

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 18.02.2016. godine, imenovana je Komisija u sastavu

1. Prof. dr Zorana Jelić-Ivanović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
2. Prof. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
3. Dr Gordana Joksić, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom **"Određivanje genske ekspresije adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 i nivoa adiponektina u krvi kod pacijenata sa koronarnom srčanom bolešću i pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom"** kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Mirona Sopića, asistenta na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

I Z V E Š T A J

A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija je napisana na 156 strana, ima 29 tabela, 58 slika i 161 literaturni navod. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura.

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita koncentracija cirkulišućeg adiponektina i nivo genske ekspresije adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi u grupi zdravih ispitanika, pacijenata sa koronarnom srčanom bolešću (KSB) i pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom (HBI) na

hemodijalizi, kao i da se ispita povezanost stepena razvoja KSB sa promenom koncentracije cirkulišućeg adiponektina i genske ekspresije adiponektinskih receptora.

U poglavlju **Materijal i metode** dati su podaci o ispitanicima i primenjenim metodama. U istraživanju su učestvovala 133 ispitanika: 69 osoba sa KSB, 31 osoba sa HBI i 33 zdrava ispitanika. Istraživanje je planirano i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a na osnovu odobrenja Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu. Svi pacijenti sa KSB podvrgnuti su postupku koronarne angiografije kako bi se procenila težina koronarnog oboljenja. Zavisno od toga da li u najmanje jednom od tri koronarna krvna suda postoji smanjenje lumena veće ili jednako 50% pacijenti su podeljeni u dve grupe: pacijenti bez značajne stenozе i pacijenti sa značajnom stenozom. Debljina intime-medije karotidnih arterija određena je ultrazvučnom tehnikom u grupi zdravih ispitanika i grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi. Koncentracija cirkulišućeg adiponektina određena je u uzorcima plazme ELISA metodom. Mononuklearne ćelije periferne krvi izolovane su upotrebom gustinskog gradijenta, nakon čega su iz njih izolovane ukupne ribonukleinske kiseline (RNK) gvanidin izotiocijanat-fenol-hloroformskom ekstrakcijom. Nivo informacione RNK (iRNK) adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 određen je *real-time PCR* metodom. Ostali biohemijski parametri su određeni rutinskim laboratorijskim metodama: glukoza, ukupan holesterol (UH) i trigliceridi (TG) enzimskim metodama; HDL-holesterol (HDL-h) enzimskom metodom nakon precipitacije sa fosfovolframovom kiselinom u prisustvu jona Mg^{2+} ; LDL-holesterol (LDL-h) Friedwald-ovom formulom ili direktnim homogenim testom. Koncentracija C-reaktivnog proteina visoke osetljivosti (hsCRP) određena je na biohemijskom analizatoru imuno-turbidimetrijskom metodom, dok je koncentracija insulina određena metodom elektrohemiluminiscencije. Nivo insulinske rezistencije je kvantifikovan preko vrednosti HOMA IR indeksa (*homeostatic model assessment*).

U poglavlju **Rezultati** najpre su prikazani osnovni demografski i biohemijski parametri za sve ispitanike: zastupljenost pola, starost, BMI, sistolni pritisak, dijastolni pritisak, UH, HDL-H, LDL-H, TG, glukoza, insulin, HOMA IR indeks, hsCRP. U grupi zdravih ispitanika i pacijenata sa HBI na hemodijalizi pored navedenih biohemijskih parametara prikazani su podaci o debljini intime-medije krvnih sudova (IMT) kao i koncentracije kreatinina i ureje. U grupi pacijenata sa

KSB prikazana je zastupljenost terapije lekovima iz grupe statina, ACE inhibitora, β -blokatora i diuretika.

Zatim je prikazano poređenje nivoa cirkulišućeg adiponektina između zdravih ispitanika i pacijenata sa KSB sa i bez značajne stenozе, kao i između ove dve grupe pacijenata. Takođe, prikazano je poređenje nivoa cirkulišućeg adiponektina između zdravih ispitanika i pacijenata sa HBI na hemodijalizi.

U sledećoj fazi analizirani su nivoi iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u grupi zdravih ispitanika i grupi pacijenata sa KSB sa i bez značajne stenozе, kao i između ove dve grupe pacijenata. Izvršena je analiza nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 u grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi i poređenje u odnosu na zdrave ispitanike.

Postojanje potencijalnih veza između koncentracije cirkulišućeg adiponektina, nivoa genske ekspresije adiponektinskih receptora i lipidnih i nelipidnih faktora rizika ispitivano je korelacionom analizom u sve tri grupe ispitanika posebno.

U cilju dalje analize povezanosti koncentracije adiponektina sa nivoima genske ekspresije adiponektinskih receptora, parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije, u svim ispitivanim grupama izvršena je podela ispitanika prema koncentraciji adiponektina na one koji imaju visoku i nisku koncentraciju adiponektina. S obzirom na nepostojanje adekvatnih referentnih opsega za koncentraciju adiponektina, iz raspodele vrednosti za svaku posmatranu grupu određena je ona koncentracija adiponektina koja odgovara 75 percentilu i korišćena kao granična. Kako bi se ispitala povezanost visokih koncentracija adiponektina sa nivoima iRNK adiponektinskih receptora, parametrima lipidnog statusa, homeostaze glukoze i inflamacije u odnosu na koncentraciju adiponektina posmatrani su sledeći parametri: nivo iRNK AdipoR1, nivo iRNK AdipoR2, UH, HDL-H, LDL-H, TG, insulin, HOMA IR indeks, hsCRP.

U cilju ispitivanja vezu između telesne mase ispitanika, nivoa cirkulišućeg adiponektina i iRNK adiponektinskih receptora, izvršena je podela ispitanika prema vrednostima BMI. U grupi zdravih ispitanika i grupi pacijenata sa KSB kao granična vrednost za BMI je uzeta vrednost od 25 kg/m^2 . Međutim, uzimajući u obzir uzak raspon vrednosti BMI u grupi pacijenata sa HBI, uticaj telesne mase nije bilo moguće proceniti podelom pacijenata prema graničnoj vrednosti BMI od 25 kg/m^2 . Zbog toga su iz raspodele vrednosti BMI prethodno ustanovljene vrednosti koje odgovaraju 33 i 66 percentilu prema kojima su pacijenti sa HBI podeljeni u tri grupe.

Kako pol predstavlja značajan faktor uticaja na koncentraciju cirkulišućeg adiponektina, ispitano je da li postoje značajne razlike u nivoima adiponektina između muškaraca i žena u svim posmatranim grupama.

Zdravi ispitanici i pacijenti sa KSB su podeljeni prema pušačkom statusu, a zatim je u svakoj od dve grupe ispitanika posebno izvršena analiza koncentracije adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2.

Da bi se ispitalo eventualno postojanje uticaja pojedinih lekova na koncentraciju adiponektina i nivoa iRNK adiponektinskih receptora, izvršena je podela posmatranih pacijenata sa KSB prema tome da li njihova terapija obuhvata lekove iz grupe statina ili ACE inhibitora.

Na kraju disertacije, dati su **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

B. ANALIZA REZULTATA

Grupa zdravih ispitanika je po polu bila podudarna sa pacijentima. S druge strane, zdravi ispitanici su bili značajno mlađi u odnosu na pacijente bez i sa značajnom stenozom, dok su vrednosti BMI bile značajno niže u grupi zdravih ispitanika u odnosu na pacijente sa značajnom stenozom. Dalja analiza zahtevala je korekciju koncentracije adiponektina za vrednosti BMI i starost. Vrednosti SP i DP nisu se značajno razlikovali između ispitanika. Zdravi ispitanici imali su više vrednosti HDL-H u odnosu na obe grupe pacijenata sa KSB, dok razlike u vrednostima UH i LDL-H nisu bile značajne. Niže vrednosti TG, glukoze, insulina i HOMA IR indeksa zdravi ispitanici imali su samo u odnosu na pacijente sa značajnom stenozom. Obe grupe pacijenata sa KSB imale su značajno više vrednosti hsCRP u odnosu na zdrave ispitanike. Međusobnim poređenjem pacijenta sa KSB uočeno je da su pacijenti sa značajnom stenozom imali značajno više vrednosti BMI i koncentracije insulina u odnosu na pacijente bez značajne stenozе. Veliki broj ispitivanih pacijenata je bio na terapiji jednim ili više lekova, iz grupe: statina, ACE inhibitora, β -blokatora i diuretika. Međutim, statistička analiza je pokazala da između pacijenata sa KSB sa i bez značajne stenozе nema razlike u zastupljenosti pojedinih lekova u terapiji.

Zdravi ispitanici su bili značajno mlađi i imali značajno više vrednosti BMI u odnosu na pacijente sa HBI na hemodijalizi te je i ovde dalja analiza zahtevala korekciju za vrednosti ova

dva parametra. S druge strane, pacijenti sa HBI na hemodijalizi su bili upareni po polu sa grupom zdravih ispitanika. Očekivano, koncentracije ureje i kreatinina bile su višestruko povećane u grupi pacijenata, kao i vrednosti TG, insulina, hsCRP i IMT, dok su vrednosti HDL-H bile značajno snižene. Zdravi ispitanici imali su nešto više vrednosti UH u odnosu na pacijente, a koncentracije LDL-H nisu se značajno razlikovale.

Pacijenti sa KSB bez i sa značajnom stenozom imali su značajno više nivoe cirkulišućeg adiponektina u odnosu na zdrave ispitanike, dok razlika u koncentraciji adiponektina između pacijenata sa KSB nije bila značajna. Nivo iRNK AdipoR1 je bio značajno niži kako u grupi pacijenata sa KSB sa značajnom stenozom, tako i u grupi pacijenata sa KSB bez značajne stenozе u odnosu na zdrave ispitanike, dok razlike u nivou iRNK AdipoR2 nisu bile značajne. Takođe, nije bilo značajne razlike u nivoima iRNK AdipoR1 i AdipoR2 između pacijenata sa i bez značajne stenozе. Pacijenti sa HBI na hemodijalizi su imali značajno više koncentracije cirkulišućeg adiponektina u odnosu na zdrave ispitanike, kao i značajno niže vrednosti iRNK AdipoR1, dok razlike u nivoima iRNK AdipoR2 nije bilo.

U grupi zdravih ispitanika adiponektin je pozitivno korelirao sa HDL-H, a negativno sa BMI, sistolnim pritiskom, TG, insulinom, HOMA IR indeksom, hsCRP i kreatininom. Nivoi iRNK AdipoR1 negativno su korelirali sa starošću i pozitivno sa nivoima iRNK AdipoR2. U grupi pacijenata sa KSB uočena je značajna negativna korelacija između koncentracije adiponektina i vrednosti BMI, glukoze, insulina, HOMA IR indeksa. Nivoi iRNK AdipoR1 su negativno korelirali sa starošću pacijenta sa KSB i pozitivno sa nivoima iRNK AdipoR2. U grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi uočena je značajna pozitivna korelacija između koncentracije adiponektina i koncentracije HDL-H, a značajna negativna korelacija sa koncentracijama TG, hsCRP, insulina i kreatinina. U ovoj grupi pacijenata takođe je uočena i značajna negativna korelacija između nivoa iRNK AdipoR1 i koncentracije insulina.

Zdravi ispitanici sa visokim vrednostima adiponektina imali su značajno više vrednosti HDL-H, kao i značajno niže vrednosti insulina i HOMA IR indeksa u odnosu na zdrave ispitanike koji su imali niže koncentracije adiponektina, dok ovakva povezanost nije uočena kod pacijenata sa KSB. Pacijenti sa HBI na hemodijalizi koji su imali visoke vrednosti adiponektina takođe su imali značajno više vrednosti HDL-H i značajno niže vrednosti insulina u odnosu na pacijente sa nižim vrednostima adiponektina.

Zdravi ispitanici sa vrednostima BMI iznad 25 kg/m² imali su značajno niže vrednosti adiponektina u odnosu na zdrave ispitanike sa vrednostima BMI ispod kritične. Ovakva veza između telesne mase i koncentracije adiponektina nije uočena kod pacijenata sa KSB i pacijenata sa HBI na hemodijalizi. Pacijenti sa KSB koji sa vrednostima BMI iznad 25 kg/m² imali su značajno niže nivoe iRNK AdipoR1 u odnosu na pacijente sa vrednostima BMI ispod navedene granice, dok ovakva povezanost nije pronađena u grupi zdravih ispitanika i grupi pacijenata sa HBI na hemodijalizi. Takođe, nije uočena značajna veza između indeksa telesne mase i nivoa iRNK AdipoR2 ni u jednoj od posmatranih grupa.

Osobe ženskog pola u sve tri ispitivane grupe imale su značajno višu koncentraciju adiponektina u odnosu na osobe muškog pola, a razlika ostala je značajna i nakon korekcije za vrednosti BMI. U grupi zdravih ispitanika uočeno je da žene imaju značajno niže nivoe iRNK AdipoR2 u odnosu na muškarce, dok u druge dve grupe ispitanika slična veza nije uočena.

Terapija statinima, ACEI i pušenje nisu značajno uticali na nivoe cirkulišućeg adiponektina i iRNK adiponektinskih receptora.

C. ZAKLJUČAK

Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije čak 75 % svih smrtnih ishoda predstavlja posledicu kardiovaskularnih bolesti (KVB) u čijoj osnovi leži ateroskleroza. Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ iz 2009. godine KVB u Srbiji su bile uzročnik smrtnosti u 54,6% slučajeva, od čega 23% otpada na smrtnost izazvanu koronarnom srčanom bolešću (KSB). S druge strane, povećan rizik za razvoj KVB često je sastavni deo kliničke slike patoloških stanja koja nisu direktno vezana za disfunkciju kardiovaskularnog sistema. HBI predstavlja bolest koju prate izuzetno teška i progresivna ateroskleroza i smatra se da čak 50% pacijenata sa HBI umre od komplikacija KVB. Kako ispitivanje tradicionalnih faktora rizika za razvoj KVD ne daje dovoljno jasnu sliku o toku aterosklerotskog procesa, današnja istraživanja okreću se otkrivanju novih parametara koji bi dopunili saznanja o nastanku i razvoju ateroskleroze, te u kombinaciji sa tradicionalnim faktorima rizika omogućili efikasniju prevenciju i terapiju KVB.

Adiponektin predstavlja jedan od najznačajnijih molekula iz grupe adipokina koji preko svojih receptora AdipoR1 i AdipoR2 ostvaruje antiinflamatorno, antiapoptotsko, antiaterosklerotsko i kardioprotektivno dejstvo. Međutim, rezultati dosadašnjih studija na pacijentima sa KSB i HBI sugerišu da su povišene vrednosti adiponektina kod ovih pacijenata udružene sa povećanim rizikom od smrtnosti što može biti posledica nemogućnosti adiponektina da ostvari svoje efekte usled pojave adiponektinske rezistencije. U našem istraživanju utvrđeno je da je povišena koncentracija adiponektina udružena sa nishodnom regulacijom AdipoR1 kod pacijenata sa KSB i pacijenata sa HBI, što ukazuje da bi povećanje koncentracije adiponektina, bar delimično, moglo biti posledica kompenzatornog mehanizma kojim organizam pokušava da se izbori sa nedostatkom njegovih efekata i potvrđuje značaj istovremenog određivanja koncentracije cirkulišućeg adiponektina i genske ekspresije njegovih receptora. Smanjen nivo genske ekspresije AdipoR1 uočen je kako kod pacijenata sa KSB sa značajnom stenozom, tako i kod pacijenata sa KSB bez značajne stenozе što sugeriše da bi se gubitak adiponektinskih efekata uslede adiponektinske rezistencije mogao javiti još u ranim fazama ateroskleroze. Uočena povezanost nishodne regulacije AdipoR1 sa visokim vrednostima BMI kod pacijenata sa KSB i visokim vrednostima insulina kod pacijenata sa HBI sugeriše da su gojaznost, insulinska i rezistencija i nedostatak zaštitnih efekata adiponektina deo jednog začaranog kruga, što bi trebalo imati u vidu pri izradi novih smernica za prevenciju razvoja KSB.

D. OBJAVLJENI REZULTATI

RADOVI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. **Sopić M**, Joksić J, Spasojević-Kalimanovska V, Kalimanovska-Oštrić D, Anđelković K, Jelić-Ivanović Z. Are decreased AdipoR1 mRNA levels associated with adiponectin resistance in coronary artery disease patients? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2015 Apr 1;42(4):331-6. (IF 2,372; rang časopisa M22 (41/83) u kategoriji Physiology)
2. **Sopić M**, Joksić J, Spasojević-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojević N, Simić-Ogrizović S, Kravljača M, Jelić-Ivanović Z. Downregulation of AdipoR1 is associated with increased circulating adiponectin in chronic kidney disease patients. *Journal of Medical Biochemistry*;

Manuscript accepted 19.1.2016. (IF 1,045; rang časopisa M23 (277/290) u kategoriji Biochemistry and Molecular Biology)

OSTALI RADovi:

1. Petrovic S, Bogavac-Stanojevic N, Peco-Antic A, Ivanisevic I, Kotur-Stevuljevic J, Paripovic D, **Sopic M**, Jelic-Ivanovic Z. Clinical application neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 as indicators of inflammation persistence and acute kidney injury in children with urinary tract infection. *BioMed research international*. 2013 Jul 9;2013. (IF 1,579; rang časopisa 85/123 u kategoriji Medicine, Research and Experimental)
2. Vujovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Kotur-Stevuljevic J, **Sopic M**, Stefanovic A, Baralic I, Djordjevic B, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S. Lymphocyte Cu/ZnSOD and MnSOD gene expression responses to intensive endurance soccer training. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2013 Jan 1;27(3):3843-7. (IF 0,379; rang časopisa 152/165 u kategoriji Biotechnology and applied Microbiology)
3. **Sopić M**, Bogavac-Stanojević N, Baralić I, Kotur-Stevuljević J, Đorđević B, Stefanović A, Jelić-Ivanović Z. Effects of short-and long-term physical activity on DNA stability and oxidative stress status in young soccer players. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. 2014 Jun;54(3):354-61. (IF 0,972; rang časopisa 60/81 u kategoriji Sport Sciences)
4. Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Stefanovic A, Gojkovic T, Joksic J, **Sopic M**, Gulan B, Janac J, Milosevic S. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis*. 2015 Jul 31;241(1):192-8. (IF 3,994; rang časopisa 11/60 u kategoriji Peripheral Vascular Disease)
5. Joksić J, **Sopic M**, Spasojevic-Kalimanovska V, Kalimanovska-Ostric D, Andjelkovic K, Jelic-Ivanovic Z. Circulating resistin protein and mRNA concentrations and clinical severity of coronary artery disease. *Biochemia medica*. 2015 Jun 15;25(2):242-51. (IF 2,667; rang časopisa 7/30 u kategoriji Medical Laboratory Technology)
6. Joksić J, **Sopić M**, Spasojević-Kalimanovska V, Gojković T, Zeljković A, Vekić J, Andjelkovic K, Kalimanovska-Oštrić D, Jelić-Ivanović Z. Higher circulating resistin

protein and PBMCs resistin mRNA levels are associated with increased prevalence of small dense LDL particles in coronary artery disease patients. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2016 Jan 1;43(1):22-8. (IF 2,372; rang časopisa 41/83 u kategoriji Physiology)

7. Pavlović B, Milosavljević J, Zeljković A, Vekić J, Joksić J, Sopić M, Spasojević-Kalimanovska V, Paripović D, Peco-Antić A, Miloševski-Lomić G, Jelić-Ivanović Z. Rezistin, inflamacija i dislipidemija kod gojazne dece i adolescenata. *Arhiv za farmaciju*. 2015 Jan;65(2):115-28. (IF 0; časopis od nacionalnog značaja)

E. MIŠLJENJE I PREDLOG

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Uporedna analiza koncentracije cirkulišućeg adiponektina i nivoa genske ekspresije adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2, koja je prikazana u ovom radu, ima praktičnu primenu u tumačenju njihovog dijagnostičkog značaja u koronarnoj srčanoj bolesti i hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u dva rada u međunarodnim časopisima kategorije M22 i M23.

Stoga predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom "**Određivanje genske ekspresije adiponektinskih receptora AdipoR1 i AdipoR2 i nivoa adiponektina u krvi kod pacijenata sa koronarnom srčanom bolešću i pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom**", kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Mirona Sopića.

Beograd, 16.3.2016.

1. dr Zorana Jelić-Ivanović (mentor), red. profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

2. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska (mentor), red.
profesor Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

3. dr Gordana Joksić, naučni savetnik Instituta za
nuklearne nauke „Vinča“
