

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЉЕНО: 29. 06. 2021.			
Орг. јед.	Број	Почетак / Завршетак	
05	5701		

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-279/32 од 14.04.2021. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Зорана Ковачевића под називом:

„Полиморфизми гена за галектин-3 код болесника у терминалној фази реналне инсуфицијенције“

Чланови комисије су:

1. **Доц. др Марина Милетић Ковачевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник;
2. **Проф. др Александар Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
3. **Доц. др Ана Вујић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Педијатрија, члан;
4. **Доц. др Маја Саздановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
5. **Проф. др Нела Максимовић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хумана генетика, члан;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Зоран Ковачевић је рођен 12.03.1974. године у Шапцу. Основну и средњу школу (Гимназија) је завршио у Шапцу. Медицински факултет, Универзитета у Крагујевцу је уписао школске 1993/94 године (основне студије медицине, доктор медицине), а на истом је дипломирао 1999. године са просечном оценом 8,11. Специјалистички испит из области Интерне медицина положио је 2007. године на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу са оценом 5, чиме је стекао звање специјалисте интерне медицине. Школске 2008/09 године је уписао Докторске академске студије на Медицинском факултету, Универзитета у Крагујевцу, а усмени докторски испит из области ендокринологија је положио 2011. године. са оценом 10. Ужу специјализацију из области нефрологије је уписао школске 2016. године и успешно завршио 2018. године. У октобру 2020. године Министар здравља Републике Србије доделио му је назив Примаријус. Радно искуство је започео на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу као сарадник на предмету Клиничка и експериментална фармакологија, а затим у КЦ Крагујевац, Центар за ургентну медицину и на Интерној клиници – Центар за гастроентерохепатологију. Тренутно ради у Центру за Ургентну медицину КЦ Крагујевац.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: Полиморфизми гена за галектин-3 код болесника у терминалној фази реналне инсуфицијенције

Предмет: Испитивање улоге полиморфизма гена за галектин 3 на прогресију хроничне бубрежне инсуфицијенције као и повезаност полиморфизма гена за галектин 3 са развојем кардиоваскуларних и других компликација код пацијената који су на хемодијализи.

Хипотезе:

1. Учесталост генотипова и алела гена за галектин 3 код пацијената на хемодијализи биће различит у односу на учесталост истих генотипова код здравих особа.
2. Учесталост генотипова и алела гена за галектин 3 код пацијената на хемодијализи биће различит у односу на примарну болест.

3. Очекује се постојање позитивне корелације између учесталости појединих генотипова и алела за галектин 3 и појаве кардиоваскуларних компликација.
4. Очекује се постојање позитивне корелације између бар неких клиничких, генетских и биохемијских варијабли.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, **Зоран Ковачевић**, је као први аутор објавио рад у целини у часопису категорије M23 на једном од водећих светских језика, чиме је испунио услов за пријаву докторске дисертације:

1. **Kovačević Z**, Cvetković O, Janićijević K, Janićijević Petrović M, Cvetković M, Zornić N. The clinical analysis of peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Srpski Arhiv za celokupno lekarstvo* 2021; DOI: <https://doi.org/10.2298/SARH190708008J>. **M23**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Хронична болест бубрега представља један од главних здравствених проблема у целом свету. Подаци показују да учесталост ESRD (енг. *end-stage renal disease*) прогресивно расте широм света у последњих двадесет година, са више од два милиона оболелих у свету и преко пола милиона у Европи. Учесталост ESRD у Србији такође је расла у последњој деценији, повећавајући се са 107 на 189 пацијената на милион особа. Важно је напоменути да је Србија међу европским земљама са већом учесталосту хроничних бубрежних болести-CKD (енг. *chronic kidney disease*) и ESRD. Најчешћи облик терапије за CKD и ESRD је хемодијализа. Међутим, код пацијента на дуготрајној хемодијализи често се развијају компликације, као што су кардиоваскуларни, неуролошки и метаболички поремећаји. Иако је неколико фактора ризика укључено у развој кардиоваскуларних компликација код пацијената са CKD и ESRD укључујући запаљење, оксидациони стрес, ендотелну дисфункцију и васкуларну калцификацију, постоји мало осетљивих биомаркера који су значајни не само у патогенези бубрежне болести и њеној прогресији у ESRD, већ и у појави озбиљних кардиоваскуларних компликација. Галектин 3 је химерни лектин који се је везан за β -галактозид, састављен од 250 аминокиселина и има вишеструке биолошке функције. Када су концентрације галектина 3 високе, овај химерни тип галектина формира мултимерни

комплекс који омогућава адхезију ћелија и ванћелијског матрикса чиме се олакшава фиброза. Недавно је галектин 3 предложен као нов биомаркер срчане инсуфицијенције због његове значајне улоге у фибрози миокарда, инфламацији и адхезији. Такође, показано је да повишени ниво галектина 3 може повећати ризик од развоја хроничне болести бубрега, кроз остале механизме деловања.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања

Предложено истраживање може допринети увођење оригиналних протокола праћења и лечења пацијената на глобалном нивоу.

Циљ истраживања

Основни циљ овог истраживања је да се испита улога полиморфизма гена за галектин 3 на прогресију хроничне бубрежне инсуфицијенције као и повезаност полиморфизма гена за галектин 3 са развојем кардиоваскуларних и других компликација код пацијената који су на хемодијализи.

Специфични циљеви истраживања су следећи:

1. Одредити ниво биохемијских параметара у системској циркулацији пацијената на хемодијализи (CRP, протеински статус, паратхормон, уреа, креатинин).
2. Одредити учесталост полиморфизама различитих генотипова rs4644, rs4652 и rs11125 гена за галектин 3 код пацијената на хемодијализи и здравих контрола методом *real-time* PCR.
3. Испитати учесталости различитих генотипова rs4644, rs4652 и rs11125 гена за галектин 3 код пацијената на хемодијализи са различитим примарним болестима које су довеле до хроничне бубрежне инсуфицијенције (дијабетес мелитус, хипертнезија, полицистични бубрези).
4. Испитати корелацију између различитих генотипова rs4644, rs4652 и rs11125 гена за галектин 3 и појаве кардиоваскуларних компликација мерењем нивоа NT-proBNP и тропонина.
5. Утврдити корелацију између свих клиничких, генетских и биохемијских варијабли.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Прогресивну хроничну болест бубрега карактерише развој тубулоинтерстицијске фиброзе. Раније је показано да експресија и секреција галектина 3 од стране макрофага промовише развој тубулоинтерстицијске фиброзе на моделима миша. Постоје контрадикторни резултати о значају полиморфизма гена за галектин 3 у кардиоваскуларним болестима. Тако су *Fu* и сарадници показали да полиморфизам гена за галектин 3 не утиче на степен фиброзе миокарда, већ његов серумски ниво. Супротно, *Zhang* и сарадници су показали да полиморфизам гена за галектин 3 утиче на прогнозу дилатативне кардиомијопатије у популацији кинеза. У узорцима опште популације спроведене су две епидемиолошке студије (*Framingham Heart Study and Cardiovascular Health Study*) дајући контрадикторне резултате о улози галектина 3 у хроничној болести бубрега. С обзиром на обећавајућа, али недовољна сазнања, даља истраживања су оправдана да би се боље разумела повезаност између галектина 3 и хроничне болесте бубрега као и повезаност овог биомеракера са појавом компликација код пацијената на дуготрајној хемодијализи.

2.7. Метод истраживања

2.7.1. Врста студије

Истраживање ће бити изведено по типу студије пресека.

2.7.2. Узорковање

У истраживање ће бити укључено 90 пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом на хроничној терапији хемодијализом дијагностикованих и лечених на Клиници за нефрологију и урологију, Центра за хемодијализу, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и на Институту за хуману генетику Медицинског факултета у Београду у складу са одобрењем Етичког Одбора КЦ Крагујевац. Дијагноза терминалне бубрежне инсуфицијенције биће постављена на основу клиренса ендогеног креатинина класификационих критеријума из 2010. године. Пацијенти морају бити на терапији хемодијализом минимално 6 месеци.

Пацијенти ће бити подељени у три групе:

- 1) пацијенти код којих је бубрежна инсуфицијенција настала због дијабетеса мелитуса тип 1 и/или 2 (n=30);
- 2) пацијенти код којих је бубрежна инсуфицијенција настала због артеријске хипертензије (n=30).

3) пацијенти код којих је бубрежна инсуфицијенција настала због полицистичне болести бубрега (n=30).

4) Контролна група-добровољни даваоци крви (n=30).

Рутинским лабораторијским анализама одређиваће се комплетна крвна слика, са бројем леукоцита и леукоцитарном формулом, као и серумски ниво CRP-а, протеински статус, паратхормон, уреа, креатинин.

Узорковање периферне крви у циљу изолације ДНК:

За изолацију ДНК се од пацијената узима 5ml пуне крви на цитрату и чува на +4⁰Ц до изолације ДНК.

Изолација ДНК:

ДНК из леукоцита периферне крви пацијената биће изолована методом исољавања. Укратко, у 5ml крви са антикоагулансом се додаје пуфер за лизу и инкубира на +4⁰Ц 20 минута. Након тога узорци се центрифугурају 15 минута на 2000 rpm. У талог се додаје 10ml физиолошког пуфера и узорци се центрифугурају 15 минута на 2000 rpm (испирање). Испирање се понавља док се не добије чист, бео талог. Талогу се затим додаје 3ml пуфера А, 30μl протеиназе К и 200μl 10% СДС (натријум-додецисулфат). Узорак се ресуспендује и инкубира током ноћи на собној температури. Наредног дана се узорцима 1ml 6М натријум хлорида и центрифугурају се 15 минута на 3000 rpm. Супернатант се центрифугура 15 минута на 4000 rpm. Након тога супернатанту се додаје иста запремина 2-пропанола. Кончић ДНК који се формира узима се стакленим штапићем и 30 секунди потапа у 70% етанолу. ДНК се налази на стакленом штапићу, суши се на ваздуху и потом се раствара у 300μl ДЕПЦ воде. Концентрација и чистоћа ДНК мери се спектрофотометром.

Детекција алела и генотипова rs4644, rs4652 и rs11125 полиморфизама гена за галектин 3 код пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом

Алели и генотипови rs4644, rs4652 и rs11125 полиморфизама гена за галектин 3 биће одређивани *real-time PCR* методом. За ову анализу биће коришћене C___7593635_1_ (за rs4644 полиморфизам), C___7593636_30 (за rs4652 полиморфизам) и C___7593637_10 (за rs11125 полиморфизам) *TaqMan* пробе (*TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assays*), према упутству произвођача.

Одређивање биохемијских параметара:

У серуму би се одређивали следећи биомаркери: NT-proBNP и тропонин из периферне крви узорковане истовремено када је узета и крв за ДНК анализу.

2.7.6. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: Примарне независне варијабле су демографске карактеристике пацијената на хемодијализи и примарна болест.

Зависне варијабле:

- учесталост одређених генотипова гена за галектин-3,
- биохемијски параметри,
- кардиоваскуларне компликације,

Збуњујуће варијабле:

- коморбидитети,
- примена фармакотерапије у претходном периоду

2.7.7. Снага студије и величина узорка

Снага студије и одређивање величине узорка: Величина узорка је израчуната на основу учесталости генотипова за галектин-3 код педијатријских пацијената на хемодијализи. А алел полиморфизма гена G-395A Klotho показује значајно већу учесталост међу децом са хроничном бубрежном инсуфицијенцијом и оних са кардиоваскуларним болестима и хипертрофијом леве коморе.

Студијски узорак је израчунат узимајући да је вероватноћа грешке I типа (α) 0.05, а снага студије (β) 0.8 за независни T тест, поређећи групе међу собом у оба смера, према статистичком програму G*Power3. На основу задатих параметара утврдили смо да је за даде критеријуме неопходан минималан узорак од 90 испитаника, односно 30 испитаника по групи оболелих и 30 здравих испитаника. Ово је довољна величина узорка да се одбаци нулта хипотеза. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (независни T тест или Mann-Whitney test) између две измерене варијабле, са снагом студије $\geq 80\%$. За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 22.0.

2.7.8. Статистичка анализа

Подаци ће бити представљени као средње вредности \pm стандардне девијације или медиана (ранг). За поређење два модалитета лечења, биће коришћен независни t-тест за податке са нормалном расподелом и Mann Whitney тест за податке који немају нормалну расподелу. За поређење између све четири групе користиће се ANOVA или

Kruskal-Wallis-ov тест у зависности од типа расподеле. Упарени *t*-тест ће бити коришћен за испитивање статистичке разлике у различитим временским тачкама у оквиру сваке од две групе. Хи-квадрат тест ће бити употребљен да се испита зависност између здравих и пацијената на дијализи, као и између пацијената са различитом примарном болешћу. За испитивање корелације између ДНК полиморфизма и биохемијски параметара користиће се *Spearman's ρ* или *Pearson's r* тест у зависности од типа расподеле. Статистичка значајност ће бити прихваћена за $P \leq 0.05$. Статистичка анализа ће бити вршена уз помоћ статистичког програмског пакета SPSS Statistics 22.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да ће учесталост различитих алела и генотипова rs4644, rs4652 и rs11125 полиморфизама гена за галектин 3 бити различита између пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом и здравих контрола. Такође, очекује се да ће учесталост различитих алела и генотипова rs4644, rs4652 и rs11125 полиморфизама гена за галектин 3 бити различита између различитих група пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Хронична болест бубрега представља један од главних здравствених проблема у целом свету. Најчешћи облик терапије хроничне болести бубрега је хемодијализа. Главни узроци смртог исхода пацијената на дуготрајној хемодијализи су кардиоваскуларне болести и артериосклеротична васкулопатија. Галектин 3 је химерни лектин који је везан за β-галактозид, састављен је од 250 аминокиселина и има вишеструке биолошке функције. Недавно је предложен као нови биомаркер срчане инсуфицијенције због његове значајне улоге у фибрози миокарда, инфламацији и адхезији. Поред фиброзе миокарда, повишени ниво галектина 3 може бити повезан са развојем фиброзе других органа, попут бубрега, а може повећати и ризик од развоја хроничне болести бубрега, кроз остале механизме деловања. Циљ овог истраживања је да се испита корелација између присуства различитих генотипова и алела rs4644, rs4652 и rs11125 полиморфизама гена за галектин 3 код пацијената са терминалном фазом реналне инсуфицијенције код којих је бубрежна слабост настала због дијабетес мелитуса типа 1 и 2, хипертензије и полицистичне болести бубрега и веза полиморфизама гена за

галектин 3 са еволуцијом кардиоваскуларних компликација. Такође, ће се испитивати да ли постоји разлика у учесталости генотипова и алела полиморфизама гена за галектин 3 између болесника са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом и здравих контрола. Алели и генотипови rs4644, rs4652 и rs11125 полиморфизама гена за галектин 3 биће одређивани real-time PCR методом. Очекује се да ће учесталост различитих алела и генотипова гена за галектин 3 бити различита између пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом и здравих контрола, између различитих група пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом као и да постоји повезаност појединих алела са настанком кардиоваскуларних компликација.

3. Предлог ментора

Због мултидисциплинарности ове студије за ментора ове докторске дисертације предлаже се проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика и коментор доц. др Татјана Лазеревић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина. Проф. др Биљана Љујић и доц. др Татјана Лазеревић испуњавају услове за менторе докторских дисертација у складу са стандардом 9 за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама. Истовремено поседујући одговарајуће стручне и научне компетенције које су у вези са предложеном темом.

3.1. Компетентност ментора

Радови проф. др Биљана Љујић

1. Bojic S, Falco MM, Stojkovic P, **Ljujic B**, Jankovic MG, Armstrong L, Markovic N, Dopazo J, Lako M, Bauer R, Stojkovic M. Platform to study intracellular polystyrene nanoplastic pollution and clinical outcomes. *Stem Cells*. 2020; 38(10):1321-5.
2. Petrovic I, Pejnovic N, **Ljujic B**, Pavlovic S, Kovacevic MM, Jeftic I, Djukic A, Draginic N, Andjic M, Arsenijevic N, Lukic ML, Jovicic N. Overexpression of Galectin 3 in Pancreatic β Cells Amplifies β -Cell Apoptosis and Islet Inflammation in Type-2 Diabetes in Mice. *Front Endocrinol*. 2020; 7:11:30.
3. Stankovic M, **Ljujic B**, Babic S, Maravic-Stojkovic V, Mitrovic S, Arsenijevic N, Radak D, Pejnovic N, Lukic ML. IL-33/IL-33R in various types of carotid artery atherosclerotic lesions. *Cytokine*. 2019; 120:242-50.

4. Kovacevic MM, Pejnovic N, Mitrovic S, Jovicic N, Petrovic I, Arsenijevic N, Lukic ML, **Ljujic B**. Galectin-3 deficiency enhances type 2 immune cell-mediated myocarditis in mice. *Immunol Res*. 2018; 66:491-502.
5. **Ljujic B**, Milovanovic M, Volarevic V, Murray B, Bugarski D, Przyborski S, Arsenijevic N, Lukic ML, Stojkovic M. Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. *Sci Rep* 2013; 3:2298. doi: 10.1038/srep02298.

Радови доц. др Татјана Лазаревић

1. **Lazarević T**, Petrović D, Novković Lj, Janićijević K, Janićijević Petrović MA, Vujić A, Ljujić B, Sazdanović M, Kovačević Z. Assessment of volemia status using ultrasound examination of the inferior vena cava and spectroscopic bioimpedance in hemodialysis patients. *Vojnosanit Pregl*. 2022); doi: 10.2298/VSP200513131L.
2. Lorenz MW, Abdi NA, Scheckenbach F, Pflug A, Bülbül A, Catapano AL, Agewall S, Ezhov M, Bots ML, Kiechl S, Orth A; PROG-IMT study group: ...**Lazarevic T**.... Automatic identification of variables in epidemiological datasets using logic regression. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2017 Apr 13;17(1):40.
3. **Lazarević T**, Rilak A, Bugarčić ŽD. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem*. 2017;142:8-31.
4. Djukanović L, Dimković N, Marinković J, Djurić Ž, Knežević V, **Lazarević T**, Ljubenović S, Marković R, Rabrenović V Association between Hemodialysis Patient Outcomes and Compliance with KDOQI and KDIGO Targets for Mineral and Bone Metabolism. *Nephron*. 2016;132(3):168-74.
5. Djukanović L, Dimković N, Marinković J, Andrić B, Bogdanović J, Budošan I, Cvetičanin A, Djordjev K, Djordjević V, Djurić Ž, Lilić BH, Jovanović N, Jelačić R, Knežević V, Kostić S, **Lazarević T**, Ljubenović S, Marić I, Marković R, Milenković S, Milićević O, Mitić I, Mićunović V, Mišković M, Pilipović D, Plješa S, Radaković M, Stanojević MS, Janković BT, Vojinović G, Šefer K. Compliance with guidelines and predictors of mortality in hemodialysis. Learning from Serbia patients. *Nefrologia*. 2015;35(3):287-95.

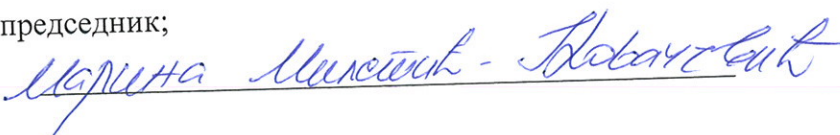
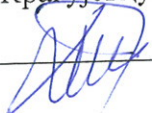
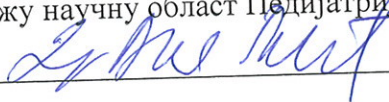
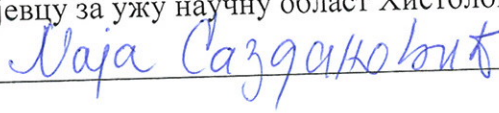
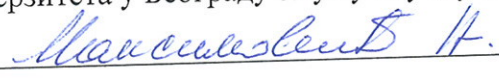
3. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Интерна медицина

4. Научна област чланова комисије

1. **Доц. др Марина Милетић Ковачевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник;
2. **Проф. др Александар Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;
3. **Доц. др Ана Вујић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Педијатрија, члан;
4. **Доц. др Маја Саздановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;
5. **Проф. др Нела Максимовић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хумана генетика, члан;

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. Доц. др **Марина Милетић Ковачевић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија; председник;

2. Проф. др **Александар Ђукић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

3. Доц. др **Ана Вујић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Педијатрија, члан;

4. Доц. др **Маја Саздановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;

5. Проф. др **Нела Максимовић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хумана генетика, члан;


У Крагујевцу, мај 2021. године