

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ  
ФАКУЛТЕТ: МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊА ЛУЦИ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ БАЊА ЛУКА

Примљено: 6. 2. 2024.		
Орг. јед.	Број	Прилог
		Образац 3

*Redef*

**ИЗВЈЕШТАЈ**  
*о оцјени урађене докторске дисертације*

**1. ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ**

Орган који је именовано комисију: Научно-наставно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци

Датум именовања комисије: 14.12.2023. године

Број одлуке: 18/3.981/23

Чланови комисије:

1. Марија Матић	ванредни професор	Медицинска и клиничка биохемија
Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
Медицински факултет Универзитета у Београду		предсједник
Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији
2. Ранко Шкрбић	редовни професор	Фармакологија и токсикологија
Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
Медицински факултета Универзитета у Бањој Луци		члан
Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији
3. Радослав Гајанин	редовни професор	Патологија
Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
Медицински факултета Универзитета у Бањој Луци		члан
Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији
4. Весна Ћорић	доцент	Медицинска и клиничка биохемија
Презиме и име	Звање	Научно поље и ужа научна област
Медицински факултет Универзитета у Београду		члан
Установа у којој је запослен-а		Функција у комисији
5. Вања Видовић	доцент	Хумана генетика

Презиме и име Медицински факултета Универзитета у Бањој Луци Установа у којој је запослен-а	Звање члан	Научно поље и ужа научна област Функција у комисији
---	---------------	--

## 2. ПОДАЦИ О СТУДЕНТУ

Име, име једног родитеља, презиме: Жана (Горан) Радић Савић

Датум рођења: 11.07.1992.

Мјесто и држава рођења: Бања Лука, РС/БиХ

### 2.1. Студије првог циклуса или основне студије или интегрисане студије

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

Универзитет: Универзитет у Бањој Луци

Факултет/и: Медицински факултет

Студијски програм: Медицина

Стечено звање: доктор медицине

### 2.2. Студије другог циклуса или магистарске студије

Година уписа:	-	Година завршетка:	-	Просјечна оцјена током студија:	-
---------------	---	-------------------	---	---------------------------------	---

Универзитет:-

Факултет/и:-

Студијски програм:-

Назив завршног рада другог циклуса или магистарске тезе, датум одбране:-

Ужа научна област завршног рада другог циклуса или магистарске тезе:-

Стечено звање:-

### 2.3. Студије трећег циклуса

Година уписа:	2019	Број ECTS остварених до сада:		Просјечна оцјена током студија:	9.58
---------------	------	-------------------------------	--	---------------------------------	------

Факултет/и: Медицински факултет

Студијски програм: Биомедицинске науке

### 2.4. Приказ научних и стручних радова студента

РБ	Подаци о референци	Категорија <sup>1</sup>
----	--------------------	-------------------------

1.	<b>Radić Savić Ž</b> , Ćorić V, Vidović V, Bećarević J, Milovac I, Reljić Z, Mirjanić-Azarić B, Škrbić R, Gajanin R, Matic M, Simić T. GPX3rs8177412 Polymorphism Modifies Risk of Upper Urothelial Tumors in Patients with Balkan Endemic Nephropathy. <i>Medicina</i> 2023;59(1421):1-16.	M22
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<u>ДА</u> <u>НЕ</u>
РБ	Подаци о референци	Категорија
2.	<b>Radić Savić Ž</b> , Vidović V, Vidović S, Milovac I, Bećarević J, Ćorić V, Matic M, Simić T. Association of GSTP1 polymorphisms rs1695 and rs113827 with susceptibility to Balkan endemic nephropathy. Book of abstracts. International Conference of Biochemists and Molecular Biologists in Bosnia and Herzegovina - ABMBVIH, 2023: 84-1.	
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<u>ДА</u> <u>НЕ</u>
РБ	Подаци о референци	Категорија
3.	Radić Savić Žana, Vidović V, Vidović S, Milovac I, Bećarević J, Marić A, Ćorić V, Matic M, Simić T. Association of MDR1 rs1045642 polymorphism with susceptibility to Balkan endemic nephropathy. Book of abstracts. Congress of geneticists in Bosnia and Herzegovina with international participation, 2023: 69-1.	
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<u>ДА</u> <u>НЕ</u>
РБ	Подаци о референци	Категорија
4.	Vidovic V, Novaković I, Damjanović T, <b>Radić Savić Ž</b> , Vidović S, Škrbić R, et al. Galectin 3 rs4644 gene polymorphism is associated with metabolic traits in Serbian adolescent population. <i>J Med Biochem</i> 2023. <a href="https://doi.org/10.5937/jomb0-47180">https://doi.org/10.5937/jomb0-47180</a> .	
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<u>ДА</u> <u>НЕ</u>
РБ	Подаци о референци	Категорија
5.	Mirjanic-Azaric B, Stankovic S, Nezic L, <b>Radic Savic Z</b> , et al. Analysis of redox status and HDL subclasses in patients with lymphoma and the associations with FDG-PET/CT findings. <i>Front. Oncol.</i> 2023; 13:1221414. doi: 10.3389/fonc.2023.1221414	M22
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<u>ДА</u> <u>НЕ</u>

РБ	Подаци о референци	Категорија	
6.	Mirjanic-Azaric B, Jerin A, <b>Radic Z</b> . Thyroid stimulating hormone values of clinical decisions of hypothyroidism measurement by three different automated immunoassays. Scand J Clin Lab Invest 2020; 80: 151-5	M23	
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<b>ДА</b>	<b><u>НЕ</u></b>
РБ	Подаци о референци	Категорија	
7.	Vidović V, Bećarević J, <b>Radić Savić Ž</b> , Marić A, Vidović S, Milovac I. The Prevalence of VKORC1 Alleles in the Population of the Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. Scripta Medica 2023;54(2):175-179.	I	
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<b>ДА</b>	<b><u>НЕ</u></b>
РБ	Подаци и референци	Категорија	
8.	<b>Радић, Ж.</b> , Калинић, Д., Марић, Д. Изазови у дијагностици фибромускуларне дисплазије. Зборник сажетака и изабраних радова у цјелини, Пети међународни конгрес доктораа медицине Републике Српске, Теслић, 2017: 25-3		
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<b>ДА</b>	<b><u>НЕ</u></b>
РБ	Подаци и референци	Категорија	
9.	<b>Радић, Ж.</b> , Калинић, Д., Марић, Д. Ријетка клиничка презентација фибромускуларне дисплазије у унутрашњој каротидној артерији. Зборник сажетака и изабраних радова у цјелини, Пети међународни конгрес доктораа медицине Републике Српске, Теслић, 2017: 187-191		
<b>Припадност рада ужој научној области којој припада предмет истраживања докторске дисертације</b>		<b>ДА</b>	<b><u>НЕ</u></b>

### 3. УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације: *ИСПИТИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ПОЛИМОРФИЗАМА ГЕНА ЗА РЕГУЛАТОРНЕ И КАТАЛИТИЧКЕ АНТИОКСИДАНТНЕ ПРОТЕИНЕ СА РИЗИКОМ ЗА НАСТАНАК БАЛКАНСКЕ ЕНДЕМСКЕ НЕФРОПАТИЈЕ*

Научно поље и ужа научна област: Медицинска биохемија

Датум прихватања теме докторске дисертације и бројеви одлука одговарајућих органа чланица и Универзитета:

08.02.2023. године, Одлука Научно-наставног вијећа Медицинског факултета у Бањој Луци о именовану Комисије за оцјену подобности кандидата, теме и ментора докторске дисертације број 18/3.134/2023. 13.03.2023. године, Одлука о усвајању Извјештаја комисије за оцјену подобности студента, теме и испуњености услова за менторство за израду докторске дисертације број 18/3.217/2023. 30.03.2023. године, Одлука Сената Универзитета у Бањој Луци о Сагласности на именовану Комисије за оцјену подобности кандидата, теме и ментора докторске дисертације број 02/04-3.668-44/23.

14.12.2023. године Одлука о именовану Комисије за оцјену урађене докторске дисертације број 18/3.981/23.

Докторска дисертација кандидата др. мед Жане Радић Савић је написана латиничним писмом, фонтом *Times New Roman*, величина слова 12, са проредом 1.5, формат А4. На почетку дисертације налази се 11 нумерисаних страна, а то су насловна страна докторске дисертације на српском и енглеском језику, резиме на српском и енглеском језику, захвалница и садржај.

На крају дисертације налази се 4 стране које нису нумерисане, а које садрже:

-Биографију кандидата

-Потписану изјаву о ауторству

-Потписану Изјаву којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да се докторска дисертација учини јавно доступном

-Потписану изјаву о аутентичности штампае и електронске верзије докторске дисертације

Докторска дисертација написана је на 98 страна и садржи 7 поглавља, 25 слика, 13 табела и 239 референци. Свако поглавље је засебно, али су сва међусобно повезана. Свако поглавље подијељено је у неколико нумерички обиљежених цјелина. Садржај ове докторске дисертације представљен је сљедећим поглављима:

1. Увод (стр. 1-30)
  2. Циљеви (стр. 31)
  3. Материјал и методе (стр. 32-40)
  4. Резултати (стр. 40-64)
  5. Дискусија (стр. 64-75)
  6. Закључци (стр. 75-77)
  7. Литература (стр. 77-95)
- Листра скраћеница (стр. 96-98)

#### 4. УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

##### Разлози због којих је предузето истраживање:

У свјетлу чињенице да је Република Српска ендемско подручје за Балканску ендемску нефропатију (БЕН), као и да аристолохијска киселина (енгл. *Aristolochic acid*, АА) и оксидативни стрес који је присутан током метаболизма овог нефротоксина могу да имају важну улогу у настанку и прогресији БЕН, од великог је значаја било испитати повезаност полиморфизама гена ензима укључених у метаболизам АА, као и гена за антиоксидантне ензиме са ризиком за настанак БЕН. Доступни литерарни подаци о њиховој потенцијалној улози у настанку и развоју БЕН су релативно оскудни. Шта више, посљедњих година све више се јавља тежња ка персонализованом приступу етиолошки комплексним болестима, међу којима је и БЕН, што би могло да допринесе благовременој дијагностици, прогнози и праћењу обољелих од БЕН и БЕН-удружених тумора. Према томе, испитивање полиморфизама гена који учествују у метаболизму АА и одбрани од оксидативног стреса могло би да допринесе идентификовању потенцијалних биомаркера који би могли да помогну у процјени интер-индивидуалних разлика, као и ризика оболијевања од БЕН и БЕН повезаних тумора горњег уротелијума.

##### Предмет истраживања:

У Уводу ове докторске дисертације детаљно је описана Балканска ендемска нефропатија са освртом на туморе горњег уринарног тракта на терену БЕН. Дати су најновији епидемиолошки подаци и дефинисани фактори ризика значајни за настанак овог обољења. Посебна пажња дата је аристолохијској киселини као најважнијем узрочнику БЕН. С тим у вези, описани су молекуларни механизми настанка слободних радикала након излагања овом нефротоксину и његове биотрансформације у организму. Узимајући у обзир већу учесталост уротелних тумора код обољелих од БЕН, описана је и узрочна веза уротелних тумора и аристолохијске киселине. Детаљно је описана и веза БЕН са оксидативним стресом: описани су механизми стварања реактивних кисеоничних врста (енгл. *reactive oxygen species*, РОС) у БЕН и утицај аристолохијске киселине на митохондријалну дисфункцију и настанак РОС. Затим је дефинисана је структура и функција регулаторних и каталитичких антиоксидантних протеина, Nrf2 (енгл. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), KEAP1 (енгл. *Kelch-like ECH-associated protein 1*), глутатион трансферазе пи (GSTP), глутатион пероксидазе (GPX) и MDR1 (енгл. *Multidrug resistance 1*), те њихова повезаност са БЕН. Посебна пажња посвећена је генским варијацијама у оквиру Nrf2, KEAP1, GSTP1, GPX3 и MDR1 гена и њиховој удружености са БЕН. Представљено је да у литератури нема података о повезаности полиморфизама Nrf2, KEAP1 и GPX3 и гена са ризиком за настанак БЕН, оксидативним фенотипом и њиховом потенцијалном прогностичком значају код болесника са БЕН, као ни са туморима удруженим са БЕН.

Циљеви докторске дисертације су прецизно дефинисани и јасно написани. Први циљ био је да се испита дистрибуција полиморфизама KEAP1 (rs1048290), Nrf2 (rs6721961), GSTP1AB (rs1695), GSTPA1CD (rs1138272), GPX3 (rs8177412) и MDR1 (rs1045642) гена

код болесника са БЕН и припадника контролне групе, као и болесника који су развили тумор горњег уротелијума. Други циљ је био да се испита утицај полиморфизама *KEAP1* (rs1048290), *Nrf2* (rs6721961), *GSTPIAB* (rs1695), *GSTPAICD* (rs1138272), *GPX3* (rs8177412) и *MDR1* (rs1045642) на подложност за настанак БЕН и тумора уротелијума. Поред тога циљ ове докторске дисертације је био и испитати ефекат *GSTPIABCD* хаплотипова на ризик за настанак БЕН. На крају, последњи циљ је био испитати да ли постоји кумулативни ефекат испитиваних генотипова на ризик за настанак БЕН.

#### Кратак преглед претходних истраживања и литературе:

Велики број експерименталних студија иде у прилог чињенице да хелијски метаболизам АА укључује сложену метаболичку активацију која за последицу има стварање кисеоничних слободних радикала и настанак оксидативног стреса Поред појачане продукције слободних радикала, у условима *in vitro* је показано да АА доводи и до смањења антиоксидативног капацитета хелија (Bunel et al., 2016). Штавише, оксидативни стрес и оштећења епителних хелија проксималних тубула били су евидентни код пацова третираних АА. Могуће да је управо ова тубулотоксичност повезана са смањеном антиоксидантном активношћу (Anger et al., 2020; Bunel et al., 2016). Даље, овакав поремећај редокс хомеостазе доводи до оштећења виталних биолошких макромолекула, укључујући и ДНК (Chiang, 2010; Schmeiser et al., 2014). ДНК може бити и директно оштећена под утицајем N-хидроксиаристолактама I, производа биотрансформације АА, који формира адукте са ДНК (Schmeiser et al., 2014). Познато је да ови адукти доводе до карактеристичних А:Т --> Т:А трансверзије тумор супресорских гена, те су веома мутагени и могу да покрену процес канцерогенезе (Olivier et al., 2012). Са друге стране, оксидативни стрес изазван АА може имати значајну улогу у оштећењу бубрежног паренхима у БЕН (Anger et al., 2020; Antoine et al., 2022). 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 бубрега које је добијено од пацијената са БЕН (Leung and Chan, 2015; Schmeiser et al., 1996; Stiborová et al., 2017).

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 (Chan et al., 1996). Код свих ових протеина описан је генетски полиморфизам који за последицу има смањену или измијењену активност, а самим тим и могућност неутрализације РОС (Ozawa, 1997).

*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 хелији, док *Nrf2* представља један од најважнијих регулаторних антиоксидантних протеина (Canning et al., 2015). У стањима редокс равнотеже, *Nrf2* углавном остаје у цитоплазми као комплекс са регулаторном *Keap1* подјединицом. Међутим, у вишку РОС и електрофилних једињења долази до одвајања *Keap1* чиме *Nrf2* избјегава убиквитинацију, мигрира у једро гдје се везује за *ARE* (енгл. *antioxidant response elements*) на молекулу ДНК (Horie et al., 2021). 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 (Surh et al., 2008). 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 (Marzec et al., 2007). У *in vitro* студијама показано је да повишени нивои AA инхибирају активност *Nrf2*. Управо снижена експресија *Nrf2*, као и повећана продукција РОС, погодују настанку оксидативног стреса (Huang et al., 2020). *Keap1 rs1048290* полиморфизам се налази у геномском региону (егзон 4) и кодира DGR домен (енгл. *double-glycine repeat*) гена за *Keap1* (Sykiotis, 2021). Како је овај домен је у директној интеракцији са *Nrf2*, он утиче на везивање *Nrf2-Keap1* и посљедично на нивое *Nrf2* протеина (Muscarella and Fazio, 2016). У литератури у само неколико студија испитиван је овај полиморфизам и доводи се у везу са карциномом дојке, хроничним респираторним болестима и епилепсијом (Almeida et al., 2019; Hartikainen et al., 2015). Међу великим бројем протеина чија је експресија регулисана *Nrf2* налазе се и поједине глутатион трансферазе (енгл. *glutathione S transferases*, GST). GST су суперфамилија ензима који учествују у реакцијама детоксикације великог броја ксенобиотика (Satoh et al., 2002). Резултати најновијих истраживања сугеришу да су GST, такође, важне у детоксикацији AA (Gao et al., 2021; Zhang et al., 2020). Наиме, метаболит аристолахтам-нитернијум јон, производ прве фазе метаболизма AA, може да се коњугује са глутатионом (Gao et al., 2021), у чему учествују ензими друге фазе метаболизма ксенобиотика, међу којима је и GST. Поред тога, показано је да се и AA-I, најтоксичнија компонента AA, такође може везати за глутатион у реакцијама које катализују GST (Zhang et al., 2020). 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 (Matic et al., 2016; Reljić et al., 2014). Међу бројним антиоксидантним ензимима, један од најважнијих је глутатион пероксидаза (GPX) (Nirgude and Choudhary, 2021). 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 (Chang et al., 2020). У бубрезима, GPX3 се првенствено експримира у паријеталним ћелијама Боуманових капсула и у ћелијама базолатералне мембране проксималних тубула. У плазми GPX3 обезбјеђује заштиту епителним ћелијама од оксидативног оштећења. *GPX3 T-65C (rs8177412)* SNP, може утицати на активност и на експресију овог изоензима (Baez-Duarte et al., 2014). Како је бубрег примарно ткиво у којем се експримира GPX3 од великог је значаја испитати утиче ли полиморфна експресија на ризик за развој БЕН. У литератури нема података о утицају полиморфизма *GPX3 rs8177412* на ризик за појаву БЕН, тако да је ово прво истраживање које се бави потенцијалном узрочном везом између полиморфне експресије *GPX3* гена и ендемске нефропатије, као и тумора уротелијума на терену БЕН. Неке експерименталне студије сугеришу да поједини ензими треће фазе метаболизма, која укључује пренос коњугата преко ћелијске мембране, такође учествују у метаболизму AA. Наиме, након нитроредукције AA-I и AL-NOH-I, овај потоњи се претвора у аристолахтам-Н-сулфат (AL-



NOSO3H), токсични метаболит који се затим транспортује из јетре путем трансмембранских протеина који припадају породици АБЦ транспортера (*engl. ATP binding cassette, ABC*), међу којима и MDR1 (*engl. Multidrug resistance 1*) (Chang et al., 2017).

#### Научни и практични допринос:

Иако резултати експерименталних истраживања иду у прилог важне улоге оксидативног стреса у патогенези БЕН и удружених тумора горњег уротелијума, овај значајан патофизиолошки механизам још увијек није довољно испитан у овој патологији, те су подаци код БЕН пацијената и даље оскудни. Због тога се ова докторска дисертација бави испитивањем генетског профила регулаторних и каталитичких антиоксидативних протеина, укључених у прву и најјачу линију антиоксидантне заштите,. Водећи се чињеницом да Keap1/Nrf2 сигнални пут игра централну улогу у цитопротективним одговорима ћелије на оксидативни стрес поред полиморфизма за Nrf2, у склопу ове докторске дисертације испитивана је и повезаност полиморфизма гена за Keap1 код пацијената са БЕН. У литератури нема студија које су се бавиле овим полиморфизмом, стога је ово докторска дисертација била прво истраживање које је изучавало повезаност ових полиморфизама код пацијената са БЕН. Иако је, у неколико истраживања, испитивана улога генетских полиморфизама за глутатион трансферазе, у литератури подаци о дистрибуцији и улози хаплотип анализе полиморфизама А, В, С и D за ген за GSTP1 не постоје. Ово је, такође, било прво истраживање у којем је одређивана дистрибуција ових полиморфизама у популацији Републике Српске, као и повезаност ових полиморфизама са подложношћу за настанак БЕН и тумора удружених са БЕН.

## 5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДОЛОГИЈА РАДА

У поглављу *Материјал и методе* јасно је представљена методологија истраживања, одређена је популација и узорак истраживања, као и метод анализе и обраде података.

У овом поглављу наведено је да је за испитивање утицаја полиморфизама *Nrf2* (*rs6721961*), *Keap1* (*rs1048290*), *GSTP1A1B* (*rs1695*), *GSTPA1CD* (*rs1138272*), *GPX3* (*rs8177412*) и *MDR1* (*rs10545642*) гена на подложност за развој БЕН изведена студија случајева и контрола (*engl. case-control study*) у коју је било укључено 209 болесника са БЕН и 140 испитаника контролне групе, становника ендемских подручја без дијагнозе БЕН. За процјену утицаја полиморфизама *Nrf2* (*rs6721961*), *Keap1* (*rs1048290*), *GSTP1A1B* (*rs1695*), *GSTPA1CD* (*rs1138272*), *GPX3* (*rs8177412*) и *MDR1* (*rs10545642*) гена на ризик за настанак тумора горњих уротелијума на терену БЕН, изведена је студија случајева (*engl. case-only study*).

Ово истраживање је изведено у складу са етичким стандардима датим у Хелсиншкој декларацији и у складу са правилима Етичке комисије Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Етичке комисије Медицинског факултета Универзитета у

Београду.

Групу обољелих чинило је 209 пацијената, са подручја Бијељине и Шамца, 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.

Критеријуми за укључивање у испитивање били су:

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

-потписан информисани пристанак

Контролну групу чинило је 140 испитаника, становника ендемских подручја Бијељине, без дијагнозе БЕН. Упарени по узрасту и полу испитаници контролне групе су укључени у студију у току редовних систематских прегледа одраслих становника ендемских региона.

Критеријуми за укључивање испитаника у контролну групу били су:

-пунољетни становници ендемских подручја,

-лабораторијски, клинички и ехосонографски потврђено одсуство БЕН

-клинички и лабораторијски потврђено одсуство других бубрежних болести (вриједности урее и креатинина у крви у референтним границама)

-потврђено одсуство дијабетеса и малигних болести

-потписан информисани пристанак

Услов за неукључивање у студију био је став испитаника да не жели да учествује у истраживању, као и доказ о постојању малигног обољења и дијабетеса у историји болести.

За анализу полиморфизама од свих испитаника узимано је по 2 мл пуне крви у вакутајнере, са ЕДТА као антикоагулансом. По узимању узорци су чувани на  $-20^{\circ}$  С до изолације ДНК.

Инверзиони полиморфизам *Nrf2 rs6721961* одређиван је PCR-CTTP методом (енгл. *Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers*) на апарату Applied Biosystem ProFlex PCR System. Реакција амплификације се одвијала кроз 6 корака. Продукти амплификације раздвајани су на 2% агарозном гелу. Визуелизација PCR производа вршена је помоћу Е-Gel Power Electrophoresis система (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) уз SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Waltham, MA).

Полиморфизам гена *KEAP1* (rs1048290), *GSTP1AB* (rs1695), *GSTPA1CD* (rs1138272), *GPX3* (rs8177412) и *MDR1* (rs1045642) су одређивани методом RT-PCR (енгл. *Real Time Polymerase Chain Reaction*), уз кориштење комерцијалних есеја Applied Biosystem Taqman Drug Metabolism Genotyping's следећих идентификационих бројева: C\_\_9323035\_1\_ за испитивање полиморфизма гена за *KEAP1* (rs1048290), C\_\_3237198\_20 за испитивање полиморфизма гена за *GSTP1AB* (rs1695), C\_\_1049615\_20 за испитивање полиморфизма гена за *GSTPA1CD* (rs1138272), C\_\_25964717\_20 за испитивање полиморфизма гена за *GPX3* и C\_\_7586657\_20 за испитивање *MDR1* (rs1045642) полиморфизма на апарату Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Примијењене методе истраживања су адекватне, довољно тачне и савремене. Обим

истраживања довољан је за доношење поузданих закључака, с обзиром на број испитаника и адекватност примијењених статистичких метода обраде података.

## 6. РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

### Кратак преглед најважнијих резултата:

Резултати ове докторске дисертације су показали да међу анализираним полиморфизмима, није било појединачно статистички значајног утицаја на подложност за развој БЕН. Када се посматра комбиновани ефекат, резултати су показали да су пацијенте које су носиоци *GPX3* и *MDR1* варијантних генотипова (*GPX3\*T/C\*C/C* генотип и *MDR1\*C/T\*T/T* генотип) биле под више од 3 пута већим ризиком од развоја БЕН ( $OR_1 = 3,34$ ,  $95\%IP = 1,16-9,60$ ,  $p = 0,025$ ), што је потврђено у прилагођеном моделу ( $OR_2 = 3,79$ ,  $95\%IP = 1,27-11,24$ ,  $p = 0,016$ ). Додатно, анализа хаплотипа *GSTP1ABCD*, иако није достигла статистичку значајност, показала је да је хаплотип који се састоји од оба варијантна алела (\*G и \*T) био повезан са 1,6 пута већим ризиком за настанак ове болести ( $OR = 1,64$ ;  $95\%IP = 0,75-3,58$ ;  $p = 0,210$ ). Приликом процјене кумулативног ефекта посматрајући пет различитих генотипова повезаних са ризиком, уочен је узлазни тренд ризика за БЕН. Показано је да су носиоци само једног генотипа, за који је претходном анализом показано да је удружен са повећаним ризиком за настанак БЕН, мање подложни оболијевању од нефропатије ( $OR=1,65$ ,  $95\%IP: 0.46-5.82$ ,  $p=0,436$ ) у односу на носиоце било која два, односно три, четири или пет ризичних генотипова. У овој докторској дисертацији је по први пут показано да је варијантни *GPX3\*T/C+C/C* генотип повезан са ризиком од карцинома горњег уротелијума. Наиме, наши резултати су показали да особе носиоци варијантног *GPX3\*T/C+C/C* генотипа, које карактерише смањена експресија *GPX3*, показују чак 8 пута већи ризик за настанак тумора горњег уринарног тракта ( $OR = 8,16$ ,  $95\%IP = 3,60-18,40$ ,  $p = 0,001$ ), што је такође потврђено и након прилагођеног модела ( $OR = 8,48$ ,  $95\%IP = 3,60-19,30$ ,  $p = 0,001$ ).

У поглављу *Резултати* јасно су приказани, табеларно и графички, те правилно и прецизно тумачени резултати истраживања. У поглављу *Дискусија* резултати су логично и јасно тумачени, и анализирани у односу на резултате претходних истраживања из ове области. У овом дијелу докторске дисертације сумарно су представљени резултати истраживања и кандидаткиња је дискутовала о постављеним циљевима. У овом поглављу поменут је и научни допринос истраживања, као и могуће смјернице које могу бити од користи за даља истраживања. Наведена су и ограничења истраживања. На крају ове докторске дисертације у поглављу *Закључци* дефинисани су и закључци ди којих се дошло током истраживања.

### Упоредна анализа резултата докторске дисертације са резултатима из литературе:

Подаци из литературе који се односе на значај полиморфизама гена за регулаторне и

каталитичке антиоксидантне протеине у БЕН су врло оскудни. У склопу ове докторске дисертације анализирано је постојање повезаности БЕН, као и тумора горњег уринарног тракта код пацијената са БЕН са неким од шест полиморфизама, и то rs6721961 (C-617A) у промоторском ARE региону *Nrf2* гена, rs1048290 у геномском региону *KEAP1* гена који карактерише C<G супституција, два полиморфизма унутар *GSTP1* гена, и то *GSTP1* rs1695 (транзиција *Ile105Val*) и *GSTP1* rs1138271 (*Ala114Val*), rs817741 (-T65C) у промоторском региону *GPX3* гена и rs1045642 (*C3435T*) полиморфизма у *MDR1* гену који кодира транспортер П-гликопротеин. Резултати ове дисертације, по први пут, показују да *Nrf2* rs6721961 полиморфизам није удружен са погоршањем оксидативног дистреса код пацијената са БЕН. У овој студији особе носиоци најмање једног варијантног \*C алела (*Nrf2*\*A/A+C/A генотип) повезаног са нижом транскрипционом активности *Nrf2*, нису имали већу шансу за развој БЕН кроз сва четири испитивана статистичка модела (OR1 = 0,88, 95%IP = 0,55-1,46, p = 0,669; OR2 = 0,91, 95% IP = 0,55-1,50, p = 0,723; OR3 = 0,89, 95% IP = 0,54-1,46, p = 0,648; OR4 = 0,83, 95% IP = 0,48-1,42 p = 0,608). Овај резултат је у складу са досадашњим истраживањима која нису дала јасну слику о улози овог регулаторног протеина у аристоклохијској нефропатији (Huang et al., 2020; Zhao et al., 2015). Међутим, када су у питању болести бубрега, у неколико студија показана је веза између полиморфне експресије *Nrf2* у хроничној бубрежној слабости, као и код пацијената са терминалном бубрежном слабости (Aranda-Rivera et al., 2022; Jerotic et al., 2019), главним и неминовним компликацијама БЕН. У свјетлу претходно изложених доказа о високој преваленцији тумора горњег уринарног тракта код БЕН, у овом истраживању су били укључени и пацијенти обољели од БЕН који су развили тумор. Када су у питању ови тумори, резултати ове дисертације нису показали да *Nrf2* rs6721961 полиморфизам доприноси повећаном ризику за настанак тумора уротела. Само је једна студија до сада спроведена са циљем да се истражи повезаност *Nrf2* rs6721961 полиморфизма са ризиком и морталитетом код пацијената са туморима уротела, односно тумором мокраћне бешике (Reszka et al., 2014). Слично резултатима ове дисертације, у поменутој студији Reszka и сарадници нису утврдили повезаност овог SNP са ризиком за настанак тумора мокраћне бешике. Ово је и прво истраживање у којем је посматран утицај *KEAP1* rs1048290 полиморфизама на ризик од развоја БЕН и уротелног карцинома. До сада се ни једна студија није бавила функционалним значајем овог полиморфизма у болестима бубрега. На основу доступних података о потенцијалној улози *KEAP1* полиморфизма у настанку болести, у овом истраживању је претпостављено да варијантни \*G алел *KEAP1* rs1048290 (с. 1413C>G) носи ризик за БЕН (Muscarella and Fazio, 2016). Када се посматра индивидуални ефекат овог полиморфизма, резултати ове дисертације нису показали повезаност полиморфне експресије *KEAP1* rs1048290 са развојем БЕН. Слични резултати су добијени и у односу на туморе уринарног тракта. Ипак, када се ова два полиморфизма посматрају у комбинацији резултати показују да су особе носиоци *Nrf2*\*C/C+*KEAP1*\*C/C или G/G генотипова скоро 2 пута подложнији настанку ендемске нефропатије, у поређењу са особама које имају *Nrf2*\*C/C+*KEAP1*\*C/C референтни генотип, иако резултат није достигао статистичку значајност (прилагођени OR2 = 1,91; IP = 0,5-7,41; p = 0,335). Иако је у, до сада, неколико студија испитиван је утицај полиморфизма *GSTP1* гена у популацији са БЕН (Elofey et al., 2020; Matic et al., 2016; Reljic et al., 2014), ово је било и прво

истраживање које је испитало повезаност полиморфизама унутар *GSTP1* гена код БЕН пацијената у Републици Српској. Досадашње студије које су се бавиле улогом *GSTP1* гена у популацији са БЕН, нису показале значајне разлике у дистрибуцији учесталости *GSTP1* генотипова, као ни ризика за БЕН (Andonova et al., 2004; Matic et al., 2016; Reljić et al., 2014). Резултати добијени у овој докторској дисертацији су у сагласности са претходним истраживањим, испитивани *GSTP1* (rs1695) полиморфизам се није показао као значајан биомаркер ризика за настанак БЕН и удружених тумора. Веома слични резултати су добијени и приликом процјене потенцијалног утицаја полиморфизма *GSTP1CD* rs1138272, варијантни генотип *GSTP1CD\*С/Т\*Т/Т* није имао статистички значајан утицај на развој БЕН и уротелног карцинома. Ипак, носиоци \*Т варијантног алела су показали 1,5 пута већи ризик за настанак БЕН (прилагођени  $OR_4 = 1,67$ ,  $95\%IP = 0,58-4,81$ ,  $p = 0,340$ ) чиме би резултати овог истраживања могли да укажу на потенцијалну укљученост *GSTP1* у метаболизам АА. Према студији Reljić и сарадника, *GSTP1\*G/G* генотип није био удружен са повећаним ризиком за БЕН, али доприноси већем ризику за лијечење хемодијализама (Reljić et al., 2014). Осим тога, слични резултати су добијени и у студији спроведеној у Бугарској у којој није показана разлика у учесталости *GSTP1* генотипова код пацијената с БЕН-ом, у поређењу са контролном групом (Andonova et al., 2004). Анализа хаплотипа *GSTP1ABCD* открила већи ризик од БЕН код носилаца оба варијантна алела, уочени ефекат није достигао статистичку значајност. Наиме, хаплотип који се састоји од варијантних \*G и \*Т алела био је повезан са 1,6 пута вишим ризиком за БЕН, иако се резултат није показао статистички значајним ( $OR = 1,64$ ;  $95\%IP = 0,75-3,58$ ;  $p = 0,210$ ). Када се посматра *MDR1* rs1045642 полиморфизам индивидуално резултати ове докторске дисертације указују да су особе носиоци барем једног варијантног *MDR1\*Т* алела у скоро 2 пута већем ризику за настанак БЕН, иако је резултат био на граници за статистичку значајност (прилагођени  $OR_3 = 1,82$ ,  $95\%IP = 0,87-3,40$ ,  $p = 0,059$ ). Међутим, у случају *MDR1* C3435T полиморфизма добијени резултати показују полно специфичне разлике у односу на ризик од БЕН. Тако су резултати ове дисертације показали да је полиморфизам *MDR1* C3435T повезан са повећаним ризиком од БЕН, искључиво код жена ( $OR_3 = 1,91$ ,  $95\%IP = 0,89-4,32$ ,  $p = 0,090$ ). Иако постоје опречни ставови о улози *MDR1* у метаболизму АА, једина студија на популацији бугарских пацијената показала је да је *MDR1* хаплотип 1/2 (C2677/T3435) имао мању учесталост код пацијената са БЕН (7%), него у контролној групи (16%) (Atanasova et al., 2004). Када се *MDR1* посматра у комбинацији са другим антиоксидантним протеином резултати показују да пацијентице које су носиоци барем једног варијантног алела *GPX3\*С* и барем једног варијантног алела *MDR1\*Т* (*GPX3\*Т/С\*С/С* генотип + *MDR1\*С/Т\*Т/Т* генотип) имају 3 пута већи ризик за појаву БЕН ( $OR_2 = 3,79$ ,  $95\%IP = 1,27-11,24$ ,  $p = 0,016$ ). Када се посматрају тумори горњег уротела на терену БЕН резултати добијени у овој докторској дисертацији открили су значајан утицај *GPX3* rs8177412 полиморфизма на ризик од уротелних тумора горњег тракта удруженог са БЕН. Наиме, резултат је показао да је *GPX3\*Т/С\*С/С* варијантна генотипа, коју карактерише слабија антиоксидантна активност *GPX3*, значајан фактор ризика за развој карцинома повезаног са БЕН. Добијени резултати су у сагласности са резултатима добијеним анализом података у TCGA и GTEx (*engl. Genotype-Tissue Expression*) базама (Lonsdale et al., 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014), гдје је показано да

је експресија гена *GPX3*, већа у нормалном ткиву мокраћне бешике него у ткиву карцинома мокраћне бешике (Song et al., 2020). Интегрисана анализа говори у прилог томе да је *GPX3* био недовољно експримиран у 22 од 34 испитана узорка туморског ткива, укључујући карцином уротелијума (Wang et al., 2021).

#### Научни и практични значај:

На основу експерименталних података о улози оксидативног стреса у метаболизму аристанохијске киселине, као узрочника БЕН, као и података да су полиморфизми гена за регулаторне и каталитичке антиоксидантне протеине повезани са компликацијама ове болести, може се претпоставити да су ови генетски полиморфизми такође значајни у патогенези самог БЕН и БЕН-удружених тумора уротела. Да би се процијенила њихова улога од великог је научног значаја било спровести свеобухватну генетску студију која би упоредо анализираола дистрибуцију ових полиморфизама код пацијената са ендемског подручја и здравих особа из ендемских региона Републике Српске. Од посебног је интереса испитивање полиморфизама у генима који кодирају регулаторне и каталитичке антиоксидантне протеине (*KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1*, *GPX3* и *MDR1*), узевши у обзир комплексну биоактивацију аристанохијске киселине, која доводи до оксидативног стреса у БЕН. Такође, и полиморфизми у *MDR1* гену који кодира транспортер П-гликопоротеин су повезани са развојем БЕН, а нису испитивани код пацијената са БЕН у Републици Српској. Стога ова докторска дисертација представља свеобухвату студију у којој је, по први пут, одређивана дистрибуција генских алела наведених полиморфизама. Све ово би могло да допринесе и употпуни досадашња сазнања о значају оксидативног стреса у настанку БЕН и тумора уротелијума. Узевши у обзир и појаву сличних болести на другим континентима, као што је аристанохијска нефропатија у Кини, ово истраживање могло би да допринесе утврђивању постојања одређених генетских специфичности наше популације у генима који кодирају *KEAP1*, *Nrf2*, *GSTP1*, *GPX3* и *MDR1* у односу на друге популације у Европи и свијету. Показана значајна повезаност варијантног *GPX3*\**T/C*\**C/C* генотипа, који карактерише смањена експресија *GPX3*, са ризиком за појаву карцинома горњег уротелијума код болесника са БЕН указују на потенцијалну могућност коришћења полиморфизма *GPX3* гена као биомаркера ризика за настанак ових тумора у популацији болесника са БЕН. Стога, пацијенте са БЕН који носе варијантне облике *GPX3* гена треба чешће пратити у циљу ранијег откривања болести и препознавању пацијената који имају већи ризик за појаву уротелног тумора.

## 7. ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

Докторска дисертација кандидаткиње др Жане Радић Савић насловљена „Испитивање повезаности полиморфизама гена за регулаторне и каталитичке антиоксидантне протеине са ризиком за настанак Балканске ендемске нефропатије“ представља самостално истраживање и дјело које је израђено на основу одобрене дефинисане теме.

Урађена докторска дисертација је научно заснована и урађена према свим принципима научног истраживања. Циљеви ове дисертације су прецизно дефинисани, научни приступ је био оригиналан и пажљиво биран, а примјењене молекуларне методе су савремене, прикладне и усаглашене са актуелном научноистраживачком праксом у наведеној области.

Ради се о оригиналном научноистраживачком раду, које даје значајан допринос у расвјетљавању етиологије ендемске нефропатије и разумијевању улоге полиморфизама гена за антиоксидантне регулаторне (Nrf2) и каталитичке протеине (KEAP1, GSTP1, GPX3 и MDR1) у настанку БЕН и БЕН-удружених тумора уротелијума. По својој свеобухватности, добијеним резултатима и изнијетим закључцима представља оригиналан допринос медицинској научној мисли и сагледавању улоге оксидативног стреса у ендемској нефропатији и удруженим туморима горњег уротелијума. Поред тога, велики научни допринос ове докторске дисертације је у томе што представља прво и једино истраживање о повезаности полиморфизама за антиоксидантне ензиме код болесника са Балканком ендемском нефропатијом на територији Републике Српске.

Резултати спроведеног истраживања представљени су у складу са постављеним циљевима, прегледно и систематично, уз разумљив и логично организован текст и адекватне табеларне и графичке приказе. У резултатима су, по први пут, показане последице смањене антиоксидантне одбране код пацијента са овом болести. Наиме, резултати ове дисертације говоре у прилог тога да особе женског пола са мањим капацитетом антиоксидантне заштите имају већи ризик за појаву БЕН, у односу на особе мушког пола. Стога би употреба појединих испитиваних полиморфизама као потенцијалних биомаркера ризика за БЕН била корисна у популацији жена са ендемских подручја. Додатно, показана повезаности између полиморфизама наведених гена и тумора горњег уротелијума на терену БЕН би омогућила препознавање пацијената које треба чешће пратити у циљу препознавања пацијената који имају већи ризик за развој уротелног тумора, и ранијег откривања болести што би допринијело бољем исходу пацијената са тумором на терену БЕН. Добијени резултати, уз сва наведена ограничења, представљају добру основу за будућа истраживања ове болести.

Кандидаткиња је објавила један научни рад (M22) из дисертације и доставила неопходне пратеће доказе дефинисане чланом 15. Правилника студирања на II и III циклусу студија. Докторска дисертација кандидаткиње др Жане Радић Савић, у складу са чланом 3. Правилника о поступку провјере оригиналности завршних радова студената II и III циклуса студија Универзитета у Бањој Луци, прошла је провјеру оригиналности докторске дисертације (са 2% потврђених извора), те се, уважавајући горе образложени научни допринос може сматрати оригиналним научним дјелом, урађеним самостално са примјеном адекватне методологије научноистраживачког рада.

На основу свега наведеног и имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, Комисија је мишљења да докторска дисертација кандидаткиње др Жане Радић Савић задовољава све критеријуме успјешно урађене докторске дисертације, и

*Предлаже*

Научно-наставном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци да усвоји извјештај и прихвати позитивну оцјену докторске дисертације др Жане Радић Савић под насловом "ИСПИТИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ПОЛИМОРФИЗАМА ГЕНА ЗА РЕГУЛАТОРНЕ И КАТАЛИТИЧКЕ АНТИОКСИДАНТНЕ ПРОТЕИНЕ СА РИЗИКОМ ЗА НАСТАНАК БАЛКАНСКЕ ЕНДЕМСКЕ НЕФРОПАТИЈЕ" и омогући јавну одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

Бања Лука, Београд  
10.01.2024.

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

Проф. др Ранко Шкрбић, редовни професор,  
ужа научна област Фармакологија и  
токсикологија, Медицински факултет  
Универзитета у Бањој Луци; Члан

Проф. др Радослав Гајанин, редовни професор,  
ужа научна област Патологија, Медицински  
факултет Универзитета у Бањој Луци; Члан

Доц. др Весна Торић, доцент, ужа научна  
област Медицинска и клиничка биохемија,  
Медицински факултет Универзитета у  
Београду; Члан

Доц. др Вања Видовић, доцент, ужа научна  
област Хумана генетика, Медицински факултет  
Универзитета у Бањој Луци; Члан

ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије дужан је да у извјештај унесе образложење, односно разлоге због којих не жели да



потпише извјештај.

---

У прилогу Извјештаја доставити:

1. Одлуку о прихватању извјештаја Комисије за оцјену подобности студента, теме и ментора за израду докторске дисертације;
2. Одлуку о именовану Комисије за оцјену урађене докторске дисертације;
3. Доказе о подобности чланова Комисије за оцјену урађене докторске дисертације (радови и пратећи докази из члана 16. Правила студирања на ИИИ циклусу студија за студије започете закључно са академском годином 2021/2022, односно докази из члана 35. Правила студирања на трећем циклусу студија за студије започете од академске 2022/2023. године); и
4. Доказе о подобности кандидата (радови и пратећи докази из члана 15. Правила студирања на ИИИ циклусу студија за студије започете закључно са академском годином 2021/2022, односно докази из члана 34. Правила студирања на трећем циклусу студија за студије започете од академске 2022/2023. године).