

**NASTAVNO – NAUČNOM VEĆU STOMATOLOŠKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na IV redovnoj sednici Nastavno – naučnog veća Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu održanoj 9. maja 2023 godine, imenovana je Komisija u sastavu:

Prof. dr Ivana Šćepan, Stomatološki fakultet, Beograd

Doc. dr Jovana Juloski, Stomatološki fakultet, Beograd

Prof. dr Ivana Novaković, Medicinski fakultet, Beograd

za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom **„ISPITIVANJE GENETIČKIH
POLIMORFIZAMA POTENCIJALNO ODGOVORNIH ZA POJAVU
MANDIBULARNOG PROGNATIZMA“**

Kandidat: dr Olga Milošević

Mentori: Prof. dr Jelena Milašin

Prof. dr Branislav Glišić

Imenovana Komisija je proučila doktorsku disertaciju i podnosi Nastavno – naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

Olga Milošević, doktor stomatologije, rođena je 25.6. 1979. u Beogradu. Završila je Prvu beogradsku gimnaziju u Beogradu 1998. godine sa odličnim uspehom. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1998/99 godine. Diplomirala je 2005. godine sa prosečnom ocenom 8,51. Obavezan staž u trajanju od godinu dana završila je na Stomatološkom fakultetu. Državni ispit položila je 2006. godine. Specijalizaciju iz oblasti Ortopedija vilica upisala je na Stomatološkom fakultetu u Beogradu 2009. godine. Zvanje specijaliste ortopedije vilice stekla je 26.12. 2013. godine sa odličnom ocenom na završnom ispitu. Doktorske studije na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu „Bazična i klinička istraživanja u stomatologiji, upisala je školske 2014/15. Položila je sve predmete predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10.00.

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Olge Milošević pod nazivom „**ISPITIVANJE GENETIČKIH POLIMORFIZAMA POTENCIJALNO ODGOVORNIH ZA POJAVU MANDIBULARNOG PROGNATIZMA**” napisana je na 102 strane, i ilustrovana sa 17 tabela i 33 slike. Disertacija sadrži: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, uvod, ciljeve istraživanja, materijal i metode, rezultate, diskusiju, zaključke, literature, prilog i biografiju kandidata.

U **Uvodu** kandidat opisuje karakteristike, klasifikaciju i epidemiologiju mandibularnog prognatizma (MP), a napravljen je i kratak istorijski osvrt na pojavu ove malformacije. Prikazan je kako ekstra-, tako i intra-oralni nalaz pacijenta sa mandibularnim prognatizmom. Opisana je etiologija MP i dati su podaci o učestalosti u različitim rasama, kao i osvrt na faktore koji dovode do pojave MP. Posebno težište je stavljeno na genetičke i sredinske faktore. Potom se razmatraju različiti tipovi nasleđivanja MP (autozomno recesivno i autozomno dominantno nasleđivanje sa varijabilnom ekspresivnošću i sa potpunom ili nepotpunom probojnošću, kao i poligeno, odnosno multifaktorsko nasleđivanje), sa posebnim akcentom na značaj genskih polimorfizama. Velika pažnja posvećena je genima čiji su polimorfizmi ispitivani: *BMP4*, *COL1A1*, *MYO1H*, *MATN1*, *MMP9*. Razmotreni su mehanizmi njihovog delovanja i eventualni uticaj na rast mandibule. I svaki polimorfizam je posebno opisan (njegova pozicija na hromozomu i genu, funkcionalni značaj i dr). kao i potencijalna uloga u razvoju mandibularnog prognatizma. U ovom poglavlju takođe se detaljno opisuju teorije rasta kraniofacijalnog skeleta, zatim daje klasifikacija malokluzija, kefalometrijski i telerendgenski parametri (tačke, ravni i uglovi neophodni za izradu pravilne ortodontske analize), i uopšte, nudi celovit klinički aspekt problema MP.

U poglavlju **Ciljevi istraživanja** precizno su definisani ciljevi studije i hipoteza istraživanja. Ciljevi istraživanja bili su: (1) Utvrditi učestalost genotipova i alela za polimorfizme pojedinačnog nukleotida (Single Nucleotid Polymorphism-SNP) za *COL1A1* (-1997 G/T, rs1107946), *BMP-4* (538 T/C, rs17563), *MATN1* (-1878 A/G, rs1149048), *MYO1H* (-1001 G/A, rs3825393) i *MMP9* (-1562 C/T, rs3918242) u grupi pacijenata sa mandibularnim prognatizmom, kao i u kontrolnoj grupi; (2) Ispitati asocijaciju polimorfizama navedenih gena sa rizikom za nastanak mandibularnog prognatizma, na osnovu razlike u

distribuciji učestalosti alela i genotipova između grupe pacijenata sa mandibularnim prognatizmom i kontrolne grupe; (3) Ispitati povezanost genotipova sa kliničkim fenotipom u okviru grupe sa mandibularnim prognatizmom.

Hipoteza: Polimorfizmi u genima za kolagen tip 1(*COL1A1*), matrilin 1 (*MATN1*), miozin IH (*MYO1H*), morfogenetski protein kosti 4 (*BMP-4*) i matriksnu metaloproteinazu 9 (*MMP-9*) mogu potencijalno da utiču na nastanak mandibularnog prognatizma (MP), kao i da odrede različite fenotipske karakteristike skeleta lica.

U poglavlju **Materijal i metode** za ovu prospektivnu studiju, jasno su definisani dizajn studije (prospektivna studija asocijacije) i selekcija pacijenata (uključenje/isključenje), a zatim su predstavljene molekularno-genetičke i kliničke metode korišćene u istraživanju. Studija je obuhvatila dve grupe ispitanika: eksperimentalnu i kontrolnu. Eksperimentalnu grupu je sačinjavalo 60 osoba sa mandibularnim prognatizmom, lečenih na Klinici za ortopediju vilica Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dok je kontrolnu grupu sačinjavalo 60 osoba sa usklađenim viličnim odnosom. Od pacijenata je najpre dobijena pisana saglasnost za istraživanje, a zatim su prikupljeni odgovarajući anamnestički podaci, brisevi obrazne sluzokože; urađen im je i detaljan ortodontski pregled i telerendgenski snimci. Iz brisa bukalne sluzokože izolovana je genomska DNK koja je korišćena za dalje genetske analize. Ova istraživanja obavljena su u Laboratoriji za bazična istraživanja Stomatološkog fakulteta. U cilju ispitivanja polimorfizama gena *MATN1*, *MYO1H*, *MMP-9*, *BMP-4* i *COL1A1* primenjena je tehnika lančane reakcije polimeraze i restrikciona analiza (PCR/RFLP engl. polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphisms). Statistička obrada prikupljenih podataka vršena je pomoću programskog paketa SPSS verzija 18.0.

U poglavlju **Rezultati** prvo su izneti epidemiološki podaci i rezultati kliničkih odnosno kefalometrijskih ispitivanja. Potom su dati rezultati genetičkih ispitivanja, i to tako što je kandidatkinja najpre upoređivala učestalosti genotipova i alela između pacijenata sa MP i kontrolne grupe, zatim je sprovedena logistična regresiona analiza da bi se ustanovilo da li neki od polimorfizama predstavljaju factor rizika za nastanak MP. Konačno, urađena je studija povezanosti genotipova sa kefalometrijskim parametrima. Kandidatkinja je pokazala da polimorfizam rs1107946 u genu za *COL1A1*, iako grupe ispitanika nisu u Hardi-Vajnbergovoj (HWE) ravnoteži, predstavlja faktor rizika za nastanak MP. Takođe, heterozigoti (CT) za ovaj SNP imali su značajno više vrednosti ANB ugla i MP/i, i niže

vrednosti za IMPA faktor od ostalih genotipova. Za polimorfizam rs17563 u *BMP4* genu utvrđeno je da su ispitanici obe grupe bili u HWE, ali nije ustanovljena povezanost sa MP, bez obzira na primenjeni model nasleđivanja. Ovaj polimorfizam nije pokazao uticaj ni na kliničke parametre kod pacijenata sa mandibularnim prognatizmom. Za polimorfizam rs1149048 unutar promotora gena za *MATN1*, pokazano je da su obe grupe ispitanika u HWE. Rezultati logističke regresione analize nisu ukazale na povezanost određenih genotipova sa rizikom od pojave MP. Isto tako polimorfizam u *MATN1*, nije pokazao efekat ni na jedan od kefalometrijskih parametara, odnosno nije uticao na klinički fenotip pacijenata sa mandibularnim prognatizmom. Polimorfizam rs3825393 na poziciji 1001 unutar gena za *MYO1H* pokazao je asocijaciju sa MP. Rezultati logističke regresione analize navode na zaključak da je kod osoba koje su heterozigoti (CT) za ovaj SNP u *MYO1H* genu, 2,74 puta povećan rizik za nastanak mandibularnog prognatizma. Pored toga, heterozigoti (CT) za ovaj SNP imali su značajno više vrednosti SNB ugla i niže vrednosti za IMPA faktor od ostalih genotipova. Konačno, polimorfizam rs3918242 u promotorskom regionu gena za *MMP9* nije pokazao asocijaciju sa pojavom MP. Međutim, ovaj SNP imao je uticaj na ANB ugao, na SN/MND, kao i na AO/BO/Wits odnose. Ovim je pokazano da je recesivne homozigote karakterisalo značajno smanjene vrednosti ANB ugla i značajno povećanje vrednosti korpusa mandibule.

U poglavlju **Diskusija** razmatrana je nasledna predispozicija za razvoj mandibularnog prognatizma, kao i obrasci njegovog prenošenja. Kandidatkinja navodi da je odabir gena (i genskih polimorfizama) u studiji urađen u svetlu onoga što je poznato o procesu razvika mandibule. Iz ugla morfogeneze kostiju i hrskavice, u red najvažnijih gena, svakako spada gen *COL1A1*, odgovoran za sintezu alfa 1 lanca kolagena tipa 1 koji je najzastupljeniji protein u koštanom tkivu, tetivama, hrskavici i koži. *MMP9* gen, odgovoran je za sintezu želatinaze B koja pripada porodici matriksnih metaloproteinaza (MMP) i jedan je od najzastupljenijih i funkcionalno vrlo bitnih enzima u ćelijama kostiju i hrskavice tokom normalnog razvoja skeleta. Polimorfizmi u genima kao što su *MATN1*, *MYO1H* i *BMP-4* su takođe predloženi kao modulatori susceptibilnosti za razvoj mandibularnog prognatizma.

Navodi se da bi rezultati genetičkih studija mogli pomoći kliničarima da redovnije, tokom detinjstva, obavljaju preglede osoba koje su nosioci specifičnih genotipova, odnosno osoba koje karakteriše povećan rizik da razviju mandibularni prognatizam. Ističe se da značaj studija asocijacije leži u uspostavljanju veze između polimorfizama i specifičnih kliničkih nalaza, tj. parametara i shodno tome rezultati ovakvih studija doprineli bi donošenju pravovremenih odluka od strane ortodonata o tome kada i na koji način da se kod dece

započne sa lečenjem mandibularnog prognatizma. Kandidatkinja ističe da otkrivanje povezanosti polimorfizama sa kliničkim parametrima mandibularnog prognatizma može pomoći i u smanjenju štetnih efekata prekomernog lečenja i potencijalno predvideti terapijske odgovore. Naime, povezivanje genetskih polimorfizama i fenotipa nakon tretmana pacijenata sa mandibularnim prognatizmom može pomoći u prepoznavanju pojedinaca sa neželjenim ili pak povoljnim hirurškim odgovorima i na taj način ponuditi precizniju odluku u vezi sa kliničkim protokolom. Konačno, rezultati studija asocijacije, mogu postaviti i temelje za gensku terapiju MP u budućnosti.

Zaključci su izneti sažeto i jasno, po značaju dobijenih rezultata: (1) Polimorfizam u genu za *MYO1H* predstavlja faktor rizika za nastanak mandibularnog prognatizma; (2) heterozigoti (CT) za *MYO1H* polimorfizam imaju značajno više vrednosti SNB ugla, kao i niže vrednosti za IMPA faktor od ostalih genotipova; (3) polimorfizam u genu za *COL1A1* u recesivnom modelu nasleđivanja takođe predstavlja faktor rizika za nastanak mandibularnog prognatizma (sa graničnom statističkom značajnošću); (4) nosioci varijantnog TT genotipa u genu za *COL1A1* imaju značajno niže vrednosti ANB ugla; (5) polimorfizam u genu za *MMP9* nije faktor rizika za nastanak mandibularnog prognatizma, ali je varijantni homozigot TT povezan sa značajno manjim vrednostima ANB ugla, višim vrednostima dužine korpusa mandibule u odnosu na prednju kranijalnu bazu, kao i nižim vrednostima WITS parametra, što ukazuje na njegov uticaj na klinički fenotip mandibularnog prognatizma; (6) polimorfizmi u genima za *BMP-4* i *MATN1* nisu pokazali asocijaciju ni sa povećanim rizikom od mandibularnog prognatizma niti sa njegovim kliničkim karakteristikama.

Poglavlje **Literatura** sadrži spisak od 145 adekvatno citirane reference iz relevantne naučne literature.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Polimorfizam u genu za *MYO1H* pokazao se kao faktor rizika za nastanak MP (heterozigoti imaju 2,7 puta veći rizik za pojavu MP). Heterozigoti za ovaj SNP takođe imaju značajno više vrednosti ANB ugla, MP/i, i niže vrednosti za IMPA faktor od ostalih genotipova. SNP u *COL1A1* takođe predstavlja faktor rizika za nastanak MP (recesivni homozigoti TT imaju 2,3 puta veći rizik da razviju MP u odnosu na druge genotipove). Homozigoti za varijantni alel (TT) imaju značajno niže vrednosti ANB ugla. SNP u *MMP9* nije pokazao asocijaciju sa MP, ali varijantni homozigot TT bio je povezan sa manjim vrednostima ANB ugla, višim vrednostima dužine korpusa mandibule u odnosu na prednju

kranijalnu bazu, kao i nižim vrednostima WITS parametra. Polimorfizmi u *BMP-4* i *MATN1* nisu bili asocirani sa MP.

C. Uporedna analiza doktorske disertacije sa podacima iz literature

Kandidatkinja navodi da je ova studija prva koja se bavila uticajem *COL1A1* polimorfizma na poziciji -1997 G/T na razviće mandibule, odnosno na pojavu mandibularnog prognatizma u kojoj je ustanovljena povezanost između ovog SNP i mandibularnog prognatizma. Dosadašnje studije asocijacije su dovele više genskih lokusa u vezu sa fenotipom mandibularnog prognatizma, ali konkretno ne i ovaj SNP. *COL1A1* je usko povezan sa rastom i razvojem temporomandibularnog zgloba i kao takav je važna determinanta dužine i visine mandibule. Prethodne studije su otkrile povezanost između SNP-a (rs2249492) u genu *COL1A1* i klase II (Dohmoto A et al, 2002), kao i malokluzije klase III (Wolff G et al, 2002). Veoma je zanimljiv rad Perini i saradnika, na Brazilskoj populaciji, u kom je ustanovljeno da *COL1A1*-1997 G/T SNP smanjuje rizik od rupture prednjeg ukrštenog ligamenta kolena, tj. da, neočekivano, ima protektivni efekat (Perini et al, 2022). Velika metaanaliza sa preko 24000 pacijenata, kojom su bili obuhvaćeni različiti polimorfizmi *COL1A1* uspeła je da pokaže da -1997 varijantni alel utiče na smanjenje gustine kostiju kičmenog stuba (Jin H. et al, 2011), što sve skupa ukazuje na značaj ovog SNP za koštani sistem.

U svojoj studiji kandidatkinja nije pronašla vezu između polimorfizma *BMP-4* gena (rs17563) i povećanog rizika od razvoja MP. Slično ovim rezultatima, Kuchler i saradnici takođe nisu pronašli povezanost između polimorfizma *BMP-4* i malokluzija skeleta klase III. Studija na Brazilskoj populaciji, koja je obuhvatila više polimorfizama, dovela je u vezu polimorfizme u *BMP-4* i razvoj malokluzija i poremećaja u razvoju mandibule (Calvano Kuchler et al. 2019, Boyne PJ, 2001). Metaanaliza Yue-Hua Li i saradnika iz 2017, potvrdila je da je polimorfizam *BMP-4* na poziciji 538 A-G doveden u vezu sa izvesnim kraniofacijalnim malformacijama kao što su nesindromski rascepi usne i nepca, ali isključivo kod pripadnika azijske populacije; isti polimorfizam je predstavljao protektivni faktor u brazilskoj populaciji. Ovo praktično znači da i dalje ne postoji konsenzus u pogledu značaja ovog polimorfizma u razvoju MP.

Promotorski polimorfizam *MATN1* -158 T>C (rs1149048) nije bio povezan sa rizikom od nastanka mandibularnog prognatizma, a nije imao uticaj ni na kefalometrijske

parametre koji su bili obuhvaćeni analizom. Međutim, autori koji su ispitivali druge polimorfizme u *MATN1* genu ustanovili su da su 7987 G>A i 8572 C >T SNP povezani sa MP (prvi SNP smanjuje rizik od mandibularnog prognatizma, dok ga drugi povećava). Ovi autori su na kraju sugerisali da polimorfizmi u *MATN1* genu imaju značaj u etiologiji mandibularnog prognatizma i da se mogu smatrati markerima predispozicije za mandibularni prognatizam, ali specifično u azijskoj populaciji (Jang JY et al, 2010). Takođe, i studija na deuterio-malajskoj etničkoj pokazala je asocijaciju između polimorfizma u *MATN1* genu i MP, odnosno makokluzije klase III. (Laviana, A. et al, 2021). Drugim rečima, samo je kod Azijata pokazana veza između ovog SNP i MP.

Polimorfizam *MYO1H* 1001 G/A (rs3825393) bio je povezan MP. Kandidatkinja je pokazala da je ovaj SNP faktor predispozicije za pojavu mandibularnog prognatizma, a pokazala je i da ispitani polimorfizam ima uticaj na SNB ugao i da postoji značajna razlika u uglovima u zavisnosti od genotipa, što je u saglasnosti sa radom da Fontoura i sar. o uticaju *MYO1H* na odnos maksile i mandibule u sagitalnoj ravni. Ova studija pokazala je i povezanost ovog SNP-a sa MP/i i sa IMPA. Tassopoulou-Fishell i saradnici su našli da je drugi SNP u *MYO1H* (rs10850110) povezan sa mandibularnim prognatizmom. I studija Ghergie i sar. na rumunskoj populaciji ukazuje na povezanost *MYO1H* rs10850110 sa skeletnom malokluzijom klase III. Bez obzira što su u pitanju različiti SNP, zaključak je da *MYO1H* bitan za MP. Sun i saradnici su pak u svojoj sveobuhvatnoj funkcionalnoj analizi varijanti gena *MYO1H* otkrili da je *MYO1H* 1001 C/T SNP značajno povezan sa MP kod kineskih pacijenata, ali zanimljivo je da je u njihovoj studiji alel C bio povezan sa povećanim rizikom od mandibularnog prognatizma, dok je u srpskoj populaciji ovaj alel imao protektivan efekat.

S obzirom da je ova studija prva proučavala polimorfizam -1562 C/T (rs3918242) u genu za *MMP9* u kontekstu asocijacije sa mandibularnim prognatizmom, kandidatkinja nije bila u situaciji da poredi svoje nalaze sa rezultatima drugih autora. Prethodno su polimorfizmi u *MMP-9* genu dovedeni u vezu sa malokluzijom prednjeg otvorenog zagrižaja (Kuchler et al., 2017), kao i sa temporomandibularnim poremećajima i to na srpskim ispitanicima (Milošević N. et al., 2015). Grant M. J. i saradnici su utvrdili da je *MMP9* uključen u ortodontsko preoblikovanje periodoncijuma, odnosno u odgovor na sile tokom pomeranja zuba. Iako ovaj SNP nije bio faktor rizika za pojavu MP, studija je utvrdila da postoji značajna razlika kod nosilaca različitih genotipova u *MMP-9* genu u pogledu vrednosti ANB ugla, veličine korpusa mandibule i Wits-ove analize.

Posmatrano u celini, kandidatkinja smatra da njeni rezultati podržavaju koncept genskih polimorfizama kao modulatora rizika za razvoj mandibularnog prognatizma, iako nije pronađen veliki broj asocijacija između ispitivanih SNP i pojave MP. Kandidatkinja navodi da je neophodno u daljim studijama, kako na našoj populaciji tako i na pripadnicima drugih etničkih grupa, uključiti veće kohorte ispitanika i nove gene kako bi se bolje razumela uloga naslednih faktora u ovom kraniofacijalnom deformitetu.

D. Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Milošević O., Nikolić N., Čarkić J., Juloski J., Vučić Lj., Glišić B., Milašin J., 2022; Single nucleotide polymorphisms MYO1H 1001 C>T SNP (rs3825393) is a strong risk factor for mandibular prognathism, American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics;S0889-5406(22)00469-3 (M22)

Milošević O., Nikolić N., Čarkić J., Majstorović N., Glišić B., Milašin J., 2022; Analysis of COL1A1 and MMP9 single nucleotide polymorphisms in mandibular prognathism, Genetika, Vol. 54, No2, 777-786 (M23)

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**ISPITIVANJE GENETIČKIH POLIMORFIZAMA POTENCIJALNO ODGOVORNIH ZA POJAVU MANDIBULARNOG PROGNATIZMA**“ dr Olge Milošević predstavlja značajan i originalan naučni doprinos u ispitivanju uticaja polimorfizama na razvoj mandibularnog prognatizma. Polimorfizam u genu za *MYO1H* predstavlja faktor rizika za nastanak mandibularnog prognatizma, kao i polimorfizam u genu za *COL1A1*. Pored toga, ova dva polimorfizma, kao i polimorfizam u *MMP9* genu pokazuju značajan uticaj na kefalometrijske parametre kod pacijenata sa mandibularnim prognatizmom. Doktorska disertacija Olge Milošević je prva studija ove vrste na našoj populaciji.

Doktorska disertacija dr Olge Milošević urađena je prema svim principima naučnog, i kliničkog istraživanja, sa precizno postavljenim ciljevima, originalnim naučnim pristupom, savremenom metodologijom rada, adekvatno prikazanim i diskutovanim rezultatima i jasno uobličenim zaključcima.

Nakon uvida u dostavljeni tekst komisija je jednoglasno ocenila da doktorska disertacija pod nazivom „**ISPITIVANJE GENETIČKIH POLIMORFIZAMA POTENCIJALNO ODGOVORNIH ZA POJAVU MANDIBULARNOG PROGNATIZMA**“ dr Olge Milošević predstavlja originalno, samostalno i dobro dokumentovano istraživanje.

Doktorska disertacija ispunjava sve kriterijume propisane Zakonom o Univerzitetu i statutima Univerziteta i Stomatološkog fakulteta u Beogradu.

Na osnovu svega napred navedenog, Komisija predlaže Nastavno – naučnom veću Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Olge Milošević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora stomatoloških nauka oblast ortopedija vilica.

U Beogradu, 12. maj 2023. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Ivana Šćepan
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Jovana Juloski
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Ivana Novaković
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

