

Примљено: 3. 3. 2023.

Орг. јед.	Број	Прилог
	Образац - 2	<i>jeidoj</i>

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ФАКУЛТЕТ: МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



ИЗВЈЕШТАЈ

о оијени подобности теме, кандидата и ментора за израду докторске дисертације

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

Орган који је именовао комисију: Научно – наставно вијеће Медицинског факултета

Датум именовања комисије: 08.02.2023. године

Број одлуке: 18/3.134/2023

Састав комисије:

1. Матић Марија	Ванредни професор	Медицинска и клиничка биохемија
Презиме и име <u>Универзитет у Београду</u> Установа у којој је запослен-а	Звање	Научно поље и ужа научна област Предсједник комисије Функција у комисији
2. Ђорић Весна	доцент	Медицинска и клиничка биохемија
Презиме и име <u>Универзитет у Београду</u> Установа у којој је запослен-а	Звање	Научно поље и ужа научна област Члан комисије Функција у комисији
3. Видовић Вања	доцент	Хумана генетика
Презиме и име <u>Универзитет у Бањој Луци</u> Установа у којој је запослен-а	Звање	Научно поље и ужа научна област Члан комисије Функција у комисији

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Име, име једног родитеља, презиме: Жана (Горан) Радић Савић
2. Датум рођења: 11. 07. 1992. Мјесто и држава рођења: Бања Лука, БиХ

II.1 Основне студије

Година уписа: 2011 Година завршетка: 2017 Просјечна оцјена током студија: 9.17

Универзитет: Универзитет у Бањој Луци

Факултет/и: Медицинска факултет

Студијски програм: Медицина

Звање: доктор медицине

II.2 Мастер или магистарске студије

Година уписа: Година завршетка: Просјечна оцјена током студија:

Универзитет:

Факултет/и:

Студијски програм:

Звање:

Научна област:

Наслов завршног рада:

II.3 Докторске студије

Година уписа: 2018

Факултет/и: Медицински факултет

Студијски програм: Биомедицинске науке

Број ЕЦТС до сада остварених: 120

Просјечна оцјена током студија: 9.56

II.4 Приказ научних и стручних радова кандидата

Р. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница	Категорија ¹
1.	Радић, Ж., Калинић, Д., Марић, Д. Изазови у дијагностици фиброму скуларне дисплазије. Зборник сажетака и изабраних радова у целини, Пети међународни конгрес доктора медицине Републике Српске, Теслић, 2017: 25-31	

Кратак опис садржине:

Фиброму скуларна дисплазија (ФМД) је хетерогена група неинфламаторних и неатеросклеротских болести артеријских крвих судова која води ка стенози малих и средњих артерија. ФМД обично погађа жене између 40 и 60 година живота. Узрок ФМД је непознат. Сматра се да наследни фактори и пушење могу бити предиспонирајући фактори. Иако може да захвати било који крвни суд најчешће захвати реналну и каротидну артерију. Клиничка слика ФМД зависи од врсте оболљег крвног суда. Тако је, најчешћа манифестација реналне ФМД хипертензија, док су манифестације каротидне ФМД неспецифичне (несвестица, тинитус), а често је и асимптоматска. Хистолошки се дијели на интималну, медијалну, која је и најчешћи облик, и адвенцијалну ФМД. Ангиографски је подијељена на мултифокални (одговара медијалном патолошком облику) и фокални тип (обједињује фокалну и тубуларну стенозу). Данас се дијагноза поставља углавном на основу радиолошких претрага (ултразвук, компјутеризована томографија, магнетна резонанца и субстракциона ангиографија), а знатно рјеђе на основу патохистолошке анализе. Лијек за ФМД не постоји. Терапија је симптоматска, или служи да се спријече секвеле ФМД. У терапији се користе медикаменти (антихипертензиви, тромболитици и антикоагуланси), као и методе реваскуларизације (перкутана транслуминална ангиопластика и хируршка интервенција).

Рад припада проблематици докторске дисертације: ДА НЕ ДЈЕЛИМИЧНО

Р. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница	Категорија
2.	Радић, Ж., Калинић, Д., Марић, Д. Ријетка клиничка презентација фиброму скуларне дисплазије у унутрашњој каротидној артерији. Зборник сажетака и изабраних радова у целини, Пети међународни конгрес доктора медицине Републике Српске, Теслић, 2017: 187-191	

Кратак опис садржине:

Увод: Фиброму скуларна дисплазија (ФМД) је хетерогена група неинфламаторних и неатеросклеротских болести артеријских крвих судова која води ка стенози малих и средњих артерија. Најчешће захвати реналну и каротидну артерију. ФМД обично погађа жене између 40 и 60 година живота. Узрок ФМД је непознат.

Материјал и методе: Обрађен је један пациент са неспецифичним симптомима. Након клиничког прегледа и лабораторијских налаза, учињена је дијагностичка обрада која обухвата РТГ цервикалне кичме, ТЦЦД, аудиограм, евоциране потенцијале, ЦТ главе и врата, МР ендокранијума, као и дигиталну субтракциону ангиографију (ДСА).

Резултати: Аутори приказују случај 39-огодишњег мушкира са умором, вртоглавицом и тинитусом. Симптоми се развијају уназад пет година. На ЦТ ангиографији каротидне артерије, лијева а. царотис интерна је редукованог лумена, сужена до 70%. Након тога, пациенту је рађена дигитална субтракциона ангиографија у УКЦ РС након чега су описане промјене које би ишли у прилог фиброму скуларне дисплазије.

¹ Категорија се односи на оне часописе и научне скупове који су категорисани у складу са Правилником о публиковању научних публикација („Службени гласник РС“, бр. 77/10) и Правилником о мјерилима за остваривање и финансирање Програма одржавања научних скупова („Службени гласник РС“, бр. 102/14).

Закључак: У раду је приказан пациент са вјероватном дијагнозом фиброму скуларне дисплазије, веома специфичне ангиографске презентације и локализације, као и могућности УКЦ РС на пољу дијагностике ове ријетке артериопатије.

Кључне ријечи: ФМД, каротидна артерија, ЦТ, МР, артериопатија

Рад припада проблематици докторске дисертације: ДА НЕ ДЈЕЛИМИЧНО

P. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница	Категорија
3.	Радић, Ж., Савић, П., Слијепчевић, М. Знања и ставови студената према клиничким испитивањима лијекова, Зборник радова, 10. Научно-стручна конференција "Студенти у сусрет науци" са међународним учешћем, Бањалука 2017: 314-324	

Кратак опис садржине:

Клиничка испитивања лијекова (КИ) дају највиши ниво доказа о ефикасности и сигурности нових или унапређују знања о већ доступним лијековима. Међутим, КИ се суочавају са проблемом укључивања испитаника. Разлог је неинформисаност становништва или недовољна едукација из ове области на студијама медицине.

Циљ рада је анализа знања и ставова студентске популације према КИ због будућег професионалног ангажмана студената медицине и едукације друштва. Истраживање је дизајнирано као студија пресјека, проведена у двомјесечном периоду у 2017. години, примјеном валидирања онлайн упитника. Испитивану популацију ($n=220$, 1:1 однос) су чиниле група студената медицине треће и виших година (МЕД) и студената немедицинских студија (НемЕД) на универзитетима у Бањој Луци и Фочи. Већина студената није упозната са провођењем и доступности информација о КИ у Босни и Херцеговини ($\geq 70\%$ МЕД vs $\geq 80\%$ НемЕД). МЕД група је показала позитиван став према значају КИ у едукацији здравствених професионалаца и подизању здравствене заштите ($\geq 69\%$ одговора са суб- и максималном оцјеном). Задовољавајући ниво знања (47%-84% одговора са суб- и максималном оцјеном) показала је МЕД група у познавању сврхе КИ, основних термина у етици и методологији КИ. НемЕД група је показала несигурност о доприносу КИ (56% одговора са суб- и минималном оцјеном; $p \leq 0,001$) и заштити пацијената. Незадовољство у погледу знања о КИ је у складу са малим бројем студената који би учествовали у КИ (23,6% МЕД vs 30% НемЕД). Премда су студенти медицине информисани о КИ, нижи ниво знања у одређеним сегментима указује на потребу унапређења едукације. Неопходно је подићи информисаност о КИ у друштву и тиме позитивно утицати на учешће пацијената у КИ.

Кључне ријечи: клиничка испитивања, студенти, знање, ставови

Рад припада проблематици докторске дисертације: ДА НЕ ДЈЕЛИМИЧНО

P. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница	Категорија
4.	Mirjanic-Azaric B, Jerin A, Radic Z. Thyroid stimulating hormone values of clinical decisions of hypothyroidism measurement by three different automated immunoassays. Scand J Clin Lab Invest 2020; 80: 151-5.	

Кратак опис садржине:

Тачно мјерење серумског тиреостимулирајућег хормона (TSH) кључно је за дијагнозу и лијечење поремећаја штитасте жлијезде. Поредили смо вриједности TSH које су битне за клиничку одлуку: 2,50 mIU/L, 4,00 mIU/L и 10,00 mIU/L, између три аутоматска анализатора са циљем пружања увида у варијације нивоа TSH. TSH смо мјерили са три различита потпуно аутоматизована анализатора из истих узорака: Abbott (Architect ci8200), Siemens (ADVIA Centaur XP) and Roche (Cobas e411). Серум је сакупљен од 110 пацијената између августа 2018. и јануара 2019. Резултати су упоређени Passing-Bablok методом. Додатно, израчунати су коефицијенти линеарне регресије након логаритамске трансформације података.

Иако су сва три регресијска коефицијента била висока ($r^2 > 0.98$), нагиби Passing-Bablok дијаграма за корелацију Abbotta са Rocheom или Siemensom били су само 0,66 и 0,73. Нагиб корелације Roche i Siemens био је 1,11. Резултати добијени Roche i Siemens методама били су пропорционално виши од оних добијених Abbott-овом методом (38%, односно 52%) на свим мјереним нивоима. Иако су имунотестови међусобно у корелацији, не могу се постићи исте вриједности TSH за клиничке одлуке за хипотиреозу (клинички захтјеви). Клиничари би требали бити свјесни ових ограничења. Потребна је хармонизација налаза како би се задовољили клинички захтјеви и како би се омогућиле тачне клиничке одлуке у случајевима хипотиреозе. Исто тако, предлажемо увођење граничних и високоризичних вриједности TSH за хипотиреозу, зависно о имунотестовима, како би се изbjегла погрешна дијагноза.

Рад припада проблематици докторске дисертације: ДА НЕ ДЈЕЛИМИЧНО

Да ли кандидат испуњава услове?

ДА

НЕ

III ПОДАЦИ О МЕНТОРУ/КОМЕНТОРУ

Биографија ментора (до 1000 карактера):

Проф. др Татјана Симић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, дописну члан САНУ

Датум рођења: 23.02.1964. године , Шабац.

Образовање:

Основну школу и гимназију је завршила у Београду. Дипломирала је на Медицинском факултету у Београду 1988. године са просјечном оценом 9,75 (девет седамдесет пет). Магистарску тезу под називом „Утицај бubreжне функције на активност кључних ензима метаболизма глутатиона” одбранила је 1994. год. на Медицинском факултету у Београду. Докторску дисертацију под називом „Метаболизам глутатиона у карциному бubreжног паренхима” одбранила је 1998. године на Медицинском факултету у Београду. Специјалистички испит из Клиничке биохемије је положила са одличном оцјеном 2001. године.

Радно искуство:

Од 1989. године је запослена на Институту за медицинску и клиничку биохемију Медицинског факултета Универзитета у Београду (МФУБ). У звање асиситента приправника за ужу научну област Биохемија је изабрана 1989. године, у звање доцента 1998. године, ванредног професора 2003. године, а у звање редовног професора 2009. године

Учешће у пројектима:

Од почетка своје истраживачке каријере, др Татјана Симић је учествовала на пројектима Министарства просвјете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Била је руководилац на два домаћа пројекта Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије (2006-2010: пројекат бр. 145009ДЈ и од 2011: пројекат бр. 175052, назив: „Значај полиморфизма глутатион трансфераза у подложности за настанак оболења“). Учествовала је као субконтрактор на FP7 пројекту *UROMOL* (2009-2012) и била члан Управљачког комитета међународног COST пројекта „*Cancer and control of genomic integrity - Cangenin*“ (BM0703) (2008-2012). Од 2018. до 2022. године је била ангажована на COST пројекту „*CliniMARK: 'good biomarker practice' to increase the number of clinically validated biomarkers*“ (CA16113). Од 2023. године је ангажована на COST пројекту (CA2116).

Награде и постигнућа:

У току каријере је више пута награђивана за постигнуте резултате, а најзначајније награде коју је добила су Награда Српског лекарског друштва 2016. године и награда МФУБГ 2023., за научно-истраживачки рад. Члан је Српског друштва за слободно радикалску и митохондријалну физиологију, чији је потпредсједник од оснивања (2009), члан Society for Free Radical Research (SFRR), Српског удружења за протеомику (SePa), које је део међународне организације Human proteome organization (HuPO), а чији је такође потпредсједник од оснивања, Српског друштва за истраживање рака (СДИР) и члан Српског лекарског друштва. Учесник је више Континуираних медицинских едукација

СЛД, а у октобру 2014. године организатор стручног састанка у оквиру Секције за Клиничку биохемију „Глутатион трансферазе као биомаркери оболења бубрега“.

У новембру 2017. године била је предавач на курсу „Молекуларна дијагностика у лабораторијској медицини“ у оквиру Секције за Лабораторијску медицину, Друштва лекара Војводине.

За дописног члана Српске академије наука и уметности изабрана је 8. новембра 2018. године.

Радови из области којој припада приједлог докторске дисертације:

P. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница
1.	Savic-Radojevic A, Mimic-Oka J, Pljesa-Ercegovac M, Opacic M, Dragicevic D, Kravic T, Djokic M, Micic S, <u>Simic T.</u> Glutathione S-Transferase-P1 Expression Correlates with Increased Antioxidant Capacity in Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. Eur Urol 2007; 52:470-477.
2.	Dragicevic D, Djokic M, Pekmezovic T, Micic S, Hadzi-Djokic J, Vuksanovic A, <u>Simic T.</u> Survival of patients with transitional cell carcinoma of the ureter and renal pelvis in balkan endemic and non-endemic areas of Serbia. BJU Int 2007;99:1357-1362.
3.	<u>Simic T.</u> , Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M and Mimic-Oka J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. Nat Rev Urol 2009; 6(5):281-289.
4.	Matic M, <u>Simic T.</u> , Dragicevic D, Mimic-Oka J, Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A. Isoenzyme profile of glutathione transferases in transitional cell carcinoma of upper urinary tract. Transl Res 2010; 155 (5): 256-262.
5.	Suvakov S, Damjanovic T, Stefanovic A, Pekmezovic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Djukic T, Coric V, Jakovljevic J, Ivanisevic J, Pljesa S, Jelic-Ivanovic Z, Mimic-Oka J, Dimkovic N, <u>Simic T.</u> Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. Nephrol Dial Transpl 2013; 28 (1): 202-212.
6.	Markers of Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction Predict Haemodialysis Patients Survival. Suvakov S, Jerotic D, Damjanovic T, Milic N, Pekmezovic T, Djukic T, Jelic-Ivanovic Z, Savic Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, McClements L, Dimkovic N, Garovic VD, Albright RC, <u>Simic T.</u> Am J Nephrol. 2019;50(2):115-125.
7.	Association of Nrf2, SOD2 and GPX1 Polymorphisms with Biomarkers of Oxidative Distress and Survival in End-Stage Renal Disease Patients. Jerotic D, Matic M, Suvakov S, Vucicevic K, Damjanovic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Coric V, Stefanovic A, Ivanisevic J, Jelic-Ivanovic Z, McClements L, Dimkovic N, <u>Simic T.</u> Toxins (Basel). 2019 Jul 23;11(7):431.
8.	<u>Simic T.</u> , Mimic-Oka J, Savic-Radojevic A, Opacic M, Pljesa M, Dragicevic D, Djokic M, Radosavljevic R. Glutathione S-transferase T1-1 activity upregulated in transitional cell carcinoma of urinary bladder. Urology 2005; 65:1035-1040.

9.	Reljic Z, Zlatovic M, Savic-Radojevic A, Pekmezovic T, Djukanovic L, Matic M, Pljesa-Ercegovac M, Mimic-Oka J, Opsenica D, <u>Simic T</u> . Is Increased Susceptibility to Balkan Endemic Nephropathy in Carriers of Common GSTA1 (*A/*B) Polymorphism Linked with the Catalytic Role of GSTA1 in Ochratoxin A Biotransformation? Serbian Case Control Study and In Silico Analysis. Toxins 2014; 6(8):2348-62
10.	Pavlović D, Savić-Radojević A, Plješa-Ercegovac M, Radić T, Ristić S, Čorić V, Matić M, <u>Simić T</u> , Djukanović L. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant enzyme activities in pre-dialysis Balkan endemic nephropathy patients. Int Urol Nephrol 2016; 48:257-63
11.	Matic M, Dragicevic B, Pekmezovic T, Suvakov S, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Dragicevic D, Smiljic J, <u>Simic T</u> . Common Polymorphisms in <i>GSTA1</i> , <i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i> Are Associated with Susceptibility to Urinary Bladder Cancer in Individuals from Balkan Endemic Nephropathy Areas of Serbia. Tohoku J Exp Med 2016; 240:25-30.
12.	Predrag N, Dejan D, Marija PE, Vesna C, Djurdja J, Uros B, Tatjana P, <u>Tatjana S</u> , Zoran D, Marija M. Association between GPX1 and SOD2 genetic polymorphisms and overall survival in patients with metastatic urothelial bladder cancer: a single-center study in Serbia. J BUON 2018; 23(4):1130-1135

Да ли ментор испуњава услове?

ДА

НЕ

Биографија коментора (до 1000 карактера):

Проф. др Боса Мирјанић-АЗарић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци
Датум рођења: 23.04. 1963. године

Образовање:

2016.

Субспецијалиста лабораторијске ендокринологије , Универзитет у Београду,

Фармацеутски факултет

2014.

Fakulteta za farmaciju, Univerza v Ljubljani , Dr, наслов тезе "Study of expression of genes responsible for pleiotropic effects of atorvastatin using analysis of mRNA in plasma of patients with stable angina pectoris." научно подручје Клиничка биохемија и лабораторијска медицина,

2005.

Мр сци., наслов рада »Липидски статус радно способних особа општине Грађашка у

корелацији са животним навикама», Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет 1999.

Специјалиста медицинске биохемије, Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет 1989.

Дипломирани инжењер медицинске биохемије (магистра медицинске биокемије, Mag. med. biochem.), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Радно искуство:

24. 03.2022. до данас

на радном мјесту ванредног професора на Медицинском факултету у Бањој Луци, ужа научна област медицинска биохемија;

2017.-2022.

доцент на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област: медицинска биохемија;

2009. –2022.

на радном мјесту специјалисте медицинске биохемије (од 2016. и субспецијалисте лабораторијске медицине) у лабораторију Завода за клиничку лабораторијску дијагностику, Универзитетски клинички центар Републике Српске, Бања Лука (од 2020. допунски рад);

2006.- 2009.

на радном мјесту специјалисте медицинске биохемије у лабораторију Завода за нуклеарну медицину и болезни штитне жлијезде, Универзитетски клинички центар Републике Српске, Бања Лука;

2002. – 2006.

Шеф медицинско-биохемијске лабораторије, Дом здравља Бања Лука;

1989. – 2002.

на радном мјесту медицинског биохемичара, а потом специјалисте медицинске биохемије у лабораторију Дом здравља Градишака, девет година начелник лабораторије за медицинску биохемију.

Радови из области којој припада приједлог докторске дисертације:

P. бр.	Аутори, наслов, издавач, број страница
1.	Mirjanic-Azaric B , Rizzo M, Sormaz L, Stojanovic D, Uletilovic S, Sodin-Semrl S, et al. Atorvastatin in stable angina patients lowers CCL2 and ICAM1 expression: pleiotropic evidence from plasma mRNA analyses. Clin Biochem 2013; 46:1526-31.
2.	Mirjanic-Azaric B , Vekic J, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Djeric M, Milivojac T, et al. Interrelated cathepsin S-lowering and LDL subclass profile improvements induced by atorvastatin in the plasma of stable angina patients. J Atheroscler Thromb 2014; 21:868-77.
3.	Mirjanic-Azaric B , Jelic-Ivanovic Z, Zeljkovic A, Vekic J, Jürgens G, Milivojac T, et al. The pleiotropic effects of atorvastatin on stable angina patients: evidence by analysis of high-density lipoprotein size and subclasses, and plasma mRNA. J Med Biochem 2015; 34:314-22.
4.	Mirjanic-Azaric B , Manfredi R, Jürgens G, Hallstroem S, Srdic S, Marc J, et al. Atorvastatin treatment increases plasma bilirubin but not HMOX1 expression in stable angina patients. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation 2015; 75: 382-9.
5.	Mirjanic-Azaric B , Vasic N, Cerne D, Kos J, Bogavac-Stanojevic N. Plasma cathepsin S is associated with high-density lipoprotein cholesterol and bilirubin in patients with abdominal aortic aneurisms. J Med Biochem 2019; 38: 268-75.

Да ли коментор испуњава услове?

ДА

НЕ

IV ОЦЈЕНА ПОДОБНОСТИ ТЕМЕ

IV.1 Формулација назива тезе (наслова)

ИСПИТИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ПОЛИМОРФИЗАМА ГЕНА ЗА РЕГУЛАТОРНЕ
И КАТАЛИТИЧКЕ АНТИОКСИДАНТНЕ ПРОТЕИНЕ СА РИЗИКОМ ЗА
НАСТАНАК БАЛКАНСКЕ ЕНДЕМСКЕ НЕФРОПАТИЈЕ

Наслов тезе је подобан?

ДА

НЕ

IV.2 Предмет истраживања

У свјетлу чињенице да је Република Српска ендемско подручје за Балканску ендемску нефропатију (БЕН), као и да да оксидативни стрес има важну улогу у настанку и прогресији бројних хроничних болести, предмет истраживања ове докторске дисертације биће умјерен на испитивање повезаност полиморфизма гена за регулаторне и катализичке антиоксидантне протеине са ризиком за појаву БЕН, и тумора уротелијума на терену БЕН. Подаци у литератури о њиховој потенцијалној улози у развоју БЕН су релативно оскудни. На основу експерименталних података о улози оксидативног стреса у метаболизму аристолохијске киселине, као потенцијалног узрочника БЕН, и улози полиморфизма гена

за регулаторне и катализичке антиоксидантне протеине са ризиком за развој терминалне бубрежне слабости и тумора горњег уротелијума може се претпоставити да су ови генетски полиморфизми такође значајни у патогенези БЕН. Да би се процијенила њихова улога од великог је научног значаја спровести свеобухватну генетску студију која би упоредо анализирала дистрибуцију ових полиморфизама код пацијената са ендемског подручја, и здравих особа из ендемских региона Републике Српске, који ће чинити контролну групу. Водећи се чињеницом да Keap1/Nrf2 сигнални пут игра централну улогу у цитопротективним одговорима ћелије на оксидативни стрес, поред полиморфизма за Nrf2, важно је испитати и повезаност полиморфизама гена како за Keap1 код пацијената са БЕН. Како се, међу великим бројем протеина чија је експресија регулисана Nrf2 налазе се и глутатион трансферазе (енгл. *glutathione S transferases*, GST) важно је испитати повезаност полиморфне експресије GSTP1 код БЕН пацијената. Иако је, у неколико истраживања, испитивана улога генетских полиморфизама за глутатион трансферазе, у литератури подаци о дистрибуцији и уз洛зи хаплотип анализе полиморфизама A, B, C и D за ген за GSTP1 не постоје. Такође, међу бројним антиоксидантним ензимима, од великог значаја је и глутатион пероксидаза 3 (GPX3). Ово ће бити прва студија која ће одредити дистрибуцију, као и ефекте GPX3 полиморфизама код пацијената са дијагнозом БЕН и тумора горњег уротелијума. У литератури нема студија које су се бавиле поменутим полиморфизмима, стога ће ово ће бити прва студија која ће испитивати повезаност полиморфизама Nrf2 rs6721961, Keap1 (rs1048290), GSTP1AB (rs1695), GSTPA1CD (rs1138272) и GPX3 (rs8177412) гена код пацијената са БЕН.

Предмет истраживања је подобан?

ДА

НЕ

IV.3 Најновија истраживања познавања предмета дисертације на основу изабране литературе са списком литературе

Балканска ендемска нефропатија (БЕН) је породично, споро прогресивно, хронично тубулоинтерстицијско оболење бубрега непознате етиологије које неминовно води ка терминалној бубрежној слабости (ТБС). Висока инциденија БЕН забиљежена је у сеоским подручјима Босне и Херцеговине, Србије, Румуније, Бугарске и Хрватске, која се простиру дуж ријеке Дунав [1-3]. Клинички симптоми, као и генетски и биохемијски маркери БЕН, су неспецифични тако да болест дugo остаје непрепозната [2]. Једна од најзначајнијих карактеристика БЕН је њена повезаност са појавом тумора уротелијума, нарочито тумора горњег уротелијума [3,4]. Наиме, ранији подаци наводе да пацијенти оболјели од БЕН имају, чак и до 100 пута, већу преваленцију малигнома горњег уротелијума [5], иако је забиљежено да се та разлика последњих деценија смањује. Упркос чињеници да су јој посвећена бројна истраживања, етиологија БЕН и даље је контроверзна [1,6]. Претходних деценија разматрано је неколико хипотеза о узроку БЕН, укључујући микотоксине и аристолохијску киселину (AA), као два најзначајнија [1,7].

Највећа пажња се поклања управо АА, која је и усвојена као главни узрочник БЕН [6,8]. Сумња се да сјеменке биљке *Aristolochia clematitis* контаминирају брашно и земљиште [9], те истраживачи претпостављају да би пациенти са БЕН могли бити изложени АА конзумирањем хране припремљене од брашна контаминираног сјеменкама биљака из породице *Aristolochia*, које расту као коров у ендемским регионима [9,10]. Истраживања су показала да неки усјеви могу да апсорбују и биоакумулирају АА из земље и воде. Стoga, продужени унос хране припремљене од ових усјева такође може довести до БЕН [11].

У експерименталним студијама је показано да током ћелијског метаболизма АА долази до сложене метаболичке активације која за посљедицу има стварање кисеоничних слободних радикала (КСР) и настанак оксидативног стреса [12,13]. Поред појачане продукције слободних радикала, у условима *in vitro* је показано да АА доводи и до смањења антиоксидативног капацитета ћелија [13]. Штавише, оксидативни стрес и оштећења епителних ћелија проксималних тубула били су евидентни код пацова третираних АА. Могуће да је управо ова тубулотоксичност повезана са смањеном антиоксидантном активношћу [13,14]. Поред тога, оксидативни стрес изазван АА може имати значајну улогу у оштећењу бubreжног паренхима у БЕН. Последњих година приложени су докази о повезаности експозиције АА и појаве БЕН. Наиме, адукти ДНК са АА и карактеристичне А→Т трансверзије откривени су у узорцима малигно измијењеног ткива бubreга које је добијено од пацијената са БЕН [14,15].

Иако резултати експерименталних истраживања иду у прилог важне улоге оксидативног стреса у патогенези БЕН, овај значајан патофизиолошки механизам није довољно испитан код ових пацијената, за разлику од хроничне бubreжне слабости (ХБС) и ТБС [16-18]. Због тога је веома важно испитати активност ендогених механизама антиоксидантне заштите који су код БЕН пацијената и даље оскудни. Прву линију антиоксидантне заштите одбране чине антиоксидантни ензими чију базалну активност и координисану експресију регулише Nrf2 (енгл. *Nuclear factor erythroid 2-related factor*), транскрипциони фактор [19,20]. Код свих ових протеина описан је генетски полиморфизам који за посљедицу има смањену или измијењену активност, а самим тим и могућност неутрализације КСР [21].

Nrf2/Keap1 (енгл. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/Kelch-like ECH-associated protein 1*) сигнални пут један је од најважнијих система редокс хомеостазе у ћелији, док Nrf2 представља један од најважнијих регулаторних антиоксидантних протеина [20,21]. Nrf2 је нестабилан протеин који је негативно регулисан протеином Keap1 [22]. Keap1 припада BTB-Kelch (енгл. *BTB- Kelch-like ECH-associated protein*) породици протеина усмјерава Nrf2 у функционални комплекс убиквитин лигазе, чиме регулише критичну хомеостазу Nrf2 и његову активност [22]. Наиме, Keap1 омогућава интеракцију између Nrf2 и комплекса Cul3 убиквитин-лигазе [21,22]. У стањима редокс равнотеже, Nrf2 углавном остаје у цитоплазми као комплекс са регулаторном Keap1 подјединицом. Међутим, у вишку КСР и електрофилних једињења долази до одвајања Keap1 чиме Nrf2 изbjегава убиквитинацију, миграира у једро где се везује за ARE (енгл. *antioxidant response elements*) на молекулу ДНК. На тај начин Nrf2 утиче на транскрипцију гена за велики број антиоксидантних ензима, између осталих глутатион трансферазе, глутатион редуктазе и глутатион пероксидазе чиме се омогућава поновно успостављање редокс хомеостазе [21-23]. Полиморфизам *Nrf2 rs6721961 (-617C/A)*, по типу SNP (енгл. *single nucleotide polymorphism*) налази се у ARE промоторском региону *Nrf2* гена и карактерише га замјена C>A. С обзиром на његову позицију овај SNP утиче на базалну експресију Nrf2. Укратко, смањена базална експресија Nrf2, заједно са измијењеном способношћу Nrf2 да се ефикасно везују за ARE, резултује смањеном транскрипцијом гена за антиоксидантне ензиме [20-24]. Nrf2 би могао да има значајну улогу у развоју нефропатије узроковане АА

[25], а самим тим и БЕН. Наиме, у *in vitro* студијама показано је да повишени нивои АА инхибирају активност Nrf2. Управо снижена експресија Nrf2, као и повећана продукција КСР, погодују настанку оксидативног стреса [25,26]. Поред тога, у неколико студија показана је веза између полиморфне експресије Nrf2 у ХБС, као и код пацијената са ТБС[16-18]. Узевши у обзир да су то главне и неминовне компликације БЕН, свакако би било веома важно испитати да ли постоји веза између полиморфизма гена за Nrf2 и ризика за развој БЕН.

Keap 1 rs1048290 полиморфизам се налази у геномском региону (егзон 4) и кодира DGR домен (енгл. *double-glycine repeat*) гена за Keap1 [27]. Како је овај домен је у директној интеракцији са Nrf2, он утиче на везивање Nrf2-Keap1 и посљедично на нивое Nrf2 протеина [27,28]. У литератури у само неколико студија испитиван је овај полиморфизам и доводи се у везу са карциномом дојке, хроничним респираторним болестима и епилепсијом [27-29].

GST (енгл. *glutathione S transferases*, GST) суперфамилија ензима, чија је експресија регулисана Nrf2, учествују у реакцијама детоксикације великог броја ксенобиотика [30]. Резултати најновијих истраживања сугеришу да су GST, такође, важне у детоксикацији АА [31,32]. Наиме, метаболит аристолахтам-нитернијум јон, производ прве фазе метаболизма АА, може да се коњугује са глутатионом [32], у чему учествују ензими друге фазе метаболизма ксенобиотика, међу којима је и GST. Поред тога, показано је да се и AA-I, најтоксичнија компонента АА, такође може везати за глутатион у реакцијама које катализују GST [31]. Ови ензими су подијељени у 3 фамилије: цитосолну, митохондријалну и микрозомалну. Цитосолна фамилија је подијељена на седам класа, алфа (GSTA), ми (GSTM), пи (GSTP), омега (GSTO), тета (GSTT), сигма (GSTS) и зета (GSTZ). Унутар различитих цитосолних класа GST утврђена је значајна генетска хетерогеност која се доводи у везу са бројним болестима [33,34]. Посебну пажњу истраживача привлачи *GSTP1* ген у оквиру којег су откривена два SNP, која доводе до измијењене GSTP ензимске активности [34]. Наиме, SNP откривени у оквиру *GSTP1* гена резултују замјеном аминокиселина на позицији 105 (*Ile105Val*) и 114 (*Ala114Val*), стога се *GSTP1* локус састоји од четири различита алела, *GSTP1*A* (*105Ile/114Ala*), *GSTP1*B* (*105Val/114Ala*), *GSTP1*C* (*105Val/114Val*) и *GSTP1*D* (*105Ile/114Val*) који до сада нису испитивани код пацијената са БЕН. У неколико студија испитиван је значај генетских полиморфизама GST у процјени ризика за настанак Балканске ендемске нефропатије [35-37]. У једној од њих је пронађено да је код пацијената са БЕН чешћи активни *GSTM1* генотип, у односу на контролну групу [35]. У, до сада, једином спроведеном истраживању које је обухватало пацијенте из Републике Српске и Србије установљено је да полиморфизам гена за *GSTA1-1* повећава ризик за настанак БЕН, те да особе са присуством варијантног *GSTA1*B* алела имају повећан ризик за настанак БЕН у односу на особе које имају *GSTA1*A/A* генотип [36].

Поред улоге GST у реакцијама биотрансформације штетних електрофилних једињења, постоје и подаци који указују на учешће GST у ћелијском преживљавању, пролиферацији и апоптози посредством протеин-протеинских интеракција са сигналним молекулима [38,39]. Наиме, повећана експресија *GSTP1* протеина пронађена је код великог броја тумора, укључујући и карцином горњег уротелијума, за који је познато да се јавља у популацији са БЕН [4,40]. *GSTP1* је био први протеин за који је откривено да инхибише JNK (енгл.*c-Jun N-terminal kinase*) кроз директну протеин-протеинску интеракцију [40,41]. JNK је *MAP* киназа (енгл. *Mitogen-activated protein kinases*) укључена у бројне ћелијске процесе као што су одговор на ћелијски стрес, апоптозу, инфламацију, ћелијску диференцијацију и пролиферацију [41]. Сматра се да је и нефропатија узрокована АА повезана са *MAP* киназним сигналним путевима, што би могло да се повеже са

патофизиолошким механизмима БЕН и удржених тумора уротелијума [42]. Поред тога, AA може да активира и JNK сигнални пут доводећи до прекомјерне експресије TGF-1, који је значајан у патогенези нефропатије узроковане AA [41,42]. Како GSTP1 утиче на инхибицију апоптотске молекуле JNK, може се претпоставити да полиморфна експресија *GSTP1* утиче на процес апоптозе.

Међу бројним антиоксидантним ензимима, један од најважнијих је глутатион пероксидаза (GPX). Породица GPX протеина се састоји од 8 изоензима, а GPX3 је главна ванћелијска изоформа, док је бубрег је доминантно ткиво које доприноси активности GPX3 у плазми [43]. У бубрезима, GPX3 се првенствено експримира у паријеталним ћелијама Боуманових капсула и у ћелијама базолатералне мемране проксималних тубула. У плазми GPX3 обезбеђује заштиту епителним ћелијама од оксидативног оштећења. *GPX3 T-65C (rs8177412)* SNP, може утицати на активност и на експресију овог изоензима [44]. Како је бубрег примарно ткиво у којем се експримира GPX3 од великог је значаја испитати утиче ли полиморфна експресија на ризик за развој БЕН, као и удржених тумора уротелијума. Прегледом литературе, у двије студије до сада спроведене, анализиран је GPX1 изоензим и потврђена је снижена активност еритроцитне глутатион пероксидазе, GPX1, код БЕН пацијената [45,46]. У само једном истраживању испитивана је повезаност полиморфизма гена за антиоксидантне протеине, укључујући и *GPX1*, те није показан утицај *GPX1* полиморфизма на повећан ризик за развој БЕН [46]. Поред тога, у литератури нема података о утицају полиморфизма *GPX3 rs8177412* на ризик за појаву БЕН, тако да ће ово бити прво истраживање које ће се бавити потенцијалном узрочном везом између полиморфне експресије *GPX3* гена и ендемске нефропатије, као и тумора горњег уротелијума.

1. Pavlović NM. Balkan endemic nephropathy—Current status and future perspectives. Clinical kidney journal. 2013;6(3):257-65.
2. Stiborová M, Arlt VM, Schmeiser HH. Balkan endemic nephropathy: an update on its aetiology. Archives of toxicology. 2016;90(11):2595-615.
3. Đukanović L. Endemic nephropathy: A disease that requires further research. Medicinski podmladak. 2016;67(3):1-8.
4. Stefanovic V, Radovanovic Z. Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. Nature Reviews Urology. 2008;5(2):105.
5. Markovic N, Ignjatovic I, Cukuranovic R, Petrovic B, Kocic B, Stefanovic V. Decreasing incidence of urothelial cancer in a Balkan endemic nephropathy region in Serbia. A surgery based study from 1969 to 1998. Pathol Biol (Paris). 2005; 53:26-29
6. Jelaković B, Nikolić J, Radovanović Z, Nortier J, Cosyns JP, Grollman AP, et al. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. Nephrology dialysis transplantation. 2013;29(11):2020-7.
7. Arlt VM, Stiborová M, vom Brocke J, Simoes ML, Lord GM, Nortier JL, et al. Aristolochic acid mutagenesis: molecular clues to the aetiology of Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer. Carcinogenesis. 2007;28(11):2253-2261.
8. Grollman AP, Shibusawa S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U, et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104(29):12129-34.
9. Li W, Chan CK, Liu Y, Yao J, Mitic B, Kostic EN, et al. Aristolochic acids as persistent soil pollutants: Determination of risk for human exposure and nephropathy from plant uptake. J. Agric. Food Chem. 2018;66(43):11468-11476.
10. Chan W, Pavlovic N M, Li W, Chan CK, Liu J, Deng K, et al. Quantitation of aristolochic acids in corn, wheat grain, and soil samples collected in serbia: identifying a novel exposure pathway in the etiology of Balkan endemic nephropathy. J. Agric. Food Chem. 2016;64(29):5928–5934.
11. Jelakovic B, Vukovic Lela I, Karanovic S, Dika Z, Kos J, Dickman K, et al. Chronic dietary exposure

- to aristolochic acid and kidney function in native farmers from a Croatian endemic area and Bosnian immigrants. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2015;10(2):215–223.
12. Anger EE, Yu F, Li J. Aristolochic acid-induced nephrotoxicity: molecular mechanisms and potential protective approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(3): 1157.
 13. Bunel V, Antoine MH, Stevigny C, Nortier J, Duez P. New in vitro insights on a cell death pathway induced by magnolol and honokiol in aristolochic acid tubulotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2016;87:77-87 16
 14. Stiborová M, Arlt VM, Schmeiser HH. DNA adducts formed by aristolochic acid are unique biomarkers of exposure and explain the initiation phase of upper urothelial cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18:214.
 15. Chen YY, Chung JG, Wu HC, Bau DT, Wu KY, Kao ST, et al. Aristolochic acid suppresses DNA repair and triggers oxidative DNA damage in human kidney proximal tubular cells. *Oncol Rep.* 2010;24(1):141-53.
 16. Jerotic D, Matic M, Suvakov S, Vučicević K, Damjanović T, Savic-Radojević A, et al. Association of *Nrf2*, *SOD2* and *GPX1* Polymorphisms with Biomarkers of Oxidative Distress and Survival in End-Stage Renal Disease Patients. *Toxins (Basel)*. 2019;11(7):431.
 17. Günal SY, Ustündağ B, Günal AI. The assessment of oxidative stress on patients with chronic renal failure at different stages and on dialysis patients receiving different hypertensive treatment. *Indian J Clin Biochem*. 2013;28(4):390–395
 18. Suvakov S, Damjanovic T, Stefanovic A, Pekmezovic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, et al. Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012;28(1):202-12
 19. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020;21:363–383. Ref 22
 20. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:401-426.
 21. Cho HY, Marzec J, Kleeberger SR. Functional polymorphisms in Nrf2: implications for human disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2015;88:362–372.
 22. Sykötis GP. Keap1/Nrf2 Signaling Pathway. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(6):828
 23. Ngo V, Karunatileke NC, Brickenden A, Choy WY, Duennwald ML. Oxidative Stress-Induced Misfolding and Inclusion Formation of Nrf2 and Keap1. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(2):243.
 24. Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lanken PN, et al. Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *Faseb J*. 2007;21(9):2237–46. Ref 27
 25. Huang, X., Wu, J., Liu, X., Wu, H., Fan, J., & Yang, X. The protective role of Nrf2 against aristolochic acid-induced renal tubular epithelial cell injury. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2020; 30(8), 580-589.
 26. Liu M, Grigoryev DN, Crow MT, Haas M, Yamamoto M, Reddy SP, Rabb H. Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice. *Kidney Int.* 2009;76(3):277-85
 27. Dhamodharan U, Ponjayanthi B, Sireesh D, Bhakkiyalakshmi E, Ramkumar KM. Association of single-nucleotide polymorphisms of the KEAP1 gene with the risk of various human diseases and its functional impact using in silico analysis. *Pharmacol Res.* 2018;137:205-218.
 28. Almeida M, Soares M, Ramalhinho AC, Moutinho JF, Breitenfeld L. Prognosis of hormone-dependent breast cancer seems to be influenced by KEAP1, NRF2 and GSTM1 genetic polymorphisms. *Mol Biol Rep.* 2019;46(3):3213-3224.
 29. Korytina GF, Akhmadishina LZ, Aznabaeva YG, Kochetova OV, Zagidullin NS, Kzhyskowska JG, Zagidullin SZ, Viktorova TV. Associations of the NRF2/KEAP1 pathway and antioxidant defense gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Gene*. 2019;692:102-112.
 40. Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, Federici L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*. 2018;7(1):8.
 41. Gao C, Zhang Q, Ma L, Xu G, Song P, Xia L. Metabolic pathway and biological significance of glutathione detoxification of aristolochic acid I. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2021;7,100054. 34 ref
 42. Zhang J, Chan CK, Ham YH, Chan W. Identifying cysteine, N-acetylcysteine, and glutathione

- conjugates as novel metabolites of aristolochic acid I: emergence of a new detoxification pathway. *Chemical Research in Toxicology*. 2020; 33(6):1374-1381.
43. Simic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Mimic-Oka J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nature reviews urology*. 2009;6(5):281.
 44. Bocedi A, Noce A, Marrone G, Noce G, Cattani G, Gambardella G, et al. Glutathione transferase P1-1 an enzyme useful in biomedicine and as biomarker in clinical practice and in environmental pollution. *Nutrients*. 2019;11:1741.
 35. Andonova IE, Sarueva RB, Horvath AD, Simeonov VA, Dimitrov PS, Petropoulos EA, et al. Balkan endemic nephropathy and genetic variants of glutathione S-transferases. *Journal of nephrology*. 2004;17:390-8.
 36. Reljic Z, Zlatovic M, Savic-Radojevic A, Pekmezovic T, Djukanovic L, Matic M, Pljesa-Ercegovac M, et al. Is increased susceptibility to Balkan endemic nephropathy in carriers of common GSTA1 (* A/* B) polymorphism linked with the catalytic role of GSTA1 in ochratoxin a biotransformation? Serbian case control study and in silico analysis. *Toxins*. 2014;6(8):2348-62.
 37. Matic M, Dragicevic B, Pekmezovic T, Suvakov S, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, et al. Common Polymorphisms in GSTA1, GSTM1 and GSTT1 Are Associated with Susceptibility to Urinary Bladder Cancer in Individuals from Balkan Endemic Nephropathy Areas of Serbia. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2016;240(1):25-30.
 38. Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2013 May 1;1830(5):3267-88...41 ref
 39. Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell death and differentiation*. 2010 Sep;17(9):1373.
 40. Savic-Radojevic A, Mimic-Oka J, Pljesa-Ercegovac M, Opacic M, Dragicevic D, Kravic T, Djokic M, Micic S, Simic T. Glutathione S-transferase-P1 expression correlates with increased antioxidant capacity in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *European urology*. 2007 Aug 1;52(2):470-7
 41. Rui, H. L., Wang, Y. Y., Cheng, H., and Chen, Y. P. JNK-dependent AP-1 activation is required for aristolochic acid-induced TGF-beta1 synthesis in human renal proximal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2012;302 (12)
 42. Romanov V, Whyard TC, Waltzer WC, Grollman AP, Rosenquist T. Aristolochic acid-induced apoptosis and G2 cell cycle arrest depends on ROS generation and MAP kinases activation. *Arch Toxicol*. 2015;89(1):47-56
 43. Chang C, Worley BL, Phaeton R, Hempel N. Extracellular Glutathione Peroxidase GPx3 and Its Role in Cancer. *Cancers*. 2020;12:2197.
 44. Grubor-Lajsic G, Djordjević VB, Jovanović-Galović A, Lecić N, Djordjević V, Spasić M. Selenium-dependent and selenium-non-dependent glutathione peroxidase in patients with Balkan endemic nephropathy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1998;17(3-4):321-324
 45. Pavlović D, Savić-Radojević A, Plješa-Ercegovac M, Radić T, Ristić S, Čorić V, et al. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant enzyme activities in pre-dialysis Balkan endemic nephropathy patients. *Int Urol Nephrol*. 2016;48(2):257-63.
 46. Dragicevic B, Suvakov S, Jerotic D, Reljic Z, Djukanovic L, Zelen I, et al. Association of SOD2 (rs4880) and GPX1 (rs1050450) Gene Polymorphisms with Risk of Balkan Endemic Nephropathy and its Related Tumors. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(8):435.

Избор литературе је одговарајући?

ДА

НЕ

IV.4 Циљеви истраживања

1. Одредити дистрибуцију полиморфизама гена за *Nrf2* (*rs6721961*), *Keap1* (*rs1048290*), *GSTPIAB* (*rs1695*), *GSTPAICD* (*rs1138272*) и *GPX3* (*rs8177412*) гена код болесника са БЕН и припадника контролне групе, као и БЕН пацијената који су развили тумор горњег уротелијума
2. Испитати повезаност појединачних полиморфизама *Nrf2*, *Keap1*, *GSTPIAB*, *GSTPICD* и *GPX3* са ризиком за настанак БЕН и тумора горњег уротелијума
3. Испитати повезаност GSTP1 ABCD хаплотипова са ризиком за настанак БЕН
4. Испитати да ли постоји кумулативни ефекат испитиваних генотипова на ризик за настанак БЕН

Циљеви истраживања су одговарајући?

ДА

НЕ

IV.5 Хипотезе истраживања: главна и помоћне хипотезе

Полиморфни облици гена *Nrf2*, *GSTP1*, *Keap1* и *GPX3* са измијењеном или смањеном активности су повезани са ризиком за појаву БЕН и тумора горњег уротелијума

Постоји кумулативни ефекат полиморфизама за *Nrf2*, *GSTPIAB*, *GSTPICD*, *Keap1* и *GPX3* на ризик за развој БЕН

Хипотезе истраживања су јасно дефинисане?

ДА

НЕ

IV.6 Очекивани резултати хипотезе

Варијантни генотипови у оквиру полиморфизама за *Nrf2*, *GSTP1*, *Keap1* и *GPX3*, удруженi са измијењеном или смањеном активности регулаторних и антиоксидантних протеина, индивидуално или кумулативно модификују ризик за настанак БЕН. Поред тога, полиморфни облици гена *Nrf2*, *GSTP1*, *Keap1* и *GPX3* значајно повећавају ризик за настанак тумора горњег уротелијума код пациентата са већ насталим БЕН. Одређивање наведених полиморфизама омогућава рану идентификацију особа са повећаним ризиком за настанак БЕН као и тумора горњег уротелијума на терену БЕН.

Очекивани резултати представљају значајан научни допринос? ДА НЕ

IV.7 План рада и временска динамика

Прва фаза истраживања обухвата селекцију испитаника, прикупљање и обраду података и узорака пуне крви, те транспорт узорака.

1.1. Селекција испитаника

Након добијања Етичке дозволе ЈЗУ "Цвети Врачеви" Болнице Бијељина приступиће се селекцији испитаника контролне групе, те ће се након добровољног попуњавања информисаног пристанка за сваког учесника студије приступити прикупљању крви за анализу, као што је описано у поглављу Материјал и методе. Већ изоловани узорци ДНК који су сакупљани у оквиру ранијих истраживања о БЕН ће чинити групе оболелих.

1.2. Узорковање материјала

Као што је раније поменуто, узимаће се око 2 mL крви.

1.3. Чување и транспорт

Након тога, узорак ће бити замрзнут, а епрувете са крви ће бити транспортоване на одговарајућем медијуму из Бијељине у Центар за биомедицинска истраживања Медицинског факултета у Бања Луку, где ће се вршити даља обрада која укључује експериментални дио. Након добијања Етичке дозволе Медицинског факултета Универзитета у Београду, ДНК узорци који су дио биобанке испитаника са дијагнозом БЕН формиране на Институту за медицинску и клиничку биохемију ће бити транспортовани на адекватном медијуму (суви лед) из Београда у Бањалуку где ће се вршити њихова даља обрада.

Друга фаза истраживања ће обухватати експериментални дио, анализу и статистичку обраду података и објављивање добијених резултата.

2.1. Изолација ДНК

Први дио друге фазе истраживања укључује изолацију ДНК из узорака пуне крви.

2.2. Одређивање полиморфизама гена

Након тога, истраживање ће обухватати одређивање полиморфизама *Nrf2* rs6721961, *Keap1* (rs1048290), *GSTP1AB* (rs1695), *GSTPA1CD* (rs1138272) и *GPX3* (rs8177412) гена.

2.3. Статистичка анализа добијених података

План рада и временска динамика су одговарајући?

ДА НЕ

IV.8 Метод и узорак истраживања

Дизајн студије:

Студија случајева и контрола

Селекција испитаника:

За одређивање полиморфизама *Nrf2* (*rs6721961*), *Keap1* (*rs1048290*), *GSTPIAB* (*rs1695*), *GSTPA1CD* (*rs1138272*) и *GPX3* (*rs8177412*) гена у студију ће бити укључено око 400 испитаника који ће бити подијељени у двије групе, групу обольелих и контролну групу.

Групу обольелих, око 200 пацијената, са подручја Бијељине и Шамца, ће чинити испитаници чији су ДНК узорци дио биобанке испитаника са дијагнозом БЕН формиране на Институту за медицинску и клиничку биохемију Медицинског факултета Универзитета у Београду, прикупљени у периоду од јануара до децембра 2012. године, у оквиру ранијих истраживања (број етичке дозволе 29/VI-13).

Критеријуми за укључивање у испитивање били су:

- пунолjetни становници ендемских подручја Републике Српске (Бијељина и Шамац) код којих је епидемиолошки, клинички и ехосонографски потврђена дијагноза БЕН
- потписан информисани пристанак

Контролну групу ће чинити исти број (око 200) становника ендемских подручја без дијагнозе БЕН. Мечовани по узрасту и полу испитаници контролне групе ће бити укључени у студију у току систематских прегледа одраслих становника ендемских региона.

Критеријуми за укључивање испитаника у контролну групу ће бити:

- пунолjetни становници ендемских подручја,
- лабораторијски, клинички и ехосонографски потврђено одсуство БЕН
- клинички и лабораторијски потврђено одсуство других бубрежних болести (вриједности уре и креатинина у крви у референтним границама)
- потврђено одсуство дијабетеса и малигних болести
- потписан информисани пристанак

Услов за искључивање из студије биће став испитаника да не жeli да учествујe у њему, као и доказ о постојању малигног оболења и дијабетеса у историји болести.

Epidemioloшка анкета

За прикупљање демографских података испитаника контролне групе биће кориштен структурисани епидемиолошки упитник. Упитник ће садржати питања о старости, полу, мјесту рођења и становања, антропометријским параметрима, занимању, пушењу, те дужини пушачког стажа.

За прикупљање демографских података, али и података о изложености претпостављеним факторима ризика средине за настанак БЕН, испитаника који чине групу обольелих такође је кориштен епидемиолошки упитник истог типа.

Сви испитаници који испуњавају критерије за укључивање у испитивање биће информисани о сврси испитивања, кориштењу података из медицинске документације, клиничком прегледу и узорковању крви за планирано истраживање, након чега ће бити замољени да потпишу информисани пристанак.

Материјал:

Крв

За анализу полиморфизама од свих испитаника ће бити узето по 2 mL пуне крви у вакутајнере, са ЕДТА као антикоагулансом. По узимању узорци крви ће се замрзвати и чувати на -20⁰ С до изолације ДНК.

Изолација ДНК

Изолација ДНК ће се вршити из 200µL венепунктиране крви кориштењем комерцијалног кита PureLink™ Genomic DNA Mini Kit-a (Invitrogen), према упутству произвођача. У првом кораку мембране лимфоцита се лизирају. Затим се протеини везани за ДНК уклањају протеиназом К, а остаци РНК уз помоћ РНАзе А. Након тога, добијени лизат се преноси у мини спин колоне са силиконском мемраном која селективно везује ДНК. Остатак лизата испира се серијом пуфера који у свом саставу имају соли и етанол што омогућава да се протеини и други контаминаенти, који би могли да инхибирају рекацију ланчаног умножавања, одстране. Као крајњи корак, ДНК је испирана са мини спин колоне, аликовотирана и чувана на -20°C до извођења PCR.

Изолација ДНК испитаника контролне групе биће вршена у Центру за биомедицинска истраживања Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци.

Изолација ДНК групе оболелих је вршена, према истом протоколу, на Институту за медицинску и клиничку биохемију Медицинског факултета Универзитета у Београду.

Одређивање полиморфизама

Одређивање полиморфизама гена за *Nrf2*, *Keap 1*, *GSTPIAB*, *GSTPICD* и *GPX3* за све испитанке укључене у истраживање (и групу оболелих и контролну групу) биће вршено у Центру за биомедицинска истраживања Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци.

Одређивање полиморфизма гена за *Nrf2*

Инверзиони полиморлизам *Nrf2 rs6721961* гена ће бити одређен PCR-CTTP методом (енгл. *Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers*) према модификованој методи аутора *Shimoyama Y.* и сар. апарату Applied Biosystem ProFlex PCR System.

Одређивање полиморфизама гена за *Keap 1, GSTPIAB, GSTPICD* и *GPX3*

Полиморлизам гена *Keap1 (rs1048290)*, *GSTPIAB (rs1695)*, *GSTPA1CD (rs1138272)* и *GPX3 (rs8177412)*, ће бити одређивани методом qPCR (енгл. *quantitative Polymerase Chain Reaction*), уз кориштење комерцијалних есеја *Applied Biosystem Taqman Drug Metabolism Genotyping* следећих идентификацијационих бројева: C_9323035_1 за испитивање полиморлизма гена за *Keap1* (rs1048290), C_3237198_20 за испитивање полиморлизма гена за *GSTPIAB* (rs1695), C_1049615_20 за испитивање полиморлизма гена за *GSTPA1CD* (rs1138272) и C_25964717_20 за испитивање полиморлизма гена за *GPX3*.

(C/T) на апарату Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR.

Метод и узорак су одговарајући?

ДА

НЕ

IV.9 Мјесто, лабораторија и опрема за експериментални рад

Центар за Биомедицинска истраживања, Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци

Институт за медицинску и клиничку биохемију Медицинског факултета Универзитета у Београду

Услови за експериментали рад су одговарајући?

ДА

НЕ

IV.10 Методе обраде података

Нормалност расподјеле података ће бити проверена рачунским методама (кофицијент варијације, вриједности *skewness* и *kurtosis*, статистички тест *Shapiro-Wilk*) као и графичким методама за проверу нормалности (хистограм, нормални Q-Q графикон, детрендован нормнални Q-Q графикон, графикон кутије (engl. *boxplot*)). Статистичка анализа би, поред дескриптивне статистике, укључивала и примјену χ^2 теста за процјену да ли се одговарајући генотипови налазе у *Hardy-Weinberg* еквилибријуму и детерминисање значајности разлике у фреквенцији добијених генотипова, али и одређених разлика између испитиваних болесника и контролне групе. Значајност разлике у учесталости присуства неке варијабле, односно њеног нивоа, у студијској и контролној групи процјењивала би се универијантном логистичком регресионом анализом, на основу величине и значајности односа шанси (engl. *odds ratio*, OR) са интервалом повјерења од 95% (IP 95%) кроз неколико статистичких модела. Статистичка анализа добијених резултата ће бити изведена кориштењем SPSS 17.0 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*).

Предложене методе су одговарајући?

ДА

НЕ

В ЗАКЉУЧАК

Кандидат је подобан	ДА	НЕ
Тема је подобна	ДА	НЕ

Образложење (до 500 карактера):

На основу података о кандидату и разматрања образложења теме, Комисија сматра да кандидат Жана Радић Савић својим радом и постигнутим резултатима показује да је подобна за израду докторске дисертације.

Предложена тема докторске дисертације „Испитивање повезаности полиморфизама гена за регулаторне и каталиничке антиоксидантне протеине са ризиком за настанак Балканске ендемске нефропатије“ је научно заснована, савремена са примјеном актуелних молекуларних метода, те представља оригинално истраживање у области медицинских наука. Поред тога, велики научни допринос ове докторске дисертације је и у томе што представља прво и једино истраживање о повезаности полиморфизама за антиоксидантне ензиме код болесника са Балканском ендемском нефропатијом на територији Републике Српске. Резултати овог истраживања могли би дати допринос расvjetљавању улоге окисидативног стреса у овој болести.

На основу изнијетих чињеница, Комисија са посебним задовољством, *даје позитивну оцену о подобности теме, кандидата, ментора и коментора* за израду докторске дисертације под називом „Испитивање повезаности полиморфизама гена за регулаторне и каталиничке антиоксидантне протеине са ризиком за настанак Балканске ендемске нефропатије“.

Датум: 25. фебруар, 2023. године

Марија Матић

Проф. др Матић Марија, ванредни професор,
ужа научна област медицинска биохемија,
Медицински факултет Универзитета у
Београду; Предсједник комисије

Весна Ђорђевић

доц. др Ђорђевић Весна, доцент, ужа научна
област медицинска биохемија, Медицински
факултет Универзитета у Београду; члан

Видовић Вања

доц. др Видовић Вања, доцент, ужа научна
област хумана генетика, Медицински факултет
Универзитета у Бањој Луци; члан