кандидаткиња је у својој докторској дисертацији успешно испунила постављене циљеве истраживања кроз опсежан експериментални рад. У току израде докторске дисертације она је демонстрирала истраживачку зрелост у одабиру експерименталног приступа. Начин на који је анализирали и дискутовала добијене резултате јасно указује на изузетан степен њеног познавања домаће и стране литературе из ове области. Мишљење комисије је да докторска дисертација испуњава све стандардне услове и критеријуме. На основу свега изнетог предлажемо Наставно-научном већу да прихвати извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидаткиње Нине Илић.

Београд, 12.11.2014.

Комисија:

др Марија Гућ-Шћекић, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Милош Кузмановић, доцент
Универзитет у Београду -Медицински факултет

др Наста Танић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду-Институт за нуклеарне науке
„Винча”

др Добрила Вељковић, научни сарадник у пензији,
„Институт за здравствену заштиту мајке и детета
Србије „Др Вукан Чупић“

др Катарина Зељић доцент,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

