

## NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 12.09.2019. godine, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom "Ispitivanje biomarkera homeostaze holesterola i metabolizma vitamina D kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom" kandidata magistra farmacije-medicinskog biohemičara Vladimirov Sandre, istraživača-pripravnika na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u sastavu:

1. Dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, mentor, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Dr Aleksandra Zeljković, mentor, vanredni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Dr Zorana Jelić-Ivanović, profesor emeritus Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. Dr Bratislav Trifunović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane 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 180 strana, ima 63 tabela, 58 slika i 264 literaturna navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod, Cilj, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura.

**Cilj** ove doktorske disertacije bio je razvoj i validacija metode tačne hromatografije sa tandem masenom detekcijom (HPLC-MS/MS) za određivanje koncentracija neholesterolskih sterola (NHS) u serumu i serumskoj frakciji lipoproteina visoke gustine (HDL), kao i metode za određivanje koncentracija 25(OH)D3 i 24,25(OH)<sub>2</sub>D3 u serumu, te analiza statusa ovih

parametara kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (CRC) i zdravih ispitanika. U poređnom analizom koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji, kao i njihovih odnosa, kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika, cilj je bio utvrditi da li postoje poremećaji homeostaze holesterola kod pacijenata sa CRC. Takođe, ispitivane su i eventualne razlike u posmatranim parametrima koje se javljaju u odnosu na patološke karakteristike CRC, pol i prisustvo gojaznosti. Pored toga, jedan od ciljeva je bio i ispitivanje veze između metabolizma holesterola i metabolizma vitamina D kod pacijenata sa CRC i zdrave populacije. Dodatno, cilj je bio i procena potencijala markera homeostaze holesterola, kao i markera statusa vitamina za predikciju nastanka CRC.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeni su podaci o ispitanicima uključenim u studiju, kao i primenjenim metodama. U istraživanju je učestvovalo 215 ispitanika, od toga 101 pacijent sa dijagnozom CRC i 114 zdravih ispitanika. Dijagnoza CRC je potvrđena, i karakteristike prisutnog kancera su određene, nakon analize post-operativnog patohistološkog preparata. Pacijenti su stratifikovani u sledeće grupe: karcinom kolona (CA kolona) i karcinom rektuma (CA rektuma); gradus I i objedinjeni gradusi II i III; stadijumi A i B; i stadijumi C i D. Zdravi ispitanici koji su činili kontrolnu grupu su selektovani nakon detaljnog ispitivanja zdravstvenog stanja tokom sistematskog pregleda, te analize podataka o ličnoj i porodičnoj anamnezi, odsustvu bilo kojih akutnih i hroničnih malignih i nemalignih bolesti, odsustvu terapije koja bi mogla da utiče na lipidni status ili status vitamina D. Svi ispitanici su dodatno bili stratifikovani prema polu i vrednostima indeksa telesne mase (ITM), tako da su jednu grupu činile osobe sa vrednostima  $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ , a drugu grupu osobe sa  $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ . Istraživanje je dizajnirano kao opservaciona, slučaj-kontrola studija i planirano je i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Helsinškom deklaracijom, i na osnovu odobrenja Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Etičkog odbora za klinička ispitivanja Vojnomedicinske akademije. Ispitanici su anketirani korišćenjem upitnika koji je osmišljen i sastavljen za potrebe ove studije, a u svrhu dobijanja podataka o demografskim i antropometrijskim karakteristikama ispitivanih populacija. Potom su ispitanicima uključenim u ovo istraživanje određene koncentracije osnovnih biohemijskih parametara (albumin i ukupni proteini), kao i osnovnih lipidnih parametara (ukupnog holesterola (UH), sadržanog u lipoproteinima niske gustine (*engl. low-density lipoprotein* - LDL-h), holesterola sadržanog u HDL (HDL-h) i triglicerida (TG)), rutinskim metodama aplikovanim na biohemijskom analizatoru. Značajan deo izrade ove doktorske disertacije odnosio se na razvoj metoda za kvantitativnu analizu markera

statusa vitamina D i homeostaze holesterola korišćenjem LC-MS/MS tehnike. U postupku uvođenja pomenutih metoda, korišćeni su uzorci *pool*-a seruma dobijeni od 20 zdravih dobrovoljaca, a određivani su markeri sinteze holesterola (dezmosterol, latosterol) i apsorpcije holesterola (kampesterola i  $\beta$ -sitosterola) u serumu i HDL serumskoj frakciji, kao i metaboliti vitamina D (7-dehidroholesterol, 25(OH)D3 i 24,25(OH)<sub>2</sub>D3). HDL frakcija za analizu NHS je dobijena upotrebom komercijalnog taložnog reagensa. Obe metode su validirane prema smernicama aktuelnog vodiča Agencije za hranu i lekove (*engl. Food and drug administration* - FDA). Za svaku metodu određeni su linearnost, limiti detekcije i kvantifikacije, preciznosti unutar serije i između serija, kao i tačnost - *recovery* testom. Validirane metode su primenjene za analiziranje koncentracija pomenutih NHS u serumu i HDL frakciji, kao i metabolita vitamina D kod pacijenata sa CRC i zdravih ispitanika. U odeljku Materijal i metode, prikazani su i načini izračunavanja vrednosti ITM, odnosa metabolita vitamina D (*engl. vitamin D metabolite ratio* - VDMR) kao i indeksa homeostaze holesterola, izvedenih na osnovu dobijenih koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji. Dodatno, koncentracije vitamin D vezujućeg proteina (*engl. vitamin D binding protein* - VDBP) u serumu određene su komercijalnim imuno-enzimskim testom (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA). Većina poređenja je izvršeno upotrebom neparametarskog Mann-Whitney U testa, te su rezultati predstavljani kao vrednosti medijana i interkvartilnih raspona, dok su rezultati korelacija obrađeni Spearmanovom korelacionom analizom. Prediktivni potencijal ispitivanih markera je procenjen logističkom regresijom i analizom ROC krivih.

U poglavlju **Rezultati**, prvo su prikazani rezultati koji se odnose na razvoj metode za određivanje NHS u serumu i HDL frakciji, te rešavanje problema interferencija uzrokovanih matriksom, optimizaciju kalibracionih krivih i validaciju sa kliničkom primenom metode. Kada je reč o metodi za određivanje metabolita vitamina D, prikazani su rezultati optimizacije preanalitičkih i analitičkih uslova i validacije metode. Zatim su u rezultatima prikazane i razlike između pacijenata i zdravih ispitanika u odnosu na vrednosti osnovnih demografskih, antropometrijskih i biohemijskih parametara. Dve grupe su poređene prema starosti, ITM, koncentracijama ukupnih proteina i albumina u serumu, te koncentracijama UH, LDL-h i HDL-h. Potom su prikazani rezultati i za poređenja koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji između dve grupe, njihovih apsolutnih i relativnih vrednosti kao i vrednosti zbirnih koncentracija markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji. Nakon toga, prikazane su i razlike u vrednostima indeksa homeostaze holesterola između dve ispitivane

grupe. Sledeći deo poglavlja **Rezultati** je posvećen detaljnoj analizi statusa homeostaze kod zdravih osoba. Prvo su prikazani rezultati korelacione analize apsolutnih koncentracija svih NHS u serumu i HDL frakciji kao i indeksa homeostaze holesterola sa osnovnima antropometrijskim karakteristikama i biohemijskim parametrima. U sledećem odeljku koji se takođe bavi rezultatima dobijenih kod zdravih ispitanika, prikazane su razlike između antropometrijskih, biohemijskih i lipidnih parametara, apsolutnih i relativnih koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji, kao i indeksa homeostaze holesterola u odnosu na pol i ITM. Iste analize su izvedene i za pacijente sa CRC. Dodatno, za grupu pacijenata prikazane su i razlike u svim pomenutim parametrima između pacijenata sa kancerom kolona i kancerom rektuma, kao i razlike u odnosu na gradus i stadijum bolesti. Deo poglavlja **Rezultati** koji je posvećen ispitivanju biomarkera homeostaze holesterola zaključen je rezultatima analize prediktivnog potencijala svih ispitivanih markera sinteze i apsorpcije holesterola, kao i procenom dijagnostičke tačnosti markera sa najistaknutijim potencijalom za predviđanje prisustva CRC. Ostatak odeljka **Rezultati** posvećen je analizi statusa vitamina D kod dve ispitivane populacije. Najpre su prikazane razlike u koncentracijama određivanih metabolita vitamina D u serumu, kao i VDMR i VDBP, kod zdravih ispitanika i pacijenata sa CRC. Takođe, prikazani su i rezultati ispitivanja uticaja godišnjeg doba na parametre statusa vitamina D za obe ispitivane populacije. Potom su navedne razlike u koncentracijama metabolita vitamina D i VDBP, kao i vrednostima VDMR, u odnosu na pol i ITM zdravih ispitanika. Iste analize su izvedene i za pacijente sa CRC, kod kojih su dodatno navedene i razlike u odnosu na prisustvo CA kolona ili rektuma, te gradusa i stadijuma bolesti. U sledećem delu poglavlja **Rezultati** prikazane su korelacije između parametara metabolizma holesterola (koncentracije UH, LDL-h, HDL-h, TG, dezmosterola, latosterola, kampesterola,  $\beta$ -sitosterola) i statusa vitamina D (koncentracija 7-dehidroholesterola (7-DHC), 25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, VDBP, i vrednosti VDMR) kod zdravih ispitanika i kod pacijenata sa CRC. Dodatno, prikazane su i promene u parametrima statusa vitamina D u odnosu na koncentraciju UH kod pacijenata sa CRC. Dalje su prikazani rezultati analize potencijala markera statusa vitamina D u predikciji prisustva CRC, kao i predikciji prisustva visokog gradusa bolesti.

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

## B. Opis dobijenih rezultata

Prilikom razvoja metode za kvantifikaciju NHS u serumu i HDL frakciji primećena je značajna interferencija koja potiče od holesterola u lipidnom ekstraktu i uzrokuje nezadovoljavajuću tačnost metode. Rezultati linearne regresione analize su potvrdili da je rastvor holesterola napogodniji surogat matriks za pripremu kalibracionih krivih. Linearna regresiona analiza za poređenje različitih koncentracija rastvora holesterola kao surogat matriksa je pokazala da se rezultati dobijeni za ispitivane analite razlikuju u odnosu na različite koncentracije holesterola prisutne u uzorku, te je koncentracije holesterola za pripremu kalibracionih krivih bilo je neophodno prilagoditi očekivanoj koncentraciji holesterola u ispitivanim uzorcima. Nakon, rešavanja ovog problema, metoda je uspešno validirana, a svi parametri validacije, uključujući i *recovery*, zadovoljili su zahteve FDA vodiča. Pored toga, metoda za kvantifikaciju metabolita vitamina D u serumu je takođe uspešno razvijena i validirana.

Pacijenti sa CRC su bili stariji od ispitanika koji su činili kontrolnu grupu, dok se vrednosti ITM nisu razlikovale između ove dve grupe. Svi ispitivani biohemijski i lipidni parametri bili su niži kod pacijenata sa CRC u odnosu na zdrave ispitanike. Apsolutne i relativne koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu, kao i njihove zbirne koncentracije su bili značajno niži kod pacijenata sa CRC u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe su i apsolutne i relativne koncentracije markera sinteze, njihove zbirne koncentracije kao i apsolutne i zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji bile niže kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, kada su u pitanju relativne koncentracije markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji, razlike između pacijenata i zdravih ispitanika nije bilo. Odnos koncentracija dezmosterola i latosterola u serumu i HDL frakciji bio je niži kod pacijenata sa CRC u odnosu na zdrave ispitanike. Odnos zbirnih koncentracija markera sinteze i zbirnih koncentracija markera apsorpcije u serumu bio je viši kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike, dok razlika kada je u pitanju ovaj odnos u HDL frakciji između dve ispitivane populacije nije bilo. Svi odnosi koncentracija NHS u HDL frakciji i njihove koncentracije u serumu bili su viši kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u odnosu na zdrave ispitanike. Kod zdravih osoba, odnos koncentracija dezmosterola i latosterola u serumu je pozitivno korelirao sa HDL-h, dok su zbirne koncentracije markera sinteze u serumu bile u obrnutoj korelaciji sa koncentracijom HDL-h i pozitivnoj sa koncentracijama LDL-h i TG. Zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola u serumu su bile u direktnoj korelaciji sa koncentracijama HDL-h, LDL-h i UH. U

grupi zdravih ispitanika uočene su razlike po polu u koncentracijama markera sinteze i markera apsorpcije holesterola u serumu, te su markeri sinteze bili viši, a markeri apsorpcije niži kod muškaraca. U HDL frakciji, apsolutne koncentracije markera sinteze se nisu razlikovale između polova, dok su markeri apsorpcije bili viši kod osoba ženskog pola. Odnos koncentracija dezmosterola i latosterola u serumu, bio je viši kod osoba ženskog pola. Odnosi zbirnih koncentracija markera sinteze holesterola i zbirnih koncentracija markera apsorpcije holesterola u serumu i u HDL frakciji, bili su viši kod osoba muškog pola. Udeli NHS u HDL frakciji u odnosu na njihovu koncentraciju u serumu se uglavnom nisu razlikovali između polova, jedno je odnos koncentracija latosterola u HDL frakciji i ukupne koncentracije latosterola u serumu bio viši kod žena. U zdravoj populaciji, jedno su apsolutna i relativna koncentracija dezmosterola bile više kod osoba sa  $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ , dok su apsolutne i relativne koncentracije oba markera apsorpcije holesterola u serumu bile više kod osoba sa  $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ . U HDL frakciji, apsolutne i relativne koncentracije kampesterola su bile više kod osoba sa  $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ , dok su u istoj grupi apsolutne i relativne koncentracije  $\beta$ -sitosterola kao i zbirne koncentracije markera apsorpcije holesterola bile niže. Odnos koncentracija dezmosterola i latosterola u HDL frakciji kao i udeo dezmosterola u HDL frakciji u odnosu na ukupnu koncentraciju dezmosterola u serumu bili su niži kod osoba sa  $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ . Kod pacijenata sa CRC, postoji pozitivna korelacija između svih NHS u serumu i koncentracija LDL-h, TG i UH, dok su samo markeri apsorpcije holesterola korelirali pozitivno sa HDL-h. Udeli NHS u HDL frakciji u odnosu na njihove koncentracije u serumu koreliraju negativno sa koncentracijama UH, TG i LDL-h. Između pacijenata sa CA kolona i pacijenata sa CA rektuma nije bilo razlika kada su u pitanju apsolutne i relativne koncentracije NHS u serumu i HDL frakciji. Jedino su zbirna koncentracija markera sinteze u HDL frakciji, kao i odnos zbirnih koncentracija markera sinteze i zbirnih koncentracija markera apsorpcije holesterola, bili značajno viši kod pacijenata sa CA kolona. Iako se apsolutne i relativne koncentracije NHS u serumu i HDL frakciji kao i njihove zbirne koncentracije nisu razlikovale u odnosu na gradus CRC, jedino je odnos koncentracija dezmosterola i latosterola u HDL frakciji bio značajno viši kod osoba sa CRC gradusa I. Kod pacijenata sa stadijumima A i B CRC relativne koncentracije markera apsorpcije holesterola i njihove zbirne koncentracije u HDL frakciji su bile niže u odnosu na ispitanike u stadijumima C i D ove bolesti. Pacijenti sa CRC muškog pola imali su više koncentracije dezmosterola u serumu, dok su žene imale više koncentracije markera apsorpcije u HDL frakciji. Pacijenti sa  $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$  su imali više koncentracije albumina i dezmosterola u serumu u odnosu na ispitanike sa  $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ . Ispitivanje korelacija između markera sinteze i apsorpcije holesterola kod zdravih osoba

pokazalo je da koncentracije markera sinteze negativno koreliraju sa koncentracijama markera apsorpcije holesterola u serumu. Koncentracije dezmosterola u HDL frakciji su pozitivno korelirale sa koncentracijama markera apsorpcije u HDL frakciji, dok su apsolutne koncentracije latosterola u HDL frakciji negativno korelirale sa koncentracijama markera apsorpcije u serumu, a relativne i sa koncentracijama markera apsorpcije u HDL frakciji. Kada je reč o pacijentima sa CRC, koncentracije dezmosterola su pozitivno korelirale sa koncentracijama  $\beta$ -sitosterola u serumu, dok su koncentracije latosterola negativno korelirale sa koncentracijama kampesterola u serumu. Koncentracije dezmosterola kao i latosterola u HDL frakciji pozitivno su korelirale sa markerima apsorpcije u HDL frakciji. Univarijantnom analizom dezmosterol i kampesterol su identifikovani kao značajni prediktori za nastanak CRC. Multivarijantna binarna logistička regresija je dodatno pokazala da ova dva markera zadržavaju nezavisan potencijal da predvide pojavu CRC, čak i u prisustvu tradicionalnih faktora rizika. ROC analiza je pokazala da dezmosterol i kampesterol pojedinačno, imaju dobru dijagnostičku tačnost prilikom identifikacije obolelih od CRC u odnosu na zdravu populaciju.

Analiza statusa vitamina D pokazala je da pacijenti koji boluju od CRC imaju značajno niže koncentracije 7-DHC, 25(OH)D<sub>3</sub>, VDBP i vrednosti VDMR u odnosu na zdrave ispitanike. Kod zdravih ispitanika koncentracije 25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> su bile značajno više kod osoba koje se bile uključene u studiju tokom letnje sezone u odnosu na osobe koje su u studiju bile uključene tokom zimske sezone. Kod pacijenata sa CRC, međutim nije zapažena razlika u koncentraciji ispitivanih parametara statusa vitamina D u odnosu na godišnje doba tokom kojeg su bili uključeni u studiju. U kontrolnoj grupi nije bilo razlika u koncentracijama parametara statusa vitamina D u odnosu na pol i ITM. Sa druge strane, u grupi pacijenata sa CRC, koncentracije VDBP u serumu su bile više kod muškaraca u odnosu na žene, dok razlika u odnosu na vrednost ITM nije bilo. Pacijenti sa CA kolona imali su više koncentracije 7-DHC i niže koncentracije VDBP u serumu. Uočena je i razlika u koncentracijama 25(OH)D<sub>3</sub> u odnosu na gradus CRC i to, povišene koncentracije ovog parametra kod pacijenata sa nižim gradusom. Dodatno, uočeno je i da pacijenti sa gradusom I imaju značajno niže koncentracije 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u odnosu na pacijenate sa gradusom II. Dodatno, koncentracije VDBP su bile više kod pacijenata sa CRC stadijuma A i B u odnosu na pacijente kod kojih su ustanovljeni stadijumi C i D. Kod zdravih osoba uočena je pozitivna korelacija između koncentracija latosterola u serumu i koncentracija 25(OH)D<sub>3</sub>, dok su kod pacijenata sa CRC postojale pozitivne korelacije 7-DHC, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i

25(OH)D3 sa koncentracijama markera apsorpcije holesterola. Dodatno, kod pacijenata sa nižim koncentracijama UH u serumu, niže su bile i koncentracije 7-DHC, 25(OH)D3 i 24,25(OH)<sub>2</sub>D3 u serumu. Univarijantna logistička regresija pokazala je da niski nivoi 25(OH)D3, 24,25(OH)<sub>2</sub>D3 i VDMR imaju značajan potencijal za predviđanje pojave CRC, ali je jedino 25(OH)D3 zadržao svoj značaj nakon korekcije u odnosu na prisustvo tradicionalnih faktora rizika. S druge strane, koncentracija UH je prepoznata kao potencijalno značajan prediktor CRC u kombinaciji sa tradicionalnim faktorima rizika i 25(OH)D3 i VDMR. Pored toga, ova studija je pokazala da je samo 25(OH)D3 bio značajan faktor rizika za razvoj karcinoma visokog gradusa, kao i da se uočena značajnost zadržala nakon korekcije za starost, muški pol i ITM, a čak i nakon uključivanja UH u model za predikciju.

### **C. Uporedna analiza rezultata iz doktorske disertacije sa podacima iz literature**

Prema aktuelnim epidemiološkim podacima, CRC predstavlja maligno oboljenje visoke incidencije prevashodno u razvijenim zemljama, i među starijim stanovništvom [1]. Mnoge studije navode da je kompleksan splet uticaja faktora sredine osnova etiopatogenetskih promena koje se dovode u vezu sa nastankom i razvojem CRC [2]. Sa tim u vezi, aktuelne strategije suzbijanja incidencije ovog oboljenja usmerene su na prepoznavanje faktora rizika i posledično preventivno delovanje na nastanak oboljenja [3,4]. Značajno mesto u otkrivanju ranih biomarkera, kao i novih preventivnih i terapijskih pristupa zauzima i istraživanje metabolizma lipida [5]. Poznato je da je holesterol ključna gradivna komponenta ćelijskih membrana i lipidnih splavova, kao i da ima značajnu ulogu u intraćelijskoj signalizaciji i prekursor je mnogih biološki aktivnih jedinjenja [6, 7]. Danas je dostupno nekoliko metoda za evaluaciju metabolizma holesterola, od kojih mnoge podrazumevaju zametne postupke upotrebe radioizotopa [8, 9]. Sa druge strane, rezultati su pokazali da određivanje koncentracija neholesterolskih sterola (NHS) u serumu upotrebom hromatografskih tehnika, može pružiti validne informacije o efikasnosti procesa sinteze i apsorpcije holesterola i zadovoljiti potrebe kliničkih studija [10]. Međutim, poređenje rezultata kontrolnih uzoraka određivanih hromatografskim metodama i analiziranih istovremeno u više internacionalnih laboratorija, koje su sproveli Lütjohann i saradnici [11] potvrdilo je postojanje velikih varijacija u rezultatima. Rezultati ove doktorske disertacije takođe ukazuju na značaj rešavanja metodoloških problema kroz proces opsežne validacije. Efekat matriksa procenjen je u kombinaciji sa *recovery* studijom, i pokazao je da je prisustvo holesterola u lipidnom ekstraktu glavni izvor nezadovoljavajućeg prinosa analita iz uzorka. O značaju ovakvog pristupa govore i Huang i saradnici, predlažući da se procena efekata matriksa uradi upravo u



kombinaciji sa *recovery* studijom u cilju ispitivanja ukupne efikasnost analitičkog procesa [12]. Iako je poznato da se efekti matriksa ne mogu u potpunosti izbjeći tokom HPLC-MS analize [12], rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazali su da je moguće obezbediti optimalnu osetljivost metode neophodnu za određivanje NHS, kako u serumu tako i u HDL frakciji, upotrebom adekvatnog surogat matriksa. Metoda je validirana prema aktuelnim vodičima za validaciju bioanalitičkih metoda [13]. Uprkos tome što su NHS često korišćeni kao biomarkeri homeostaze holesterola u velikom broju istraživanja kardiovaskularnih bolesti [14], podaci o statusu ovih markera u malignim bolestima su oskudni. Analiza tradicionalnih lipidnih parametara kod pacijenata sa CRC, koja je sprovedena u sklopu izrade ove doktorske disertacije, pokazala je prisustvo značajne hipoholesterolemije kod ispitivanih pacijenata u odnosu na zdravu populaciju. Ova rezultat je u saglasnosti sa rezultatima studije Broitman i saradnika [7] koji dodatno iznose pretpostavku da se niža koncentracija holesterola može javiti i nekoliko godina pre detektovanja CRC, te da može predstavljati rani biohemijski marker kancerogeneze. Ding i saradnici [15] navode da se potrebe za holesterolom razlikuju u odnosu na vrstu ćelija i tkiva. U skladu sa tim, u ovoj doktorskoj disertaciji je izvedena pretpostavka da uočene snižene serumske koncentracije markera sinteze holesterola kod pacijenata sa CRC mogu da ukazuju na njegovo povećano iskorišćavanje unutar same maligne ćelije. Naime, i Chimento i saradnici navode da akumulacija holesterola predstavlja značajnu osobinu tumora [16], što ide u prilog gore pomenutim navodima. Mitsche i saradnici su dodatno pokazali da postoje razlike u zastupljenosti dva puta sinteze holesterola (Blochovog i Kandutsch–Russelovog) u različitim tkivima [17]. Ovaj literaturni podatak se može dovesti u vezu sa rezultatima izloženim u ovoj doktorskoj disertaciji, da se kod pacijenata sa CRC javlja dominacija dezmosterola u odnosu na latosterol u serumu te pretpostavljena favorizacija Blochovog puta sinteze holesterola u odnosu na Kandutsch–Russelov. Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa saznanjima o biološkim aktivnostima dezmosterola kao LXR agoniste i inhibitora SREBP ciljnih gena [18]. Dosadašnje studije su pokazale da tokom kancerogeneze najčešće dolazi do promena u koncentracijama HDL-h [19]. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da su kod pacijenata sa CRC prisutne niže koncentracije HDL-h, kao i da su apsolutne koncentracije svih ispitivanih NHS u HDL frakciji snižene. Iako kod obolelih od CRC nisu do sada ispitivane koncentracije NHS u HDL frakciji, rezultati studije Ketomaki i saradnici pokazali su da promene koncentracija NHS u lipoproteinima prate promene njihovih koncentracija u serumu kod zdrave dece i dece obolele od familijarne hiperholesterolemije [20]. Studija Yamauchi i saradnika je pokazala da HDL čestice imaju visok afinitet prema intraćelijski sintetisanom holesterolu u odnosu na holesterol

koji potiče iz LDL čestica. Pored toga, iz ekstrahepatičnih tkiva prekursori holesterola, dezmosterol i latosterol se transportuju na HDL čestice [21], te je prisustvo prekursora holesterola u HDL frakciji koje je opisano u rezultatima ove doktorske disertacije u saglasnosti sa ovim nalazima. Dodatno, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je, uprkos nižim koncentracijama HDL-h, udeo svakog pojedinačnog NHS na HDL česticama u odnosu na ukupne koncentracije pojedinačnih HNS u serumu veći kod pacijenata sa CRC. Ovi rezultati ukazuju na to da se kod pacijenta u većoj meri prekursori holesterola distribuiraju u HDL čestice iz perifernih tkiva, kao i da se javlja povišena apsorpcija holesterola i fitosterola posredstvom HDL čestica, te da opisani mehanizmi uzrokuju mobilizaciju holesterola iz svih dostupnih izvora u cilju zadovoljavanja potreba malignog tkiva za holesterolom. Ova pretpostavka je podržana i rezultatima drugih studija koje su pokazale da ćelije kancera eksprimiraju SR-B1 receptore preko kojih se vrši preuzimanje holesterola iz HDL čestice u maligne ćelije [22]. Poznato je da se osnovni mehanizam regulacije sinteze holesterola odvija posredstvom negativne povratne sprege [23], što je u saglasnosti sa pretpostavkama iznesenim u ovoj doktorskoj disertaciji da organizam na niske koncentracije holesterola u cirkulaciji odgovara povišenom sintezom holesterola u svim perifernim tkivima, koja rezultira primećenim povećanim efluksom prekursora sinteze holesterola na HDL. Kod zdravih osoba uključenih u ovu studiju primećena je dobra očuvanost homeostaze holesterola. Kod pacijenata sa CRC, niske koncentracije holesterola u cirkulaciji uzrokuju povećanu i sintezu i apsorpciju holesterola, što se ogleda u povećanom prisustvu kako markera sinteze, tako i markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji. Van der Sijp i saradnici su ukazali na to da se tkiva kolona i rektuma međusobno u značajnoj meri razlikuju [24]. Takođe, i rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da postoji razlika u metabolizmu holesterola između CA kolona i CA rektuma, te da je proces sinteze holesterola intenzivniji kod pacijenata sa CA kolona. Studija Rodriguez i saradnika [25] je pokazala da dezmosterol ima značajnu ulogu u procesima ćelijske diferencijacije, naročito u tkivima sa visokim proliferativnim potencijalom. Ovo je potvrđeno i rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji. Pacijenti sa gradusom I imali su više koncentracije dezmosterola u odnosu na latosterol u HDL frakciji.

Studije su pokazale da postoji pozitivna korelacija između koncentracija dezmosterola i latosterola sa ITM [26], kao i da je dezmosterol povišen kod gojaznih osoba [27], što potvrđuju i rezultati ove doktorske disertacije. Studija Simonen i saradnika je pokazala da je udeo latosterola u HDL česticama niži kod osoba sa normalnom telesnom masom [28] u

odnosu na gojazne osobe, tako da je zapaženo prisustvo povećane koncentracije dezmosterola u HDL frakciji kod pacijenata sa CRC sa ITM < 25 kg/m<sup>2</sup> u saglasnosti sa rezultatima ove studije. U disertaciji je iznet zaključak da se kod pacijenata javlja isti profil distribucije markera apsorpcije prema polu kao i kod zdravih ispitanika. Iako su Bosner i saradnici pokazali da nema razlika u apsorpciji holesterola u odnosu na pol, njihova studija se bazirala na direktnim metodama procene apsorpcije dijetarnog holesterola na nivou gastrointestinalnog trakta [29], a ne na merenju apsorpcije fitosterola.

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da snižene koncentracije dezmosterola i kampesterola mogu predstavljati nezavisne prediktore za predviđanje prisustva CRC. Iako nije bilo studija koje su se bavile evaluacijom NHS kao prediktora CRC, pokazano je da visoka koncentracija dezmosterola u cerebrospinalnoj tečnosti predstavlja biomarker prisustva malignih glioma [30], kao i da povišene vrednosti dezmosterola u serumu razlikuju nealkoholni steatohepatitis od nealkoholne masne jetre [31].

Kako je poznato da je hipovitaminoza vitamina D poprimila globalne razmere, određivanje vitamina D je postalo uobičajeno u rutinskoj kliničkoj praksi, i to pre svega kvantifikacija najzastupljenijeg metabolita 25(OH)D<sub>3</sub> [32]. U ovoj studiji je razvijena i uspešno validirana metoda za istovremenu kvantifikaciju dva metabolita vitamina D: 25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Ovo je u saglasnosti sa savremenim trendovima u laboratorijskoj medicini koji govore u prilog određivanju 24,25(OH)<sub>2</sub>D uporedo sa 25(OH)D<sub>3</sub> kako bi se dobile klinički značajne informacije i umanjio uticaj interindividualnih razlika [33]. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da su koncentracije 7-DHC, 25(OH)D<sub>3</sub> i VDMR snižene kod pacijenata sa CRC, što je u saglasnosti sa dosadašnjim informacijama o statusu vitamina D kod ovih pacijenata [34]. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali i značajno niže koncentracije VDBP kod pacijenata sa CRC, što je očekivano ako se uzme u obzir da se VDBP primarno sintetiše u jetri, kao i da inflamacija koja javlja u prisustvu kancera, te posledična proizvodnja citokina, koji mogu umanjiti sintezu proteina u jetri. Pored toga, pokazano je da i maligne ćelije mogu preuzimati određene serumske proteine [35]. Niže koncentracije VDBP kod žena obolelih od CRC u saglasnosti su sa pretpostavkom da muškarci i žene različito reaguju na katabolička stanja poput kaheksije [36], te da testosteron ima anabolički efekat i na proteine sintetisane u jetri [37]. Rezultati ove doktorske disertacije su ukazali na značajno više koncentracije 7-DHC kod pacijenata sa CA kolona u odnosu na pacijente sa CA rektuma, što je u skladu sa pretpostavljenim razlikama između ova dva tkiva [24]. Takođe, koncentracije VDBP su bile značajno niže kod pacijenata sa CA kolona. U

studiji Anica i saradnika izneta je pretpostavka da se ćelijsko preuzimanje VDBP - 25(OH)D<sub>3</sub> dešava posredstvom receptora na površini ćelija kolona (*megalin, kubilin i DAb2*) [38], dok je studija Jansena i saradnika pokazala da postoji tkivna specifičnost u distribuciji *megalin-kubilin* sistema, kao i da postoji nedostatak ovih receptora u terminalnom ileumu [39]. Sve navedno opravdava pretpostavku iznetu u ovoj doktorskoj disertaciji da različita distribucija ovih receptora između dva tkiva uzrokuje različito preuzimanje VDBP - 25(OH)D<sub>3</sub>. Rezultati su pokazali i da se sa povećanjem gradusa CRC progresivno smanjuju nivoi serumskog 25(OH)D<sub>3</sub>, kao i da bi 25(OH)D<sub>3</sub> mogao biti koristan kao prediktor CRC visokog gradusa bolesti. Ovo je u saglasnosti sa činjenicom da vitamin D pospešuje diferencijaciju ćelija [40]. Značajno više koncentracije VDBP kod pacijenata sa stadijumom A i B u odnosu na pacijente sa stadijumima C i D opisane u rezultatima ove doktorske disertacije, u skladu su sa informacijama o sniženom sintetskom kapacitetu jetre i „*muscle waste*“ sindromu kod pacijenata sa uznapredovalom bolešću [41]. Rezultati nisu pokazali značajan nezavisni doprinos VDBP u predikciji CRC, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima [42].

Kod pacijenata sa CRC primećena je pozitivna korelacija između koncentracija UH u serumu i koncentracija 25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, kao i da se uporedo sa niskim nivoima prekursora vitamina D, javlja i smanjenje nivoa UH, LDL-h i HDL-h. Slične rezultate su dobili i Abaza i saradnici [43]. Studija Prabhu i saradnika iznosi hipotezu da je 7-DHC u centru metaboličkog raskršća između puteva sinteze holesterola i vitamina D [44]. Potvrđujući takvu pretpostavku, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da kod pacijenata sa CRC postoji pozitivna korelacija između serumskih nivoa UH i LDL-h sa 7-DHC i analiziranim metabolitima vitamina D<sub>3</sub>. Bogh i saradnici [45] su pokazali da je nivo 25(OH)D<sub>3</sub> u cirkulaciji nakon izlaganja sunčevom zračenju bio u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom UH, što je u skladu sa hipotezama, postavljenim u ovoj doktorskoj disertaciji, o uticaju metabolizma holesterola na status vitamina D.

## **D. Provera originalnosti doktorske disertacije**

Provera originalnosti ove disertacije izvršena je na način koji je propisan Pravilnikom o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu.

Program *iThenticate* je registrovao ukupno 8% poklapanja sa 141 izvorom. Preklapanje teksta sa jednim izvorom iznosi 2%, sa dva izvora 1%, a u svim ostalim slučajevima je sličnost teksta iznosila manje od 1%. Detaljnim uvidom u materijal utvrđeno je da je podudarnost teksta posledica korišćenja ličnih imena, naziva određivanih analita, reagenasa i primenjenih instrumentalnih i statističkih metoda, te navođenja opštih mesta u vezi sa temom disertacije.

Na osnovu rezultata provere smatramo da je doktorska disertacija Sandre Vladimirov u potpunosti originalna, kao i da su poštovana akademska pravila citiranja.

## **E. Zaključak- obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije**

Savremena medicina okrenuta je prevashodno *4P* (*predikcija, prevencija, personalizacija, participacija*) pristupu prevencije i lečenja bolesti. S tim u vezi, sa naročitom pažnjom se ističe značaj predikcije oboljenja, prevencije dejstvom na promenjive faktore rizika, te personalizacije terapijskog i preventivnog pristupa. Nastanku CRC doprinose nepromenjivi i promenjivi faktori rizika [4]. Imajući u vidu povećanu učestalost oboljevanja u savremenom svetu [1], poslednjih godina velika pažnja je usmerena ka prevenciji, odnosno smanjenju izloženosti faktorima rizika [4]. Kako je određen broj promenljivih faktora rizika već neko vreme poznat, a incidencija ove bolesti ne jenjava, naponi savremene medicine i istraživanja usmereni su na identifikaciju novih faktora rizika, te novih ranih biomarkera oboljenja. Ovaj pristup omogućio bi brzu i efikasnu identifikaciju pojedinaca sa povećanim rizikom, kao i primenu adekvatnih preventivnih i terapijskih procedura. Kancerogeneza je složen proces koji obuhvata brojne metaboličke promene. Između ostalih, smatra se da su i promene na nivou metabolizma lipida značajan činilac kancerogeneze. Holesterol kao jedna od osnovnih gradivnih komponenti ćelijskih membranskih struktura, važan signalni molekul u ćeliji i prekursor mnogih značajnih biomolekula u organizmu, predstavlja aktivno polje istraživanja [5,7].

Savremene analitičke tehnike omogućile su širi uvid u metabolizam holesterola, ali i dalje ove metode nisu harmonizovane, te se javljaju velike varijacije u rezultatima ispitivanja

između različitih laboratorija [11]. U ovoj doktorskoj disertaciji, opisan je proces optimizacije i validacije HPLC-MS/MS metoda za kvantifikaciju NHS u serumu i HDL frakciji, te predložen i validiran način eliminacije efekta matriksa, interferencije koja potiče od holesterola prisutnog u uzorku. Pored toga, razvijena je, optimizovana i validirana HPLC-MS/MS metoda za kvantifikaciju metabolita vitamina D, 25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> u serumu.

Analiza efikasnosti procesa sinteze i apsorpcije holesterola, istovremenim praćenjem koncentracija NHS u serumu i HDL frakciji, može pružiti značajne informacije o statusu homeostaze holesterola u različitim fiziološkim i patološkim stanjima. Do sada su markeri sinteze i apsorpcije holesterola uglavnom bili analizirani u kontekstu procene kardiometaboličkog zdravlja. Ovo istraživanje predstavlja prvu studiju koja se bavila analiziranjem statusa biomarkera homeostaze holesterola kod pacijenata obolelih od CRC. Zaključci izvedeni na osnovu rezultata ove studije ukazuju na postojanje poremećaja homeostaze holesterola, te prisutnoj hipoholesterolemiji. Ovi nalazi su potvrdili dosadašnje hipoteze o ulozi holesterola u procesu maligne transformacije i propagacije rasta tumora. Prvi put je analiziran pojedinačni doprinos Blochovog i Kandutsch-Russellovog puta sinteze holesterola u ovom stanju, posmatranjem odnosa između koncentracija dezmosterola i latosterola u serumu i HDL frakciji. Dodatno, ovom studijom je obuhvaćeno i ispitivanje povezanosti patoloških karakteristika kancera - gradusa, stadijuma i lokalizacije, sa statusom homeostaze holesterola. Primećene razlike u odnosu na pomenute karakteristike tumora otvaraju mogućnost za dalja istraživanja u cilju boljeg razumevanja specifičnosti bolesti kod svakog pojedinačnog pacijenta. Pored toga, ovo je i prvo istraživanje koje je ispitivalo uticaj pola i ITM na koncentracije NHS u serumu i HDL frakciji, kao i njihove međusobne odnose, kod pacijenata sa CRC i zdravih osoba. Sagledavanje uticaja ovih faktora daje detaljniji uvid u promene metabolizma holesterola, te može doprineti personalizovanom pristupu prevenciji i terapiji. Konačno, rezultati ove doktorske disertacije upućuju na mogućnost primene markera sinteze i apsorpcije holesterola kao specifičnih indikatora dislipidemije kod pacijenata sa CRC, što s jedne strane omogućava bolje razumevanje mehanizama nastanka poremećaja lipidnog balansa kod obolelih, a sa druge otvara nove mogućnosti na polju lečenja, ali i rane prevencije ove maligne bolesti. Ispitivanje plejotropnih efekata lekova, te mogućnost njihove primene van primarne indikacije sve su aktuelnija tema brojnih istraživanja. Hipolipemici, kao široko rasprostranjena grupa lekova za lečenje dislipidemije, ali i prevenciju kardiometaboličkih bolesti, intenzivno se istražuju i u kontekstu prevencije drugih oboljenja, među njima i kancera [46]. Ovo i buduća istraživanja, mogu rasvetliti specifične mehanizme

regulacije metabolizma holesterola u malignim bolestima, te stvoriti mogućnost za uvođenje određenih dodatnih farmakoloških i ne-farmakoloških preventivnih i terapijskih mera.

U ovom istraživanju je ispitan značaj paralelnog određivanja koncentracija 25(OH)D<sub>3</sub> i 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, te izračunavanja njihovog odnosa, što je u skladu sa aktuelnim trendovima u laboratorijskoj dijagnostici [33]. Dodatno, na osnovu rezultata ove doktorske disertacije, zaključeno je da postoji povezanost između koncentracija parametara statusa vitamina D i markera sinteze i apsorpcije holesterola u cirkulaciji kod pacijenata sa CRC. Iako je suplementacija vitaminom D postala univerzalan i rutinski način za rešavanje problema deficijencije, preporuke o režimu doziranja i adekvatnim dozama se stalno menjaju [32]. Imajući ovo u vidu, sagledavanje metabolizma holesterola i vitamina D kao celine, te uslovljenost ova dva metabolička puta, kod pacijenata sa malignim oboljenjima, moglo bi da rezultuje uvođenjem dodatnih preventivnih mera sa ciljem uspešnog prevazilaženja hipovitaminoze vitamina D ili, što je još važnije, povećanja uspešnosti lečenja ovih pacijenata.

#### **Literatura:**

1. Araghi M, Soerjomataram I, Jenkins M, Brierley J, Morris E, Bray F, Arnold M. Global trends in colorectal cancer mortality: Projections to the year 2035. *Int J Cancer* 2019;144(12):2992-3000.
2. Cappell MS. From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. *Clin Lab Med* 2005;25(1):135-77.
3. Knaul FM, Arreola-Ornelas H, Rodriguez NM, Méndez-Carniado O, Kwete XJ, Puentes-Rosas E, Bhadelia A. Avoidable Mortality: The Core of the Global Cancer Divide. *J Glob Oncol* 2018;4:1-2.
4. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije.
5. Lim JY, Kwan HY. Roles of Lipids in Cancer. In *Lipid Metabolism* 2018 Nov 5. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/online-first/roles-of-lipids-in-cancer>. Pristup: Maj 15, 2019.
6. Goedeke L, Fernández-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:915-30.
7. Broitman SA, Cerda S. Cholesterol metabolism and colon cancer. *Prog Food Nutr Sci* 1993;17(1):1-40.

8. Umpleby AM. Tracing lipid metabolism: the value of stable isotopes. *J Endocrinol* 2015;226:G1-0.
9. Matthan NR, Lichtenstein AH. Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis* 2004;174(2):197-205
10. Simonen P, Gylling H, Miettinen TA. The validity of serum squalene and non-cholesterol sterols as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2008;197(2):883-8.
11. Lütjohann D, Björkhem I, Friedrichs S, Kerksiek A, Lövgren-Sandblom A, Geilenkeuser WJ, Ahrends R, Andrade I, Ansorena D, Astiasarán I, Baila-Rueda L. First international descriptive and interventional survey for cholesterol and non-cholesterol sterol determination by gas-and liquid-chromatography—Urgent need for harmonisation of analytical methods. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019;190:115-25.
12. Huang Y, Shi R, Gee W, Bonderud R. Matrix effect and recovery terminology issues in regulated drug bioanalysis. *Bioanalysis* 2012;4(3):271-9.
13. Food US Drugs Administration. Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation
14. Miettinen TA, Gylling H, Nissinen MJ. The role of serum non-cholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:765-9.
15. Ding X, Zhang W, Li S, Yang H. The role of cholesterol metabolism in cancer. *Am J Cancer Res* 2019;1;9:219-227.
16. N Apostolova S, A Toshkova R, B Momchilova A, D Tzoneva R. Statins and alkylphospholipids as new anticancer agents targeting lipid metabolism. *Anticancer Agents Med Chem* 2016;16(12):1512-22.
17. Mitsche MA, McDonald JG, Hobbs HH, Cohen JC. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife* 2015;4:e07999.
18. Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F, et al. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* 2006; 281:27816–26
19. Muntoni S, Atzori L, Mereu R, Satta G, Macis MD, Congia M, Tedde A, Desogus A. Serum lipoproteins and cancer. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19:218-25.
20. Ketomäki A, Gylling H, Siimes MA, Vuorio A, Miettinen TA. Squalene and noncholesterol sterols in serum and lipoproteins of children with and without familial hypercholesterolemia. *Pediatr. Res* 2003;53:648



21. Yamauchi Y, Yokoyama S, Chang TY. Methods for Monitoring ABCA1-Dependent Sterol Release. In *Cholesterol Homeostasis 2017*; 257-273). Humana Press, New York, NY.
22. Rajora MA, Zheng G. Targeting SR-BI for cancer diagnostics, imaging and therapy. *Front Pharmacol* 2016;7:326.
23. Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res* 2009;50:S15-27
24. van der Sijp MP, Bastiaannet E, Mesker WE, van der Geest LG, Breugom AJ, Steup WH, Marinelli AW, Tseng LN, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Dekker JW. Differences between colon and rectal cancer in complications, short-term survival and recurrences. *Int J Colorectal Dis* 2016;31:1683-91
25. Rodríguez-Acebes S, de la Cueva P, Fernández-Hernando C, Ferruelo AJ, Lasunción MA, Rawson RB, Martínez-Botas J, Gómez-Coronado D. Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta24-reductase-deficient cell line. *Biochem J* 2009;420, 305–15
26. van Himbergen TM, Otokozawa S, Matthan NR, Schaefer EJ, Buchsbaum A, Ai M, van Tits LJ, de Graaf J, Stalenhoef AF. Familial combined hyperlipidemia is associated with alterations in the cholesterol synthesis pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;1;30:113-20
27. Simonen M, Männistö V, Leppänen J, Kaminska D, Kärjä V, Venesmaa S, Käkälä P, Kuusisto J, Gylling H, Laakso M, Pihlajamäki J. Desmosterol in human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2013;58:976-82
28. Simonen PP, Gylling H, Miettinen TA. The distribution of squalene and non-cholesterol sterols in lipoproteins in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2007;194:222-9
29. Bosner MS, Ostlund RE, Osofisan O, Grosklos J, Fritschle C, Lange LG. Assessment of percent cholesterol absorption in humans with stable isotopes. *Journal Lip Res* 1993;34:1047-53
30. Weiss JF, Paoletti EG, Paoletti P, Schiffer D, Fabiani A. Occurrence of desmosterol in tumors of the nervous system induced in the rat by nitrosourea derivatives. *Cancer Res* 1970;30:2107-9.
31. Brown AJ, Ikonen E, Olkkonen VM. Cholesterol precursors: more than mere markers of biosynthesis. *Curr. Opin. Lipidol* 2014;1;25:133-9
32. Kennel K. A, Drake M. T, Hurley D. L. Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clin Proc* 2010; 85; 752–8.

33. Cashman KD, Hayes A, Galvin K, Merkel J, Jones G, Kaufmann M, Hoofnagle AN, Carter GD, Durazo-Arvizu RA, Sempos CT. Significance of serum 24, 25-dihydroxyvitamin D in the assessment of vitamin D status: a double-edged sword?. *Clinical chem* 2015;61(4):636-45
34. Andersen SW, Shu XO, Cai Q, Khankari NK, Steinwandel MD, Jurutka PW, Blot WJ, Zheng W. Total and Free Circulating Vitamin D and Vitamin D–Binding Protein in Relation to Colorectal Cancer Risk in a Prospective Study of African Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26:1242-7
35. Cross HS, Bises G, Lechner D, Manhardt T, Kállay E. The Vitamin D endocrine system of the gut--its possible role in colorectal cancer prevention. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;97:121-8
36. Anderson LJ, Liu H, Garcia JM. Sex Differences in Muscle Wasting. *Adv Exp Med Biol* 2017;1043:153-97
37. Kapoor D, Clarke S, Stanworth R, Channer KS, Jones TH. The effect of testosterone replacement therapy on adipocytokines and C-reactive protein in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2007;156:595-602
38. Anic GM, Weinstein SJ, Mondul AM, Männistö S, Albanes D. Serum vitamin D, vitamin D binding protein, and risk of colorectal cancer. *PloS one* 2014;9:e102966
39. Jensen LL, Andersen RK, Hager H, Madsen M. Lack of megalin expression in adult human terminal ileum suggests megalin-independent cubilin/amnionless activity during vitamin B12 absorption. *Physiol Rep* 2014;2.
40. Jeon SM, Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med* 2018;50:20
41. Wright TJ, Dillon EL, Durham WJ, Chamberlain A, Randolph KM, Danesi C, Horstman AM, Gilkison CR, Willis M, Richardson G, Hatch SS, Jupiter DC, McCammon S, Urban RJ, Sheffield-Moore M. A randomized trial of adjunct testosterone for cancer-related muscle loss in men and women. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2018;9:482-96
42. Song M, Konijeti GG, Yuan C, Ananthakrishnan AN, Ogino S, Fuchs CS, Giovannucci EL, Ng K, Chan AT. Plasma 25-hydroxyvitamin D, vitamin D binding protein, and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study. *Cancer Prev Res* 2016;9:664-72
43. Abaza H, Ghanem A, Jmal A, Harzallah L, Rahal K, Guemira F. Changes in serum lipids in patients with colorectal cancer. *Tunis Med* 2011;89:147-50
44. Prabhu AV, Luu W, Li D, Sharpe LJ, Brown AJ. DHCR7: A vital enzyme switch between cholesterol and vitamin D production. *Prog Lipid Res* 2016;64:138-51.

45. Bogh MK, Schmedes AV, Philipsen PA, Thieden E, Wulf HC. Vitamin D production after UVB exposure depends on baseline vitamin D and total cholesterol but not on skin pigmentation. *J Invest Dermatol* 2010;130(2):546-53.
46. Vallianou NG, Kostantinou A, Kougias M, Kazazis C. Statins and cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2014;14:706-12.

#### **F. Objavljeni rezultati koji čine deo doktorske disertacije:**

1. Vladimirov S, Gojkovic T, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Determination of non-cholesterol sterols in serum and HDL fraction by LC/MS-MS: significance of matrix-related interferences. *J Med Biochem* 2019; DOI: 10.2478/jomb-2019-0044 (IF 2018:2,000; M23)

2. Vladimirov S, Zeljkovic A, Gojkovic T, Miljkovic M, Stefanovic A, Zeljkovic D, Trifunovic B, Spasojevic-Kalimanovska V. Associations of cholesterol and vitamin D metabolites with the risk for development of high grade colorectal cancer. *J Med Biochem* 2019; DOI: 10.2478/jomb-2019-0047 (IF 2018:2,000; M23)

#### **G. Mišljenje i predlog**

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Istraživanje statusa markera sinteze i apsorpcije holesterola u serumu i HDL frakciji predstavlja prvo kliničko ispitivanje ovih biomarkera kod pacijenata sa CRC, koje doprinosi boljem razumevanju uloge holesterola u razvoju ove bolesti. Pored toga, po prvi put je istraživana i veza između metabolizma holesterola i metabolizma vitamina D kod ovih pacijenata, i razmatrana njena uloga u nastanku hipovitaminoze vitamina D kod ovih pacijenata. Rezultati ove doktorske disertacije značajno doprinose uvođenju novih i pouzdanih metoda za razumevanje poremećaja na nivou metabolizma holesterola i vitamina D, proceni markera statusa ovih biomolekula kod pacijenata sa CRC, te primenu stečenih informacija u budućim istraživanjima i prilagođavanju preventivnih i terapijskih protokola kod ovih pacijenata. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u dva rada u međunarodnim časopisima kategorije 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 „**Ispitivanje biomarkera homeostaze holesterola i metabolizma vitamina D kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom**“, kandidata magistra farmacije-medicinskog biohemičara Sandre Vladimirov.

Beograd 11.10.2019.

dr Vesna Spasojević-Kalimanovska  
mentor, redovni profesor  
Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta

---

dr Aleksandra Zeljković  
mentor, vanredni profesor  
Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta

---

dr Zorana Jelić-Ivanović  
profesor emeritus  
Univerziteta u Beogradu- Farmaceutskog fakulteta

---

dr Bratislav Trifunović  
vanredni profesor  
Univerziteta odbrane u Beogradu - Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije

---