

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 11.5.2018. године, прихваћен је извештај ментора др Јелице Грујић Милановић и др Јелене Ђорђевић о урађеној докторској дисертацији **Данијеле Ј. Карановић**, истраживача сарадника, Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, под насловом **„Ефекти хроничне примене лосартана и темпола у експерименталном моделу фокално сегментне гломерулосклерозе код спонтано хипертензивних пацова“**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу:

1. др Јелица Грујић Милановић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања - ментор
2. др Јелена Ђорђевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет - ментор
3. др Невена Михаиловић-Станојевић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања – члан

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Данијеле Карановић**, под насловом **„Ефекти хроничне примене лосартана и темпола у експерименталном моделу фокално сегментне гломерулосклерозе код спонтано хипертензивних пацова“**, урађена је у Институту за медицинска истраживања у Београду у оквиру пројекта под бројем ОИ175096 „Испитивање антихипертензивног и ренопротективног потенцијала супстанци природног и синтетског порекла у експерименталним моделима кардиоваскуларних и бубрежних обољења“ финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја, Републике Србије.

Докторска дисертација је написана на 155 страна куцаног текста и подељена је на седам поглавља: Увод (34 стране), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (21 страна), Резултати (53 стране), Дискусија (21 страна), Закључци (2 стране) и Литература (20 страна). У дисертацији је цитирано 219 библиографских јединица. Докторска дисертација садржи и податке о менторима и члану комисије, сажетак на српском и енглеском језику, списак скраћеница, садржај, биографију аутора и потписане изјаве.

Предмет ове дисертације је испитивање ефеката хроничне примене лосартана (блокатор рецептора за ангиотензин II типа 1), темпола (стабилни нитроксид радикал – миметик супероксид дисмутазе, сакупљач слободних радикала) и њихове комбинације у експерименталном моделу фокално сегментне гломерулосклерозе (ФСГС), која је код спонтано хипертензивних пацова изазвана адријамицином. У патогенези и прогресији ФСГС важну улогу има ренин ангиотензин систем, али је улога оксидативног стреса у овим процесима остала недовољно разјашњена. Како у хроничној бубрежној слабости

оксидативни стрес доприноси напредовању болести, истраживања у оквиру ове дисертације су била усмерена ка испитивању повезаности ренин ангиотензин система и оксидативног стреса у патогенези и прогресији ФСГС. Истраживања су настала из актуелне потребе да се пронађе што бољи терапеутски приступ који би могао додатно да допринесе побољшању структуре и функције бубрега у експерименталном моделу ФСГС, што би отворило нове могућности за успоравање прогресије болести и повољније прогнозе код пацијената са овим обољењем.

Анализа докторске дисертације:

У поглављу **УВОД** (34 стране), кандидаткиња је у оквиру четири целине дала детаљан приказ података из литературе који се односе на проблематику докторске дисертације, у складу са циљем и постављеним задацима. Поглавље садржи 12 слика. Дат је преглед литературних података о карактеристикама ФСГС, хроничном обољењу бубрега које постепено и неизбежно води ка потпуном губитку бубрежне функције. Клиничка манифестација ФСГС одликује се масивном протеинуријом, хипоалбуминемијом, хиперлипидемијом и периферним едемом, које заједно представљају нефротски синдром. Описани су патогенеза и механизми прогресије болести, а истакнути су фактори који доводе до прогресије болести, као што су протеинурија, хипертензија, оксидативни стрес и хиперлипидемија. Даље је дат детаљан опис адријамицинске (ADR) нефропатије, која представља одговарајући експериментални модел ФСГС.

Посебно потпоглавље односи се на ренин ангиотензин систем, с обзиром на значајну улогу овог система у регулацији патофизиолошких процеса у бубрезима. Описане су све компоненте овог система које су присутне у бубрезима, као и мембрански рецептори преко којих ангиотензин II испољава своје хемодинамске и нехемодинамске ефекте. Приказани су литературни подаци који истичу улогу ренин ангиотензин система у настанку протеинурије и развоју гломерулосклерозе и тубулоинтерстицијске фиброзе. Осим тога, дат је преглед досадашњих истраживања која су обухватала испитивање ефеката блокатора рецептора за ангиотензин II типа 1 (AT1R), као и инхибитора ангиотензин конвертујућег ензима у адријамицинској нефропатији код спонтано хипертензивних пацова, експерименталном моделу ФСГС, али је истакнута и потреба за даљим испитивањем ефеката комбинованог третмана блокатора рецептора за ангиотензин II типа 1 и антиоксиданта како би се постигли још бољи терапијски резултати и побољшала прогноза код пацијената са ФСГС.

Наредно потпоглавље односи се на досадашња сазнања о оксидативном стресу и антиоксидативном систему организма. Описани су ензими: супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GP_x) и глутатион редуктаза (GR), који учествују у антиоксидативној одбрани. Такође, у оквиру ове целине кандидаткиња је приказала опште карактеристике NADPH оксидазе, ензима чија примарна функција јесте стварање супероксидног анјона (O₂⁻) и представља примарни извор оксидативног стреса у бубрезима. NADPH оксидаза је истакнута као значајна компонента сигналног пута којим ангиотензин II преко AT1R доводи до повећаног оксидативног стреса у бубрезима. Осим тога, детаљно су описане две изоформе каталитичке субјединице NADPH оксидазе, Nox2 и Nox4, а цитирани су и бројни подаци који указују да ове изоформе могу бити укључене у антиоксидативне и анти-инфламаторне процесе. У оквиру ове целине детаљно је описан и темпол, стабилни нитроксид радикал, који има способност сакупљања слободних радикала и миметик је супероксид дисмутазе. Потом

је дат преглед литературних података о протективним ефектима темпола у експерименталним моделима хроничне бубрежне слабости и хипертензије.

У четвртој целини описане су три изоформе азот-моноксид синтазе: ендотелна (eNOS), неуронска (nNOS) и индуцибилна (iNOS), као и улога продукта њихове активности азот-моноксида (NO) у патогенези хроничне бубрежне слабости. Наведено је да NO као слободни радикал учествује у различитим физиолошким и патофизиолошким процесима у организму. Такође је истакнуто да је активност NOS нарушена у условима када L-аргинин или есенцијални кофактор ВН₄ нису доступни у оптималној концентрацији и тада настаје 'O₂'. Услед брзе интеракције NO са 'O₂' настаје снажан оксидант пероксинитрит, а биодоступност NO се смањује, што доприноси прогресији болести. Осим овога, дат је кратак преглед досадашњих сазнања о вези између ангиотензина II, оксидативног стреса и активности NOS у различитим моделима хроничне бубрежне слабости. У уводном делу постављене су полазне основе на које ће се аутор ослањати у дискусији добијених и приказаних резултата у оквиру ове докторске дисертације.

У поглављу **ЦИЉ** (1 страна) кандидаткиња наводи да је циљ докторске дисертације испитивање ефеката лосартана (блокатор АТ1R), темпола (стабилни нитроксид радикал – SOD миметик и сакупљач слободних радикала), као и њихове комбинације на прогресију ФСГС у експерименталном моделу адријамицинске нефропатије код спонтано хипертензивних пацова. У ту сврху анализирани су:

- структура и функција бубрега и липидни статус;
- параметри оксидативног стреса и антиоксидативног система;
- експресија Nox2 и Nox4 изоформи каталитичке субјединице NADPH оксидазе, главног извора реактивних врста кисеоника у ћелији, укљученог у процес инфламације;
- експресија три изоформе NOS и активност процењена на основу укупне продукције метаболита NO (нитрити и нитрати);
- системски хемодинамски параметри: крвни притисак, минутни волумен срца, фреквенца срчаних контракција и укупни периферни васкуларни отпор, као и регионални хемодинамски параметри: проток крви и васкуларни отпори у аорти, каротидној и бубрежној артерији.

У следећем поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** (21 страна) приказан је експериментални протокол у којем је детаљно описан начин изазивања адријамицинске нефропатије, дозирање и дужина трајања испитиваних третмана. Наведено је да су истраживања спроведена у сагласности са Законом о добробити животиња („Службени гласник РС“ бр. 41/09) и Правилником о добробити огледних животиња („Службени гласник РС“ бр. 39/10), а на основу решења о одобрењу спровођења огледа на животињама издатих од стране Етичког савета Управе за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине (бр. 323-07-02447/2014-05/1 и бр. 323-07-00318/2015-05). Описана су мерења хемодинамских параметара директном и индиректном методом и начин узорковања крви, урина и ткива бубрега експерименталних животиња за неопходне анализе. Описане су методе за одређивање стандардних биохемијских параметара, за процену бубрежне функције и липидног статуса. Прецизно су описане методе за утврђивање оксидативног статуса праћењем степена липидне пероксидације, маркера оксидације протеина и активности антиоксидативних ензима (SOD, CAT, GP_x и GR). Одређивање концентрације SOD, CAT, GP_x, Nox4 и MMP-1 вршено је коришћењем ELISA методе, а Western blot методом мерен је ниво експресије протеина Nox2 и три изоформе NOS. Описана је спектрофотометријска метода коришћена за одређивање концентрације нитрита и нитрата у урину и хомогенату бубрега. Детаљно је описана хистопатолошка анализа

тквива бубрега бојеног PAS методом, и имунохистохемијска детекција експресије протеина: нестина, виментина, Nox2, Nox4 и три изоформе NOS. На крају су представљене статистичке методе (ANOVA, Fisherov LSD и Pearson-ове корелације) коришћене при обради добијених резултата.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** (53 стране) организовано је у 9 целина и документовано са 3 табеле, 25 слика (65 графикона), 57 фотографија хистопатолошке и имунохистохемијске анализе тквива бубрега.

Добијени и приказани резултати хемодинамских студија показују да, код SH пацова, апликација адријамицина у овом експерименталном дизајну не узрокује промену системских хемодинамских параметара. Једино је при анализи регионалних параметара уочено смањење отпора у каротидној артерији. Третман лосартаном узроковао је снижење систолног и средњег артеријског притиска уз истовременим хемодинамским променама у бубрежној артерији. Третман темполом проузроковао је повећање фреквенце срчаних контракција и истовремено смањено минутни волумен срца. Комбиновани третман једино је утицао на повећање протока крви у каротидној артерији.

Следећа целина обухвата резултате процене липидног статуса и бубрежне функције пацова свих експерименталних група. Апликација адријамицина повећала је вредности укупног холестерола, триглицерида и LDL-холестерола у плазми. Третман лосартаном смањено је ове вредности, док је темпол повећао вредност HDL-холестерола. Праћењем параметара који омогућавају процену бубрежне функције запажено је да је код пацова третираних адријамицином смањена концентрација албумина, а повећана концентрација кретинина у плазми. Код пацова из ове групе повећана је диуреза, екскреција протеина (P_{exc}), албумина (Alb_{exc}) и однос концентрације протеина и креатинина у урину ($U_{p/cr}$). Третман лосартаном нормализовао је концентрацију албумина и смањено ниво креатинина у плазми, као и вредности P_{exc} , Alb_{exc} , $U_{p/cr}$ и диурезе. Третман темполом снижио је вредности P_{exc} , Alb_{exc} и $U_{p/cr}$ до контролних нивоа. Након комбинованог третмана вредности P_{exc} , Alb_{exc} и $U_{p/cr}$ снижене су до нивоа који су били слични оним измереним након третмана лосартаном. Једино је комбиновани третман смањено брзину гломерулске филтрације.

Приказ хистопатолошке анализе тквива бубрега налази се у следећој целини. Код пацова који су примили адријамицин присутна је склероза гломерула са капсуларним адхезијама гломерулног клупка, атрофија и дилатација тубула са PAS позитивним садржајем, интерстицијумска инфламација и фиброза, што је утицало на повећан укупни скор морфолошких промена у тквиву бубрега. Појединачни третмани лосартаном и темполом довели су до смањења укупног збира морфолошких промена. Лосартан је био ефикаснији у смањењу индекса оштећења тубула, а темпол је испољио повољније дејство на склеротичне промене у гломерулима. Од значаја је резултат ове дисертације који је показао да комбиновани третман није резултирао синергизмом појединачних третмана, већ је напротив, патолошка слика бубрега SH пацова остала на нивоу промена изазваних адријамицином.

Експресија нестина и виментина у подоцитима SH пацова третираних адријамицином била је повећана. Виментин је детектован и у мезангијалним и паријеталним епителним ћелијама Боуманове капсуле склеротичних гломерула, а осим тога и у тубулоинтерстицијуму (тубулоцити, околни фибробласти и миофибробласти). Примена лосартана или темпола смањила је експресију нестина и виментина у тквиву бубрега. Након комбинованог третмана, за разлику од појединачних, виментин је и даље био присутан у проксималним тубулима, фибробластима и миофибробластима, док је нестин детектован у неким миофибробластима интерстицијума. Експресија матриксне металопротеиназе-1 (MMP-1) такође је била повећана у бубрезима SH

пацова третираних адријамицином, али и нормализована после шестонедељне примене, како лосартана и темпола појединачно, тако и њихове комбинације.

У следећој целини приказани су резултати мерења параметара оксидативног стреса и антиоксидативне одбране. Добијени резултати показују да су брзина ослобађања TBARS-а у плазми и ниво карбонилваних протеина у бубрезима били повећани код пацова са адријамицинском нефропатијом. Третмани лосартаном, темполом и њиховом комбинацијом су нормализовали ове вредности. Такође су повећали антиоксидативни капацитет плазме и хомогената бубрега. Појединачни третмани лосартаном и темполом су повећали активности SOD и GP_x и нормализовали експресију CAT, док је комбиновани третман, у поређењу са појединачним, смањивао активности SOD и CAT у еритроцитима. У бубрезима пацова који су примили адријамицин смањена је активност SOD и GP_x, а третман лосартаном је нормализовао ове активности и повећао активност GR. Темпол, примењен појединачно, није довео до промене активности ензима, али је у комбинацији са лосартаном нормализовао SOD активност и повећао GR у поређењу са контролом.

Следећа целина приказује резултате испитивања експресије и дистрибуције каталитичких изоформи NADPH оксидазе у бубрезима пацова свих експерименталних група. Добијени резултати показују да је адријамицин проузроковао смањење експресије Nox2 у гломерулима и Nox4 у тубулоцитима бубрега, и да је само третман лосартаном довео до нормализације експресије Nox2.

Такође, резултати ове дисертације показују да је код пацова који су примили адријамицин екскреција метаболита NO урином повећана, док је њихова концентрација у бубрезима смањена. Осим тога, код пацова из ове групе смањена је експресија iNOS. Лосартан, темпол и њихова комбинација су смањили укупну продукцију метаболита NO, тј. редуковали адријамицином изазвано повећање екскреције нитрита и нитрата урином. У бубрезима је, третман лосартаном, за разлику од темпола, вратио концентрацију укупних метаболита NO на контролни ниво. С друге стране, комбиновани третман повећао је концентрацију метаболита NO повећањем концентрације нитрита у бубрезима. Појединачни третмани лосартаном и темполом повећали су експресију свих изоформи NOS у хомогенату бубрега, а комбиновани третман је повећао само експресију iNOS, док је експресија конститутивних изоформи NOS била снижена. На крају су табеларно приказане корелације између испитиваних параметара и сумарни приказ добијених резултата.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** (21 страна) кандидаткиња студиозно и критички разматра добијене и приказане резултате. Дискусија резултата је започета систематски, полазећи од резултата који приказују ефекте испитиваних третмана на биохемијске параметре и процену бубрежне функције. У експерименталном моделу адријамицинске нефропатије присутна је протеинурија, албуминурија, хиперлипидемија, хипоалбуминемија, повећана диуреза и концентрација креатинина у плазми. Третман лосартаном побољшава бубрежну функцију, јер значајно смањује протеинурију и албуминурију, које су и даље повишене у поређењу са контролама, што је у складу са резултатима других аутора. Темпол значајно смањује протеинурију и албуминурију до нивоа контролне групе. Комбиновани третман не доводи до побољшања бубрежне функције, јер није довео до додатног смањења протеинурије у односу на третман лосартаном иако је смањивао брзину гломерулске филтрације. Структурне промене у бубрезима: гломерулосклероза, дилатација и атрофија тубула, интерстицијумска инфламација и фиброза присутне код пацова са адријамицинском нефропатијом, значајно су ублажене након третмана лосартаном, што је очекивано и у складу са резултатима претходних истраживања. Третман темполом је значајно спречио настанак ових оштећења, по први пут показујући већи протективни ефекат антиоксиданта у

гломерулима, где је могао да допринесе поновном успостављању селективне пропустљивости филтрационе мембране и успоравању даљег губитка протеина урином. Изостанак побољшања хистопатолошке слике бубрега након комбинованог третмана указује да лосартан и темпол не делују синергистички. У прилог томе говоре експресије виментина детектоване у тубулоцитима проксималних тубула, околним фибробластима и миофибробластима, и експресија нестина у перигломеруларним миофибробластима, што указује на присутна оштећења у тим деловима бубрега, а у складу је са резултатима студија изведених на другим експерименталним моделима.

Код пацова са адријамицинском нефропатијом детектован је повећан оксидативни стрес, што је у складу са резултатима других аутора који су истраживали у овом истом моделу. Појединачни третмани и њихова комбинација су довели до побољшања системског оксидативног статуса, повећали антиоксидативни капацитет и довели до смањења оксидативног оштећења протеина бубрега, што кандидат објашњава чињеницом да темпол, захваљујући способности да неутралише слободне радикале, спречава оксидативна оштећења протеина. С друге стране, комбиновани третман доводи до повећане активност SOD уз снижену активност GPx у хомогенату бубрега, што је могло да доведе до нагомилавања водоник пероксида у бубрезима пацова из ове групе. Осим тога, кандидаткиња је у својим истраживањима показала да је концентрације нитрита у бубрезима ове групе пацова повећана, што би са повећаном концентрацијом водоник пероксида насталог услед повећане активности SOD у овој групи могло довести до формирања врло реактивних пероксинитрита, и тако допринети настанку оштећења бубрега присутних код пацова након комбинованог третмана.

Анализом имунохистохемијских мерења код пацова са адријамицинском нефропатијом утврђено је да је експресија Nox2 у гломерулима и Nox4 у тубулима смањена, уз повећану инфилтрацију мононуклеарних леукоцита и интерстицијску фиброзу око склеротичних гломерула, дилатираних и атрофираних тубула. Сличне резултате добили су и други истраживачи, на другим експерименталним моделима хроничне бубрежне слабости, који указују да недостатак Nox2 или Nox4 доприноси напредовању бубрежне слабости. Хронична блокада AT1R лосартаном повећава експресију Nox2 на ниво контроле уз смањену инфламацију интерстицијума, што указује да у одређеној мери може испољити анти-инфламаторна својства. Темпол није утицао на експресију Nox2 и Nox4 али је значајно смањио перигломерулну инфламацију, гломерулосклерозу и протеинурију, доводећи до успоравања прогресије бубрежне слабости. Међутим, није детектовано повећање експресије Nox2 и Nox4 ни у бубрезима пацова који су комбиновано третирани, а присутна интерстицијска инфламација и значајна структурна оштећења бубрега, указују да темпол у условима смањеног оксидативног стреса услед блокаде AT1R анулира протективни, анти-инфламаторни ефекат лосартана, делујући про-оксидативно.

Потом, кандидаткиња дискутује резултате испитивања матриксне металопротеиназе MMP-1, ензима који има улогу у деградацији компоненти ванћелијског матрикса и очувању интегритета гломерула и по први пут показује да је у бубрезима пацова са адријамицинском нефропатијом његова концентрација повећана, као и да лосартан, темпол и њихова комбинација смањују концентрацију MMP-1, при чему се третман темполом показао најуспешнијим, што је последично могло да доведе до смањења гломерулосклерозе код пацова из ове групе.

Надаље су дискутовани резултати испитивања експресије три изоформе NOS у бубрезима, као и продукција метаболита NO (нитрита и нитрата), који представља индиректни показатељ активности ових ензима у бубрезима. Код пацова са адријамицинском нефропатијом снижена је само експресија iNOS, и смањена је

концентрације метаболита NO у хомогенатима бубрега, што је у складу са резултатима добијеним у истраживањима других аутора. Имунохистохемијска анализа три изоформе NOS показала је да је експресија eNOS у гломерулима, nNOS у зони *macula dense* и iNOS у тубулима ових пацова снижена. Појединачни третмани лосартаном и темполом повећавају експресију све три изоформе NOS. Лосартан је повећао концентрацију метаболита NO у бубрезима, док је ова промена изостала после третмана темполом, што је кандидаткиња објаснила могућим повећаним елиминисањем укупних метаболита NO из бубрега, будући да је диуреза код пацова ове групе била повећана, а једна од физиолошких улога NO у бубрезима је управо да промовише диурезу и натриурезу. За разлику од појединачних третмана лосартаном и темполом, њихова комбинација утицала је на повећање експресије iNOS, док је експресија eNOS и nNOS била снижена, а концентрација метаболита NO повећана, на рачун нитрита у бубрезима. Како се активношћу iNOS синтетише већа количина NO, значајно повећање у концентрацији нитрита детектовано код ових пацова може бити последица повећане активности iNOS у бубрезима, што су потврдили и резултати других истраживања. Кандидат указује на потенцијални механизам настанка патолошких промена у бубрезима путем формирања потентног пероксинитрита, који алтернативно настаје и интеракцијом нитрита и водоник пероксида.

Системски и регионални хемодинамских параметри након изазивања адријамицинске нефропатије нису се променили у односу на контролу, што је у складу са резултатима других аутора. Очекивано третман лосартаном је снизио систолни и средњи артеријски притисак и побољшао хемодинамска својства у бубрежној артерији. Темпол је довео до повећања фреквенце срчаних контракција и смањења минутног волумена срца, што су показали и резултати других аутора, указујући на могућу рефлексну активацију симпатичког нервног система. Међутим, комбиновани третман је довео до губитка повољног ефекта лосартана на хемодинамске параметре у бубрежној артерији, али је с друге стране довео до побољшања хемодинамских својстава у каротидној артерији.

Резултати ове дисертације су по први пут показали да у раној фази адријамицинске нефропатије код спонтано хипертензивних пацова комбиновани третман селективним AT1R антагонистом (лосартаном) и синтетским антиоксидантом (темполом) није значајно спречио структурна оштећења, нити је побољшао функцију бубрега, што може указати на то да у овим експерименталним условима изостаје њихов удружен повољан ефекат на успоравање прогресије ФСГС.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** (2 стране) на јасан начин изведени су закључци који у потпуности произлазе из добијених резултата, а одговарају на постављене циљеве ове докторске дисертације. На основу добијених резултата у овој докторској дисертацији, кандидаткиња закључује да:

1. Лосартан (блокатор AT1R) и темпол (сакупљач слободних радикала, SOD миметик), појединачно, смањују структурна оштећења бубрега изазвана адријамицином (фокално сегментну гломерулосклерозу, атрофију и дилатацију тубула, интерстицијску инфламацију и фиброзу), али синергистички не делују јер не мењају укупни збир морфолошких промена;
2. Лосартан и темпол побољшавају бубрежну функцију јер смањују протеинурију и албуминурију, али у комбинацији не спречавају губитак протеина урином и смањење брзине гломерулске филтрације;
3. Лосартан нормализује вредности триглицерида, укупног холестерола и LDL холестерола, а темпол повећава ниво HDL холестерола у плазми, међутим у комбинацији они не показују побољшање липидног статуса;

4. Сви испитивани третмани побољшавају оксидативни статус, односно повећавају антиоксидативни капацитет, смањују липидну пероксидацију у плазми и карбонилацију протеина у бубрезима и повећавају активности ензима антиоксидативног система у еритроцитима; Лосартан повећава активности SOD, GP_x и GR, док темпол у комбинацији са лосартаном повећава SOD активност;
5. Лосартан повећава експресију Nox2 каталитичке субјединице NADPH оксидазе и спречава перигломерулну и перитубулну инфламацију интерстицијума, указујући на анти-инфламаторну улогу NADPH оксидазе
6. Појединачни третмани лосартаном и темполом повећавају експресију све три изоформе NOS, док комбиновани третман повећава само експресију iNOS у бубрезима;
7. Лосартан, појединачно или у комбинацији са темполом, повећава продукцију метаболита NO у хомогенату бубрега; сви испитивани третмани смањују укупну продукцију метаболита NO путем урина;
8. Лосартан снижава систолни и средњи артеријски притисак, а повећава проток и смањује васкуларни отпор у бубрежној артерији; Темпол повећава фреквенцу срчаних контракција и смањује минутни волумен, док комбиновани третман повећава проток и смањује васкуларни отпор у каротидној артерији не мењајући крвни притисак.

Као главни закључак кандидат истиче да у условима хроничне блокаде AT1R лосартаном, третман темполом не доприноси даљем успоравању бубрежне слабости, упркос повећаном антиоксидативном капацитету и смањеном оксидативном стресу, у експерименталном моделу ФСГС изазване адријамицином код спонтано хипертензивних пацова.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи списак 219 цитираних библиографских јединица. Литературни извори су адекватно и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21 Danijela Karanović**, Jelica Grujić-Milanović, Zoran Miloradović, Milan Ivanov, Đurđica Jovović, Una-Jovana Vajić, Maja Životić, Jasmina Marković-Lipkovski, Nevena Mihailović-Stanojević (2016). Effects of single and combined losartan and tempol treatments on oxidative stress, kidney structure and function in spontaneously hypertensive rats with early course of proteinuric nephropathy. PLoS ONE 11(8): e0161706. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0161706>
2. **M22 Danijela Karanović**, Jelica Grujić-Milanović, Zoran Miloradović, Đurđica Jovović, Milan Ivanov, Una-Jovana Vajić, Sanja Ćirović, Jasmina Marković-Lipkovski, Nevena Mihailović-Stanojević (2017). Effects of losartan, tempol, and their combination on renal nitric oxide synthases in animal model of chronic kidney disease. Acta Veterinaria-Beograd, 67(3):409-425. http://actaveterinaria.rs/uploads/documents/18b732f7a7dc601ba7088c292a8e78330478e885_09-Stanojevic.pdf

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M34 D. Karanović**, J Grujić-Milanović, Z Miloradović, M Ivanov, UJ Vajić, Đ Jovović, N Mihailović-Stanojević. Superoxide dismutase mimetic improves kidney function and oxidative stress in hypertensive rats with focal segmental glomerulosclerosis. Joint meeting ESH-ISH, Journal of hypertension./European Society of Hypertension, International Society of Hypertension, 32, e-Supplement 1, pp. e560 - e560, 0263-6352, Greece, 13. - 16. Jun, 2014.
2. **M34 Karanović D**, Grujić Milanović J, Miloradović Z, Ivanov M, Vajić UJ, Jovović Dj, Mihailović Stanojević N. Losartan affects antioxidant enzymes activity and expression in spontaneously hypertensive rats with early course of proteinuric nephropathy. 2nd European Section Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences, „Heart Diseases: How New Research May Lead to New Treatments“, Belgrade, Serbia., Serbian Physiological Society/International Academy of Cardiovascular Sciences-European Section, pp. 122 - 122, 978-86-904799-8-6, Serbia, 8. - 10. Oct, 2015.
3. **M34 D Karanović**, Z Miloradović, J Grujić-Milanović, M Ivanov, Đ Jovović, UJ Vajić, J Marković-Lipkovski, M Životić, N Mihailović-Stanojević (2016). Losartan and tempol, but not their combination ameliorate renal inflammatory response at an early stage of experimental focal-segmental glomerulosclerosis. 2nd Joint Meeting of Slovak and Serbian Physiological Societies „Physiology without Frontiers“, Slovak Physiological Society, Serbian Physiological Society, Institute of Normal and Pathological Physiology and Institute for Heart Research, Slovak Academy of Sciences and NO club, Abs. book, pp. 22 - 22, Slovačka, zamak Smolenice, 15. - 18. May, 2016.
4. **M34 D Karanović**, J Grujić-Milanović, Z Miloradović, M Ivanov, UJ Vajić, Đ Jovović, M Životić, N Mihailović-Stanojević. Tempol supplementation does not overcome beneficial effect of losartan in hypertensive rats with early course of focal segmental glomerulosclerosis. Journal of Hypertension, Lippincott Williams & Wilkins, Ltd., 34, e-Supplement 2 - ESH, pp. e167 - e167, 0263-6352, Francuska, 10. - 13. Jun, 2016.
5. **M34 N Mihailović-Stanojević, D Karanović**, Z Miloradović, M Ivanov, Đ Jovović, U-J Vajić, S Ćirović, J Marković-Lipkovski, J Grujić Milanović (2017). Losartan improves NADPH oxidase 2 signalling in the kidney of spontaneously hypertensive rats with early course of focal segmental glomerulosclerosis. 3th International Cardionephrology and Hypertension Congress, „Cardionephrology Up to Date“, Punta-Niš, pp. 148 - 148, 978-86-7990-174-3, Piro, Srbija, 11. - 13. May, 2017.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M64 Danijela Karanović**, Jelica Grujić Milanović, Zoran Miloradović, Milan Ivanov, Una-Jovana Vajić, Đurđica Jovović, Nevena Mihailović-Stanojević. Losartan poboljšava lipidni status i ublažava oksidativni stres u eksperimentalnoj adrijamicinskoj nefropatiji. Drugi kongres Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju: „Život sa slobodnim radikalima: hemija, biologija, medicina“, Srpsko društvo za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju, pp. 36 - 36, 978-86-912893-2-4, Srbija, 28. - 28. Sep, 2013.

Мишљење и предлог Комисије:

На основу прегледа докторске дисертације **Данијеле Карановић**, Комисија је мишљења да овај рад својом темом, циљевима, методолошким приступом, добијеним резултатима и њиховим тумачењем представља оригинални истраживачки допринос разумевању повезаности ренин ангиотензин система и оксидативног стреса у настанку и прогресији фокално сегментне гломерулосклерозе. Резултати истраживања у оквиру ове дисертације пружају јаснију слику о ефектима антиоксидативног третмана темполом у условима хроничне блокаде АТ1R на прогресију бубрежне слабости, који у испитиваним дозама не доприносе даљем успоравању прогресије болести, упркос повећаном антиоксидативном капацитету и смањеном оксидативном стресу у експерименталном моделу ФСГС изазване адријамицином код спонтано хипертензивних пацова. Кандидаткиња је у својој докторској дисертацији обрадила актуелну тему и добијени резултати представљају оригинални истраживачки допринос бољем разумевању ефеката комбинованог антиоксидативног и антихипертензивног третмана на прогресију бубрежне слабости у патолошким стањима ФСГС удружене са хипертензијом. Такође, треба истаћи да приказани резултати могу представљати полазну основу за даљи развој нових терапијских приступа који би отворили нове могућности за успоравање прогресије болести и бољу прогнозу пацијентима са овим обољењем.

Имајући у виду све напред наведено, као и да су резултати поменутих истраживања инкорпорирани у једној публикацији у врхунском међународном часопису М21 категорије и у једној публикацији у истакнутом међународном часопису (М22), Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри Данијели Ј. Карановић јавну одбрану докторске дисертације под насловом **„Ефекти хроничне примене лосартана и темпола у експерименталном моделу фокално сегментне гломерулосклерозе код спонтано хипертензивних пацова“**.

У Београду, 8.6.2018. године.

КОМИСИЈА:

др Јелица Грујић Милановић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања

др Јелена Ђорђевић, редовни професор
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Невена Михаиловић-Станојевић, научни саветник
Универзитет у Београду-Институт за медицинска истраживања