

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03.11. 2014. godine, broj 4600/11, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Zna aj genetskog polimorfizma glutation transferaza u nastanku Balkanske endemske nefropatije“**

kandidata mr sci. dr Zorice Relji , zaposlene Medicinskoj laboratoriji “PAN lab” kao specijalista klini ke biohemije. Mentor je prof. dr Tatjana Simi , a komentor je nau ni savetnik Dejan Opsenica.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Tatjana Pekmezovi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Ana Savi Radojevi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Doc. dr Mario Zlatovi , profesor Hemijskog fakulteta u Beogradu
4. Prof. dr Jasmina Mimi -Oka, profesor u penziji
5. Prof. dr Ljubica ukanovi , profesor u penziji

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicnskog fakulteta slede i

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci. dr Zorice Relji napisana je na 92 kucane strane i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. Rad sadrži ukupno 38 priloga i to: 13 tabela, 12 grafikona i 13 slike. Na kraju disertacije dat je pregled citirane literature u vidu 156 literaturna podatka.

**Uvod** je podeljen u pet logi kih celina. U prvom delu uvoda su dati definicija i epidemiloški podaci o zastupljenosti Balkanske endemske nefropatije (BEN), kao i aktuelne hipoteze o mogu em uzroku endemske nefropatije, sa posebnim osvrtom na hipotezu o ohratoksinu A (OTA). U drugom delu opisan je proces detoksikacije u kojima u estvuju citosolne glutation transferaze (GST). U ovom delu data je i klasifikacija familije citosolnih glutation transferaza. Tre i deo uvoda detaljno obra uje polimorfizme jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphisms, SNPs*), polimorfizme dužina restrikcionih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphisms, RFLPs*) i delecione polimorfizme, sa osvrtom na ulogu interakcija izme u genetskih polimorfizama i faktora rizika u nastanku brojnih multifaktorijalnih bolesti savremenog oveka. U etvrtom delu uvoda su detaljno opisani do sada poznati genetski polimorfizmi glutation transferaza klasa alfa (*GSTAI*), mi (*GSTMI*), teta (*GSTTI*) i pi (*GSTPI*). U ovom delu posebna pažnja je posve ena saznanjima o ulozi alela *GSTAI*, *GSTMI*, *GSTTI* i *GSTPI* u nastanku brojnih bolesti. U poslednjem delu uvoda, analizom publikovanih klini kih studija, obra ena su dosadašnja saznanja o ulozi genetskog polimorfizma *GST* u nastanku endemske nefropatije i udruženih tumora urotelijuma.

Da bi se odredio zna aj polimorfizma gena za glutation transferaze kao modulatora individualne osetljivosti za nastanak Balkanske endemske nefropatije i indirektno ukazalo na potencijalni uzrok BEN u našem podru ju, dr Zorica Relji je postavila slede e **ciljeve rada**:

- ustanoviti distribuciju genetskih polimorfizama *GSTAI*, *GSTMI*, *GSTTI* i *GSTPI* kod bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom i pripadnika odgovarajuće kontrolne grupe;
- ispitati da li je prisustvo određenog genotipa glutation transferaza, nezavisno ili u kombinaciji sa drugim genotipovima glutation transferaza, udruženo sa povećanim rizikom za nastanak i prognozu Balkanske endemske nefropatije;
- ispitati da li je prisustvo određenog genotipa glutation transferaza, nezavisno ili u kombinaciji sa drugim genotipovima glutation transferaza, udruženo sa povećanim rizikom za nastanak tumora urotelijuma u bolesnika sa Balkanskom endemskom nefropatijom.

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno je opisano istraživanje, odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu (Odluka broj 29/VI-13). Sprovedena je studija slučajeva i kontrola, u koju je bilo uključeno 207 bolesnika sa dijagnozom Balkanske endemske nefropatije sa područja Bijeljine, Šamca i Lazarevca. Uzorci DNK, koji su korišćeni u analizama, izolovani se iz pune krvi dobijene venepunkcijom tokom rutinskog laboratorijskog praćenja pacijenata. Kontrolnu grupu činilo je 138 ispitanika, stanovnika endemskih područja sa negativnom porodičnom anamnezom za BEN. Ispitanici kontrolne grupe su uključeni u studiju u toku sistematskih pregleda odraslih stanovnika endemskih sela istih endemskih regiona, koji su sprovedeni od januara do decembra 2012. godine, u cilju ranog otkrivanja BEN i drugih hroničnih bolesti bubrega. Jasno su definisani kriterijumi uključivanja i isključivanja pacijenata u studiju. Za prikupljanje podataka o izloženosti pretpostavljenim faktorima rizika sredine za nastanak Balkanske endemske nefropatije, korišćen je strukturisani epidemiološki upitnik, napravljen u Institutu za epidemiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Metode za određivanje genetskog polimorfizma GST su detaljno i jasno opisane. Delecioni polimorfizmi *GSTMI* i *GSTTI* gena određivani su multipleks reakcijom lančanog

umnožavanja. Polimorfizmi jednog nukleotida *GSTAI C-69T* i *GSTPI A1578G (Ile105Val)* određeni su analizom polimorfizma dužina restrikcionih fragmenata DNK. Tako e su detaljno opisane sve koriš ene metode deskriptivne i analiti ke statistike, a kao granica statisti ke zna ajnosti, uzeto je  $p < 0.05$ .

U poglavlju **Rezultati** detaljno su izneti i veoma jasno, tabelarno i grafi ki, predstavljeni svi dobijeni rezultati.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno. Dobijeni rezultati su detaljno analizirani i upore eni sa relevantnim podacima iz literature. Svi rezultati su veoma pažljivo interpretirani, uz prepoznavanje ograni enja studije.

**Zaklju ci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada i diskusije.

Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 156 primerene i aktuelne reference.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Svojim istraživanjem, dr Zorica Relji je pokazala udruženost polimorfizma *GSTAI* sa rizikom za nastanak endemske nefropatije. Naime, za ispitanike koji su nosioci bar jednog varijantnog *T* alela *GSTAI* je pokazano da imaju 1,6 puta ve i rizik za nastanak BEN od osoba sa *GSTAI CC* genotipom. Na zna aj genetskog polimorfizma *GSTAI* u nastanku BEN ukazuju i drugi rezultati ovog istraživanja. Naime, ukoliko je prisustvo varijantnog *GST T* alela bilo udruženo sa *GSTPI AA* genotipom niže aktivnosti, rizik za nastanak BEN je bio 2,1 puta ve i u odnosu na osobe nosioce *GSTAI CC* genotipa i *GSTPI GG* genotipa. Najve i rizik za nastanak BEN imale su, me utim, osobe koji su osim *GSTAI CT* ili *GSTAI TT* genotipa imali i deleciju oba *GSTTI* gena (OR = 2,3; CI = 1,0–5,3;  $p = 0,046$ ). Rezultati ove studije nisu pokazali zna ajnu razliku u distribuciji delecionog polimorfizma *GSTM1*, što ukazuje da vrlo verovatno *GSTM1-1* ne u estvuje u metabolizmu jedinjenja odgovornih za nastanak BEN.

Navedeni podaci od velikog su značaja za dalja istraživanja, jer ukazuju na to da su genetski polimorfizmi *GSTAI*, *GSTTI* i *GSTPI* modulatori individualne osetljivosti za nastanak Balkanske endemske nefropatije.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Značaj genetskih polimorfizama *GSTMI*, *GSTTI*, *GSTPI* u proceni rizika za nastanak Balkanske endemske nefropatije, je ispitivan u svega nekoliko studija (*Andonova i sar., 2004*; *Toncheva i sar., 2004*), dok o ispitivanju distribucije *GSTAI* genotipa u literaturi ne postoje podaci. Iz dosadašnjih saznanja o katalitičkoj aktivnosti GSTA1-1 i nefrotoksičnosti ohratoksina A, mogu se pretpostaviti dva moguća mehanizma nastanka oštećenja bubrežnog tkiva u endemskoj nefropatiji kojima polimorfizam *GSTAI* doprinosi: (1) smanjena konjugacija sa glutationom kod osoba sa *GSTAI TT* genotipom i (2) pro-oksidativno dejstvo slobodnih radikala nastalih u metabolizmu OTA zbog smanjene antioksidantne aktivnosti GSTA1-1.

U prilog pretpostavke o smanjenoj konjugaciji sa glutationom govore podaci o prisustvu konjugata OTA i ohratoksina A-hidrohinona (OTHQ) u krvi i urinu obolelih od endemske nefropatije (*Tozlovanu i sar., 2012*); promiskuitetnoj aktivnosti GSTA1-1 prema supstratima (*Hou i sar., 2007*); *in silico* analizi da konjugati OTA i njegovog metabolita OTHQ sa GSH mogu nastati u aktivnom mestu GSTA1-1 (*Relji i sar., 2014*); kvantitativnoj razlici u ekspresiji i aktivnosti GSTA1-1 usled genetskog polimorfizma (*Coles i sar., 2001a*; *Ping i sar., 2006*). Pored toga, u pro-oksidativnom mehanizmu nefrotoksičnosti OTA, smanjena antioksidantna aktivnost GSTA1-1 bi doprinela toksičnom dejstvu ohratoksina A. Naime, u mnogim istraživanjima je nedvosmisleno pokazano prisustvo oksidativnog stresa u metabolizmu OTA (*Rahimtula i sar., 1988*; *Meki i Hussein, 2001*; *Palabiyik i sar., 2013*). Prema tome, logična je pretpostavka da je nedostatak antioksidantne aktivnosti GSTA1-1 u uslovima hroničnog izlaganja OTA doprineo većem stepenu oksidativnog stresa u tkivu bubrega.

Dve grupe bugarskih istraživača ispitivale su genetske polimorfizme *GSTMI*, *GSTTI* i *GSTPI* u Balkanskoj endemskoj nefropatiji (Andonova i sar., 2004; Toncheva i sar., 2004). Andonova i saradnici (2004) su sprovedeli istraživanje, koje je imala kontrolnu grupu sa endemskog područja, dok je u studiji istraživačke grupe Toncheve (2004) kontrolna grupa bila sa ne-endemskog područja. I u ovoj studiji, kao i studijama bugarskih istraživača, zastupljenost bolesnika sa *GSTMI* aktivnim genotipom je bila veća u grupi obolelih. Rezultati istraživanja dr Zorice Reljić su, takođe, u saglasnosti sa rezultatima Chen i saradnika (2012), koji su u pokazali da genetske varijante *GSTMI* ne utiču na nastanak nefropatije uzrokovane aristolohinom kiselinom (AAN).

Jedina izvedena epidemiološka studija o polimorfizmu *GSTTI* gena u BEN, nije pokazala značajne razlike u distribuciji uestalosti *GSTTI* genotipova između bolesnika sa BEN i kontrolne grupe (Andonova i sar., 2004). Međutim, rezultati istraživanja dr Reljić, koji su dobijeni na znatno većem broju ispitanika, su pokazali znatno veću zastupljenost *GSTTI* aktivnog genotipa u grupi obolelih. Rezultati dr Reljić su u saglasnosti sa studijom Lebruna i saradnika (2006), o oštećenju DNK u urotelijalnim ćelijama izlaganih ohratoksinu A, koje je bilo već u donora sa *GSTTI* aktivnim genotipom. Ali, uprkos činjenici da *GSTTI* aktivni genotip doprinosi riziku za nastanak BEN, konjugacija OTA sa GSH posredstvom enzima GSTT1-1 je teško izvodljiva zbog nemogućnosti pristupa velikog molekula ohratoksina A aktivnom mestu GSTT1-1 (Shokeer i Mannervik, 2010). Nasuprot ovim rezultatima o genetskom polimorfizmu *GSTTI*, u istraživanju Chen i saradnika (2012) sprovedenoj u populaciji žute rase, pokazano je da je *GSTTI* multi genotip faktor rizika za nastanak AAN. Zbog preovladavajućeg mišljenja da Balkanska endemska nefropatija i AAN predstavljaju jedan entitet, u tumačenju nekonzistentnih rezultata o uticaju genetskih polimorfizama *GST* u različitim rasama treba uzeti u obzir razlike u distribuciji genetskih varijanti *GSTTI* i *GSTAI* među rasama (Nelson i sar., 1995; Garte i sar., 2001; Duell i sar., 2002).

U literaturi, osim istraživanja Andonove i saradnika (2004), ne postoje drugi podaci o ispitivanju polimorfizma *GSTPI* u endemskoj nefropatiji. U istraživanju Andonove i saradnika (2004), rezultati su pokazali manju uestalost *GSTPI* GG genotipa među

bolesnicima sa BEN u odnosu na kontrolnu grupu. Niža zastupljenost *GSTP1 GG* genotipa u bolesnika sa endemskom nefropatijom je dobijena i u ovoj studiji.

#### **D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije**

1. Reljic Z, Zlatovic M, Savic-Radojevic A, Pekmezovic T, Djukanovic L, Matic M, Pljesa-Ercegovac M, Mimic-Oka J, Opsenica D, Simic T. 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 (Basel)*. 2014;6(8):2348-62. doi: 10.3390/toxins6082348.

#### **E) Zaključak (obrazloženje nau nog doprinosa)**

Doktorska disertacija „**Zna aj genetskog polimorfizma glutation transferaza u nastanku Balkanske endemske nefropatije**“ dr Zorice Relji predstavlja originalni nau ni doprinos u razumevanju uticaja polimorfizma gena za glutation transferaze, važne enzime detoksikacije, u nastanku endemske nefropatije. Ovim istraživanjem ukazano je da su polimorfizmi gena za glutation transferaze modulatori individualne osetljivosti za nastanak endemske nefropatije. Šta više, rezultati ove doktorske disertacije bi mogli da pomognu u rasvetljavanju potencijalnog uzroka BEN u našem podru ju. Primena saznanja dobijenih prou avanjem genetskih polimorfizama, faktora rizika i njihovih me usobnih interakcija omogu ila bi prepoznavanje osoba sa pove anim rizikom za nastanak endemske nefropatije.

Ova doktorska disertacija je ura ena prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, nau ni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom vešću u Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Zorice Reljić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Članovi Komisije:

Mentor:

Prof. dr Tatjana Pekmezović

Prof. dr Tatjana Simić

Prof. dr Ana Savić Radojević

Komentor:

Naučni savetnik Dejan Opsenica

Doc. dr Mario Zlatović

Prof. dr Jasmina Mimić-Oka

Prof. dr Ljubica Čukanović