

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 20.05. 2021. godine, odlukom broj 9700/14-ЂJ imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom: „**Povezanost polimorfizama *Nrf2*, *SOD2* i *GPX1* gena sa pokazateljima oksidativnog distresa i prognozom bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću**“ („**Association of *Nrf2*, *SOD2* and *GPX1* gene polymorphisms with markers of oxidative stress and prognosis in patients with end stage renal disease**”), kandidata dr Đurđe Jerotić zaposlene na Medicinskom fakultetu u Beogradu na mestu asistenta na Katedri za medicinsku i kliničku biohemiju. Mentor ove teze je prof. dr Marija Matić, a komentor prof. Lana McClements.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Profesor dr Tatjana Simić, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu, dopisni član SANU
2. Profesor dr Ana Savić-Radojević, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
3. Docent dr Sonja Šuvakov, docent Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
4. Profesor dr Nada Dimković, redovni profesor (u penziji) Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
5. Profesor dr Gordana Kocić, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Nišu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, Komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Đurđe Jerotić je napisana na engleskom jeziku na 119 strana i podeljena u poglavlja: uvod, ciljevi, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 41 slika i 23 tabele. Doktorska disertacija sadrži sažetak na engleskom i srpskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji, jedan prilog i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **Uvodu** je opisana hronična bubrežna slabost sa detaljnijim osvrtom na terminalnu bubrežnu slabost. Dati su najnoviji epidemiološki podaci i definisani potencijalni faktori rizika značajni za nastanak ovog oboljenja, kao i dijagnostički i terapijski pristup bolesti. Detaljno je opisana veza terminalne bubrežne slabosti sa oksidativnim stresom: opisani su mehanizmi stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) u terminalnoj bubrežnoj slabosti i uticaj uremijskih toksina i hemodijalize na nastanak ROS. Definisana je struktura i funkcija regulatornih i katalitičkih antioksidantnih proteina, Nrf2, superoksid dizmutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPX) i njihova povezanost sa hroničnom bubrežnom slabošću. Posebna pažnja posvećena je genskim varijacijama *Nrf2*, *SOD2* i *GPX1* gena i njihovoj udruženosti sa hroničnom bubrežnom slabošću. Uzimajući u obzir da su kardiovaskularne komplikacije odgovorne za više od polovine smrtnih slučajeva bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću, opisani su molekularni mehanizmi nastanka ovih komplikacija u terminalnoj bubrežnoj slabosti, a posebna pažnja posvećena je endotelnoj disfunkciji koja se nalazi u osnovi ovih komplikacija. Pored toga, opisan je uticaj delecionog polimorfizma glutation S-transferaze M1 (*GSTM1*) gena na nastanak kardiovaskularnih komplikacija i kardiovaskularni mortalitet bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću. Ustanovljeno je da u literaturi nema podataka o povezanosti polimorfizama *Nrf2*, *SOD2* i *GPX1* gena sa rizikom za nastanak terminalne bubrežne slabosti, oksidativnim fenotipom i njihovom potencijalnom prognostičkom značaju kod bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću, kao ni podataka o ulozi *GSTM1* u podložnosti za razvoj endotelne disfunkcije u uremijskim uslovima.

Ciljevi rada su precizno definisani. Prvi cilj bio je da se ispita uticaj polimorfizama *Nrf2* (rs6721961), *SOD2* (rs4880) i *GPX1* (rs1050450) gena na podložnost za nastanak terminalne bubrežne slabosti, kao i da li postoji udruženi efekat genotipa na razvoj ovog oboljenja. Drugi cilj je bio da se analizira veza između polimorfizama *Nrf2*, *SOD2* i *GPX1* gena i produkata oksidativnog oštećenja proteina i lipida, kao i solubilnih ćelijskih adhezionih molekula u plazmi bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću. Pored toga, cilj rada bio je da se ispita uticaj polimorfizama gena za *Nrf2*, *SOD2* i *GPX1*, zajedno sa *GSTM1* delecionim polimorfizmom, na osmogodišnje ukupno i kardiovaskularno preživljavanje bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću. Kao naredni cilj rada postavljeno je ispitivanje povezanosti pokazatelja oksidativnog stresa i adhezionih molekula u kombinaciji sa *GSTM1* delecionim polimorfizmom sa osmogodišnjim ukupnim i kardiovaskularnim preživljavanjem bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću. Na kraju, poslednji cilj rada bio je da se ispita da li utišavanje gena za *GSTM1* ima uticaja na relativnu

ekspresiju pojedinih citokina i pokazatelje oksidativnog stresa u kulturi endotelnih ćelija inkubiranih u uremijskom serumu.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je za ispitivanje uticaja polimorfizama *Nrf2*, *SOD2* i *GPXI* gena na podložnost za razvoj terminalne bubrežne slabosti (TBS) izvedena studija slučajeva i kontrola (engl. *case-control study*) u koju je bilo uključeno 256 bolesnika sa TBS koji se leče ponavljanim dijalizama na KBC Zvezdara, KBC Zemun i u Specijalnoj bolnici za endemsku nefropatiju Lazarevac, kao i 374 ispitanika kontrolne grupe koji su u istom periodu primljeni zbog nefrolitijaze ili rutinskog sistematskog pregleda na Kliniku za urologiju Kliničkog centra Srbije. Studija je izvedena u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji i u skladu sa pravilima Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Za procenu uticaja polimorfizama *Nrf2*, *SOD2* i *GPXI* gena na nivo pokazatelja oksidativnog stresa kod bolesnika sa TBS, izvedena je studija slučajeva (engl. *case-only study*). Studija slučajeva je bila izvedena i za ispitivanje prognostičkog značaja polimorfizama *Nrf2*, *SOD2*, *GPXI* i *GSTM1* gena kao i prognostičkog značaja pokazatelja oksidativnog stresa i adhezivnih molekula na preživljavanje ovih bolesnika. Za ispitivanje uticaja utišavanja *GSTM1* gena i uremijskog seruma na endotelnu disfunkciju izvedena je *in vitro* studija na kulturi humanih endotelnih ćelija pupčane vrpce (engl. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVECs).

U ovom delu disertacije detaljno je opisana metodologija ispitivanja koja podrazumeva određivanje polimorfizama *Nrf2*, *SOD2*, *GPXI* i *GSTM1* gena analizom reakcije lančanog umnožavanja (engl. *polymerase chain reaction*, *PCR*). Većina pokazatelja oksidativnog oštećenja lipida i proteina, kao i aktivnost antioksidativnih enzima u plazmi bolesnika sa TBS određeni su spektrofotometrijski: koncentracija proteinskih tiol grupa, naprednih produkata proteinske oksidacije (engl. *advanced oxidation protein products AOPP*), malondialdehida (MDA), prooksidantni - antioksidantni balans (PAB) i totalni oksidativni status (TOS). Koncentracija karbonilnih grupa, nitrotirozina i sadržaj MDA adukata, kao i koncentracija solubilnih ćelijskih adhezivnih molekula (sICAM-1 i sVCAM-1) u plazmi bolesnika na dijalizi određeni su ELISA metodom. *In vitro* deo ove studije sproveden je na *GSTM1*^{+/+} HUVEC ćelijama i HUVEC ćelijama utišanim za *GSTM1* gen (*GSTM1*^{-/-}) pomoću *GSTM1* siRNK koje su tretirane 30% kontrolnim ili uremijskim serumom. U HUVEC ćelijama su analizirani pokazatelji oksidativnog stresa: ukupan ROS, koncentracija MDA i aktivnosti SOD i GPX enzima. Metodom proteome je određena ekspresija 105 citokina u HUVEC ćelijama. Ekspresija ICAM-1 i VCAM-1 proteina analizirana je dodatno metodom imunoblota.

Rizik za nastanak TBS procenjivan je logističkom regresionom analizom, na osnovu veličine i značajnosti odnosa šansi (engl. *odds ratio*, OR) sa intervalom poverenja od 95% (IP 95%). Za procenu značajnosti razlike u sadržaju markera oksidativnog oštećenja u plazmi bolesnika na dijalizi u odnosu na ispitivane genotipove, korišćen je Student-ov T test i Mann–Whitney U-test, odnosno ANOVA test i Kruskal–Wallis test. Prognostički značaj polimorfizama kod bolesnika na dijalizi je analiziran pomoću engl. *Time to event* analize. Prediktivna vrednost parametara oksidativnog stresa, solubilnih adhezivnih molekula i *GSTM1* genotipa je procenjen Cox regresionom analizom, dok je Kaplan-Meier metod korišćen za utvrđivanje razlika u preživljavanju.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Ova studija je pokazala da su osobe nosioci *SOD2 Val/Val* genotipa imale veću podložnost za razvoj TBS. Takođe, pokazano je da postoji udruženi efekat genotipova: kombinacija *SOD2 Val/Val / GPX1 Leu/Leu* genotipa i *SOD2 Val/Val / Nrf2 C/C* genotipa je udružena sa povećanjem rizika za nastanak TBS. Bolesnici nosioci *SOD2* alela niže aktivnosti (*SOD2 Val*) imali su i povišene nivoe produkata oksidativnog oštećenja lipida i proteina. Ukupno preživljavanje bolesnika sa TBS zavisilo je od kombinacije *Nrf2 C/C* i *GPX1 Leu/Leu* genotipova, pored starosti pacijenata i *GSTM1* polimorfizma. Takođe, *GPX1 Leu/Leu* genotip je doprineo dužem kardiovaskularnom preživljavanju. Pokazatelji oksidativnog stresa (AOPP, PAB, MDA) i ćelijski adhezivni molekuli (sVCAM-1 i sICAM-1) imali su prognostički značaj u pogledu ukupnog i kardiovaskularnog preživljavanja. Značajno smanjeno opšte i kardiovaskularno preživljavanje je uočeno kod bolesnika sa visokim skorovima panela koji se sastojao od kombinacije šest biomarkera (*GSTM1* genotip, visok AOPP/PAB/MDA/sVCAM-1/sICAM-1). HUVEC ćelije tretirane uremijskim serumom imale su smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima praćenu povećanom lipidnom peroksidacijom, nezavisno od utišavanja *GSTM1* gena. Tretman HUVEC ćelija doveo je do promena u ekspresiji niza inflamatornih citokina, uključujući retinol-vezujući protein 4 (RB4), RANTES, C-reaktivnog protein (CRP), angiogenin, Dkk-1 i trombocitni faktor 4 (PF4). Utišavanje *GSTM1* gena u HUVEC ćelijama je dovelo do ushodne regulacije monocitnog hemoatraktantnog proteina-1 (MCP-1) i ICAM-1.

Bibliografija sadrži listu od 316 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Proverom originalnosti doktorske disertacije korišćenjem programa iThenticate, utvrđen je stepen podudarnosti koji iznosi 44%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je u najvećoj meri (16%) publikovanih rezultata u 3 rada M21 kategorije koji su proistekli iz kandidatove doktorske disertacije. Razlozi za 1% i manje od 1% podudaranja teksta su: opšta mesta, citati, lična imena i bibliografski podaci o korišćenoj literaturi, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

C) Kratak opis postignutih rezultata

Povećana podložnost oboljevanju od TBS uočena je kod osoba sa *SOD2 Val/Val* genotipom (OR=2,01; 95%CI=1,28-3,16; p=0,002). Kombinovanjem *SOD2 Val/Val* i *GPXI Leu/Leu* genotipova ovaj rizik se dodatno povećava (OR=3,27; 95%CI=1,21-8,82; p=0,019). Polimorfizam gena za *SOD2* je imao uticaja na nivo pokazatelja oksidativnog distresa kod bolesnika sa TBS. Osobe nosioci *SOD2* genotipa smanjene aktivnosti (*SOD2 Val/Val*) imale su nižu koncentraciju tiol grupa (p=0,049) i višu koncentraciju karbonilnih grupa (p=0,037), MDA (p=0,036) i MDAadd (p=0,046) i PAB (p=0,044) u plazmi u odnosu na osobe koje su nosioci makar jednog *SOD2* alela veće aktivnosti (*SOD2 Ala*). Ispitivanje prediktivne uloge polimorfizama *Nrf2*, *SOD2*, *GPXI* i *GSTM1* gena je pokazalo da kombinacija *Nrf2 C/C* i *GPXI Leu/Leu* genotipova, pored starosti pacijenata i *GSTM1* polimorfizma utiče na duže ukupno preživljavanje, dok *GPXI Leu/Leu* genotip doprinosi dužem kardiovaskularnom preživljavanju. Pokazatelji oksidativnog distresa (AOPP, PAB, MDA) i ćelijski adhezioni molekuli (sVCAM-1 i sICAM-1) imali su takođe prognostički značaj u pogledu ukupnog i kardiovaskularnog preživljavanja nakon 8 godina praćenja. Bolesnici koji su imali vrednosti AOPP iznad 60,9 $\mu\text{mol/l}$ bili su pod većim rizikom od smrtnog ishoda kardiovaskularnog porekla (HR=1,9; 95%CI=1,1-3,4; p=0,024). Vrednosti PAB u plazmi TBS bolesnika iznad 130.76 HK jedinica imale su prognostički značaj na opšte (HR=1,9; 95%CI=1,3-2,8; p=0,002) i kardiovaskularno (HR=2; 95%CI=1,2-3,6; p=0,014) preživljavanje. Takođe, vrednosti sVCAM-1 iznad 644.09 ng/ml imale su prognostički značaj na opšte (HR=1,7; 95%CI=1,1-2,5; p=0,013) i kardiovaskularno (HR=2,1; 95%CI=1,1-3,8; p=0,017) preživljavanje, dok su vrednosti sICAM-1 iznad 77,56 ng/ml bile udružene sa većim rizikom od smrtnog ishoda kardiovaskularnog porekla (HR=1,8; 95%CI=1,1-3,1; p=0,033). Značajno smanjeno opšte (log-rank 22,430, p<0,001) i kardiovaskularno (log-rank 21,133, p<0,001)

preživljavanje je uočeno kod bolesnika sa visokim skorovima panela koji se sastojao od kombinacije šest biomarkera (*GSTM1* genotip, visok AOPP/PAB/MDA/sVCAM-1/sICAM-1). Inkubacija HUVEC ćelija u uremijskom serumu dovela je do pada aktivnosti antioksidantnih enzima SOD i GPX ($p < 0,05$) i povećanja nivoa MDA ($p < 0,05$) u odnosu na ćelije inkubirane u kontrolnom serumu. Tretman HUVEC ćelija uremijskim serumom doveo je do promena u ekspresiji niza inflamatornih citokina: nivoi retinol-vezujućeg proteina 4 (RBP4), RANTES, C-reaktivnog proteina (CRP) i angiogenina su bili povišeni, dok su nivoi Dkk-1 i trombocitnog faktora 4 (PF4) bili sniženi u odnosu na HUVEC ćelije inkubirane u kontrolnom serumu. Utišavanje *GSTM1* gena u HUVEC ćelijama je dovelo do ušhodne regulacije monocitnog hemoatraktantnog proteina-1 (MCP-1) i ICAM-1.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Podaci iz literature koji se odnose na značaj polimorfizama gena za *Nrf2*, *SOD2* i *GPXI* u terminalnoj bubrežnoj slabosti su vrlo oskudni. Ovo je prvo istraživanje koje se bavilo ispitivanjem uticaja polimorfizama gena za *Nrf2*, *SOD2* i *GPXI* na podložnost za nastanak TBS u evropskoj beloj populaciji. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da da *SOD2 Val/Val* genotip ima uticaja na povećanu podložnost za razvoj TBS. Iako uticaj *SOD2* polimorfizma na rizik za nastanak TBS do sada nije ispitivan, nekoliko studija je pokazalo povezanost između *SOD2* polimorfizma i povećanog rizika od nastanka dijabetične nefropatije kod osoba obolelih od dijabetesa tipa 1 i 2 (*Möllsten et al. 2009; Mohammedi et al. 2014*). Takođe, studija Crawford i sar. je pokazala povezanost varijantnog, *Val* alela sa bržim padom GFR, ukazujući na bržu progresiju HBS kod ovih bolesnika (*Crawford et al. 2011*). Uticaj *Nrf2* polimorfizma na rizik za nastanak TBS je do sada ispitan samo u jednoj studiji na kineskoj populaciji, u kojoj nije pokazana značajna povezanost *Nrf2* sa razvojem TBS (*Shimoyama et al. 2014*). Uticaj *GPXI* polimorfizma je dovođen u vezu sa rizikom i progresijom HBS. U studiji Crawford i sar. znatno više bolesnika sa HBS imalo je *GPXI Leu/Leu* genotip u poređenju sa kontrolama (*Crawford et al. 2012*). Ista studija je pokazala da je *Leu/Leu* genotip povezan sa padom jačine glomerulske filtracije kod pacijenata sa HBS. Sa druge strane, postoji nekoliko studija u kojima nije bio pokazan pojedinačni uticaj ovog polimorfizma na podložnost za nastanak HBS (*Corredor et al. 2020; Crawford et al. 2011; Chao et al. 2016*), iako se njegov uticaj pokazao značajnim u kombinaciji sa polimorfizmima drugih gena, kao što je *PPAR-γ* (*Chao et al. 2016*). Rezultati ove doktorske disertacije su takođe pokazali odsustvo pojedinačnog uticaja *GPXI* polimorfizma na podložnost za

nastanak TBS, dok je u kombinaciji sa polimorfizmom *SOD2* gena doveo do povećanja podložnosti za nastanak TBS.

U literaturi nema podataka o povezanosti *Nrf2* polimorfizma, kao ni polimorfizama enzima uključenih u primarnu odbranu od slobodnih radikala (SOD i GPX) i stepena oksidativnog oštećenja lipida i proteina kod bolesnika na hemodijalizi. Prema rezultatima koji su predstavljeni u ovoj studiji, bolesnici nosioci *SOD2* alela niže aktivnosti (*SOD2 Val*) imali su povišene nivoe produkata oksidativnog oštećenja lipida i proteina. Jedina studija koja je do sada ispitivala povezanost *SOD2* polimorfizma i produkata oksidativnog oštećenja proteina u bolesti bubrega je studija Mohammedi i sar. Rezultati ove studije su pokazali da je *SOD2 Val/Val* genotip povezan sa visokom koncentracijom AOPP i niskom aktivnošću SOD enzima kod pacijenata sa dijabetičnom nefropatijom (Mohammedi et al. 2014).

Iako je pokazano da je visok nivo oksidativnog stresa i inflamacije kod bolesnika na dijalizi povezan sa kraćim životnim vekom, kao i povećanim kardiovaskularnim morbiditetom i mortalitetom, u literaturi nema podataka o povezanosti polimorfizama gena antioksidativnih enzima sa ukupnim i kardiovaskularnim preživljavanjem ovih bolesnika. Nedavno istraživanje Šuvakov i sar. je pokazalo da bolesnici na dijalizi, nosioci *GSTM1-nultog* genotipa, imaju imaju značajno veći ukupni i kardiovaskularni mortalitet tokom petogodišnjeg praćenja, u odnosu na bolesnike sa prisutnim makar jednim alelom *GSTM1* gena (Šuvakov 2016). *GSTM1* gen je jedan od *Nrf2* regulisanih gena koji je uključen u procese eliminacije ksenobiotika i antioksidativne zaštite. U ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je povezanost polimorfizama gena za *Nrf2*, *SOD2* i *GPX1*, zajedno sa *GSTM1* delecionim polimorfizmom, sa osmogodišnjim ukupnim i kardiovaskularnim preživljavanjem bolesnika sa TBS. Rezultati predstavljeni u ovoj tezi su pokazali da *GSTM1* polimorfizam ima značajan uticaj na prognozu bolesnika sa TBS čak i nakon osmogodišnjeg praćenja. Zanimljivo, pokazano je da nosioci *GPX1* genotipa niže aktivnosti (*GPX1 Leu/Leu*) imaju duže ukupno i kardiovaskularno preživljavanje. Iako ima studija koje sugerišu nepovoljan uticaj *GPX1 Leu* alela na podložnost za nastanak kardiovaskularnih bolesti, poput koronarne bolesti srca, kalcifikacije koronarnih arterija i povećane debljine intime i medije (Lubos, Loscalzo, and Handy 2011), postoje podaci koji suprotno tome pokazuju da *Leu* alel može biti protektivan (Soerensen et al. 2009; Kato et al. 2008). U ovoj tezi pokazano je i da *Nrf2 C/C* genotip ima uticaja na duže preživljavanje u kombinaciji sa *GPX1 Leu/Leu* genotipom. Ipak, nije pokazana individualna povezanost ovog polimorfizma sa preživljavanjem bolesnika sa TBS. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Shimoyama i sar. u kojoj polimorfizam *Nrf2* gena nije imao uticaj na ukupno i kardiovaskularno preživljavanje (Shimoyama et al. 2014).

U ovoj tezi ispitivan je i prognostički uticaj produkata oksidativnog stresa (tiol grupe, karbonilne grupe, nitrotirozin, AOPP, MDA, MDA-add, TOS, PAB) i endotelne disfunkcije (sICAM-1, sVCAM-1) na osmogodišnje preživljavanje bolesnika sa TBS. Prema rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazatelji oksidativnog stresa (AOPP, PAB, MDA) i ćelijski adhezioni molekuli (sVCAM-1 i sICAM-1) imaju prediktivnu ulogu u smislu preživljavanja opšteg ili kardiovaskularnog porekla. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjem Šuvakov i sar. u kome su ovi parametri bili značajni prediktori petogodišnjeg preživljavanja pacijenata sa TBS (*Suvakov et al., 2016*).

S obzirom na to da je pokazano da bolesnici na hemodijalizi, nosioci *GSTM1-nultog* genotipa, imaju značajno povišen nivo pokazatelja endotelne disfunkcije u plazmi, kao i veći kardiovaskularni mortalitet (*Suvakov et al. 2013*), u poslednjem delu ove doktorske disertacije ispitani su molekularni mehanizmi preko kojih ovaj genotip dovodi do njih u *in vitro* uslovima, korišćenjem kulture endotelnih ćelija izloženim uremijskom serumu. HUVEC ćelije tretirane uremijskim serumom imale su smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima praćenu povećanom lipidnom peroksidacijom, nezavisno od utišavanja *GSTM1* gena. Smanjena ekspresija i/ili aktivnost SOD i GPX antioksidantnih enzima koja je bila udružena sa povećanjem stvaranja ROS i oksidativnim oštećenjem makromolekula u HUVEC ćelijama tretiranim uremijskim serumom ili izolovanim uremijskim toksinima su pokazale i studije drugih istraživača (*Dou et al. 2007; Chen et al. 2018; Monteiro et al. 2019*). Pored toga, tretman HUVEC ćelija uremijskim serumom doveo je do promena u ekspresiji niza inflamatornih citokina uključenih u procese ateroskleroze i arterioskleroze, uključujući retinol-vezujući protein 4 (RB4), RANTES, C-reaktivni protein (CRP), angiogenin, Dkk-1 i trombocitni faktor 4 (PF4). U ovoj tezi je po prvi put pokazano da ekspresija navedenih citokina može biti izmenjena u HUVEC ćelijama pod dejstvom uremijskog seruma. Rezultati doktorske disertacije dr Jerotić po prvi put pokazuju i da utišavanje *GSTM1* gena dovodi do povećane ekspresije MCP-1 i ICAM-1 proteina u HUVEC ćelijama. Naročito je značajno istaći da je ekspresija MCP-1 proteina više nego dvostruko veća u HUVEC ćelijama utišanim za *GSTM1* u odnosu na ćelije koje u potpunosti ekspimiraju *GSTM1*. Podaci dobijeni u ovoj studiji su u skladu sa nedavnim istraživanjem Gigliotti i sar. koji su pokazali da kod *GSTM1 knockout* miševa dolazi do značajnog porasta bubrežne ekspresije MCP-1 (*Gigliotti et al. 2020*). U svetlu značajne uloge koju MCP-1 ima u privlačenju monocita na mesto vaskularnog oštećenja koje je prisutno u uremiji, moguće je pretpostaviti da nedostatak *GSTM1* kod osoba sa *GSTM1-nultim* genotipom ima za posledicu pojačanu ekspresiju MCP-1 i na taj način doprinosi povećanom kardiovaskularnom morbiditetu kod osoba sa TBS.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije:

1. **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, Simic T. Association of *Nrf2*, *SOD2* and *GPX1* Polymorphisms with Biomarkers of Oxidative Distress and Survival in End-Stage Renal Disease Patients. **Toxins**. 2019;11(7):431. M21, IF=3,895
2. 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 V.D, Albright R.C, Simic T. Markers of Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction Predict Haemodialysis Patients Survival. **Am J Nephrol**. 2019;1–11. M21, IF= 3,411
3. **Jerotic D**, Suvakov S, Matic M, Alqudah A, Grieve DJ, Pljesa-Ercegovac M, Savic Radojevic A, Damjanovic T, Dimkovic N, McClements L, Simic T. GSTM1 Modulates Expression of Endothelial Adhesion Molecules in Uremic Milieu. **Oxid Med Cell Longev**. 2021;2021. M21, IF=5,076
4. **Jerotic D**, Matic M, McClements L. The importance of polymorphisms of regulatory and catalytic antioxidant proteins in chronic kidney disease. **Medicinski Podmladak**. 2021; 72(1):25-33. M52

*equal contribution

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Povezanost polimorfizama *Nrf2*, *SOD2* i *GPX1* gena sa pokazateljima oksidativnog distresa i prognozom bolesnika sa terminalnom bubrežnom slabošću**” („**Association of *Nrf2*, *SOD2* and *GPX1* gene polymorphisms with markers of oxidative stress and prognosis in patients with end stage renal disease**”) kandidata dr Đurđe Jerotić, predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uloge polimorfizama gena za antioksidantne regulatorne (*Nrf2*) i katalitičke proteine (*SOD2* i *GPX1*) u proceni podložnosti za razvoj terminalne bubrežne slabosti, kao i njihove uloge u proceni prognoze ovih bolesnika. Po prvi put su ispitivane i posledice nedostatka GSTM1 proteina na proces ubrzane ateroskleroze u uremiji korišćenjem kulture endotelnih ćelija. Pored patofiziološkog, ovo istraživanje ima i dodatni značaj u smislu otkrivanja ekspresije potencijalnih biomarkera endotelnih ćelija u uslovima izloženosti uremijskom serumu. Utvrđivanje povezanosti između

polimorfizama navedenih gena i pojave kardiovaskularnih komplikacija bi omogućilo potencijalnu primenu multimarker panela u ranom prepoznavanju bolesnika koji su kandidati za odgovarajuću terapijsku intervenciju.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Đurđe Jerotić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 11. 6. 2021. god.

Članovi komisije:

Prof. dr Tatjana Simić

Prof. dr Ana Savić-Radojević

Doc. dr Sonja Šuvakov

Prof. dr Nada Dimković

Prof. dr Gordana Kocić

Mentor:

Prof. dr Marija Matić

Komentor:

Prof. Lana McClements
