

## NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 30.01.2020. godine, imenovana je Komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Rani lipidni i inflamatorni markeri ateroskleroze kod dece sa tipom 1 dijabetes melitusa: uticaj metaboličke kontrole i komorbiditeta**“, kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Dragane Bojanin, specijaliste medicinske biohemije, u sastavu:

1. Dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, mentor, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
2. Dr Jelena Vekić, mentor, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
3. Dr Ana Ninić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
4. Dr Tatjana Milenković, naučni saradnik, Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić”, Beograd

Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

### IZVEŠTAJ

#### A. Sadržaj doktorske disertacije

Doktorska disertacija je napisana na 134 strane, sadrži 59 tabela, 24 slike i 409 literaturnih navoda. Sadržaj doktorske disertacije je predstavljen kroz sledeća poglavlja: Uvod, Cilj, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura.

**Cilj** ove doktorske disertacije je bio određivanje koncentracije lipidnih i inflamatornih markera - transformišućeg faktora rasta- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) i receptora za krajnje produkte uznapredovale glikacije (RAGE) u serumu i plazmi pedijatrijskih pacijenata sa tipom 1 dijabetes melitusa (T1DM) i zdrave dece, kao i određivanje nivoa iRNK TGF- $\beta 1$  i RAGE u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, te procena uticaja postignute metaboličke kontrole dijabetesa na koncentracije navedenih parametara i njihovu međusobnu povezanost. Detaljnija analiza lipidnog profila obuhvatila je određivanje koncentracije proprotein konvertaze subtilisin keksin tip 9 (PCSK9) i raspodele subfrakcija lipoproteina niske (LDL) i visoke gustine (HDL). Cilj uporedne analize ispitivanih parametara kod pacijenata i zdravih je bio utvrđivanje potencijalnih poremećaja homeostaze lipida i imunološke regulacije u T1DM i njihovih uticaja na razvoj ateroskleroze. Pored toga, ovo istraživanje je imalo cilj da ispita uticaj komorbiditeta, celijačne bolesti (CB) ili autoimuskog tireoiditisa (ATD), na koncentracije ranih lipidnih i inflamatornih markera ateroskleroze kod dece i adolescenata sa T1DM.

U poglavlju **Materijali i metode** su opisane karakteristike ispitivanih grupa i primenjenih analitičkih metoda. U istraživanje je uključen 201 pacijent Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta “Dr Vukan Čupić” sa T1DM, uzrasta od 6 do 19 godina. Pridruženu autoimunsku bolest imalo je 45

pacijenata, odnosno kod 30 pacijenata je dijagnostikovano autoimuni tireoiditis (ATD), a kod 15 pacijenata celijačna bolest (CB). Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije su bili klinički i/ili laboratorijski znaci dijabetesnih komplikacija, akutne bolesti ili terapija hipolipemicima. Kontrolnu grupu, od 141 ispitanika, su činila zdrava deca i adolescenti, uzrasta 5-19 godina, dobrovoljci i oni koji su dolazili na kontrolni pregled i konsultacije u Republički centar za planiranje porodice Instituta. Uzimanjem anamnestičkih podataka i pregledom je kod ispitanika kontrolne grupe isključeno prisustvo akutnih i hroničnih bolesti i medikamentozna terapija. Istraživanje je dizajnirano kao opservaciona, slučaj-kontrola studija, te planirano i sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom, na osnovu odobrenja Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Etičkog komiteta Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić".

Uzorkovanje krvi i antropometrijska merenja su obavljena u okviru redovnih godišnjih pregleda pacijenata ili prilikom konsultativnih pregleda zdrave dece. Medicinske istorije bolesti pacijenata su bile dostupne za detaljni uvid u kliničke i laboratorijske nalaze pacijenata. Svim ispitanicima su određene koncentracije parametara: standardnog lipidnog profila (ukupan holesterol (UH), trigliceridi (TG), LDL-holesterol (LDL-H) i HDL-holesterol (HDL-H)), inflamacije (C-reaktivni protein, primenom testa visoke osetljivosti (hsCRP)), metaboličke kontrole (glukoza, glikohemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) i albumin u urinu), tireoidne funkcije (tireostimulirajući hormon (TSH) i slobodni tiroksin (fT<sub>4</sub>)), kao i osnovnih biohemijskih parametara (kreatinin, alanin-aminotransferaza (ALT), aspartat-aminotransferaza (AST) i  $\gamma$ -glutamil transferaza ( $\gamma$ -GT)), rutinskim metodama aplikovanim na biohemijskim analizatorima. Antitela na tkivnu transglutaminazu (anti-tTG IgA i anti-tTG IgG su određena u plazmi ELISA metodom. Antitela na tireoidnu peroksidazu (anti-TPO) su određena metodom elektrohemiluminiscencije na imunohemijskom analizatoru. Iz udela HbA<sub>1c</sub> izračunata je prosečna koncentracija glukoze u prethodna tri meseca (eng. *estimated average glucose* - eAG). Stepen insulinske rezistencije kod pacijenata sa T1DM je procenjen izračunavanjem indeksa eGDR (eng. *estimated glucose disposal rate*). Jačina glomerularne filtracije (JGF) je izračunata pomoću Schwartz-ove jednačine, a indeks ateroskleroze kao odnos koncentracija holesterola sadržanog u LDL i HDL česticama (LDL-H/HDL-H). Koncentracije PCSK9, solubilne forme RAGE (sRAGE) i TGF- $\beta$ 1 u plazmi su određene ELISA metodom (R&D systems, Wiesbaden, Germany). Razdvajanje i određivanje veličine i raspodele LDL i HDL subfrakcija izvršeno je metodom vertikalne elektroforeze na gradijentu (3-31%) poliakrilamidnog gela. Kvantifikacija relativne genske ekspresije RAGE i TGF- $\beta$ 1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi je izvršena kvantitativnom reakcijom lančane polimeraze (qPCR) na aparatu 500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). U zavisnosti od distribucije podataka, za analizu kontinuiranih varijabli primenjeni su parametarski Student-ov t ili ANOVA test, odnosno *Mann-Whitney U* ili *Kruskal-Wallis* test. Kategoričke varijable su analizirane su Chi-kvadrat testom. Korelacije između varijabli analizirane su Spearman-ovom i Pearson-ovom korelacionom analizom. Multipla linearna regresiona analiza je primenjena za identifikaciju varijabli koje nezavisno utiču na koncentracije ispitivanih lipidnih i inflamatornih markera. Prediktivni potencijal ispitivanih markera procenjen je binarnom logističkom regresionom analizom.

U poglavlju **Rezultati** su prvo prikazane demografske karakteristike obe grupe ispitanika, klinički parametri pacijenata sa T1DM, kao i uporedna analiza osnovnih lipidnih parametara i parametara metaboličke kontrole obe grupe ispitanika. Pored toga, analizirani su parametri funkcije bubrega, jetre i tireoidne žlezde kod pacijenata i kontrolne grupe. Potom je izvršena analiza veličine i raspodele LDL i HDL subfrakcija u ispitivanim grupama i njihovo međusobno poređenje. Ispitivanje značaja PCSK9 u metabolizmu lipida kod pacijenata sa T1DM i zdrave dece je utvrđeno, najpre, detaljnom analizom raspodele koncentracija u ispitivanim grupama i njihovim poređenjem, a zatim i poređenjem između

grupa sa optimalnim i povišenim koncentracijama LDL-H, poređenjem koncentracija posle podele ispitanika u grupe na osnovu preporučenih nivoa LDL-H.

Analiza koncentracije inflamatornih markera TGF- $\beta$ 1 i sRAGE u plazmi i genske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i RAGE u mononuklearnim ćelijama periferne krvi je izvršena pošto su iz originalnog uzorka isključeni pacijenti koji su imali pridružene autoimunske bolesti, zbog njihovog potencijalnog uticaja na inflamatorni status koji je uslovljen osnovnom bolešću. Izvršeno je poređenje rezultata kod pacijenata sa T1DM i u kontrolnoj grupi. Zatim je ispitivana korelacija koncentracija TGF- $\beta$ 1 i sRAGE i nivoa iRNK TGF- $\beta$ 1 i RAGE sa demografskim, kliničkim karakteristikama i parametrima metaboličke kontrole kod pacijenata sa T1DM i odgovarajućim parametrima u kontrolnoj grupi. Potom je analizirana korelacija između markera inflamacije i parametara lipidnog statusa, uključujući osnovni lipidni profil, veličinu i raspodelu lipoproteinskih subfrakcija i koncentracije PCSK9. Naposljetku, ispitivana je i međusobna povezanost markera inflamacije i kod pacijenata sa T1DM i u kontrolnoj grupi.

U nastavku je analiziran uticaj metaboličke kontrole kod pacijenata sa T1DM na lipidne i inflamatorne markere ateroskleroze. Najpre su upoređene demografske i kliničke karakteristike pacijenata, kao i lipidni i parametri glikoregulacije, između pacijenata sa dobrom, suboptimalnom ili lošom metaboličkom kontrolom. Detaljnija analiza lipidnog profila kod navedenih grupa pacijenata je izvršena međusobnim poređenjem veličine i raspodele LDL i HDL subfrakcija i poređenjem koncentracija PCSK9. Dalja evaluacija uticaja postignute metaboličke kontrole na koncentracije PCSK9 je izvršena nakon dodatnog razvrstavanja pacijenata po polu, uz istovremenu evaluaciju komponenti metaboličkog sindroma. Pored toga, upoređene su i koncentracije PCSK9 uzimajući u obzir postignutu metaboličku kontrolu i koncentraciju LDL-H. Ispitivanje povezanosti koncentracija PCSK9 sa veličinom i raspodelom lipoproteinskih subfrakcija kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole je izvršeno primenom univarijantne, a zatim multivarijantne linearne regresione analize. Zatim su analizirane koncentracije PCSK9 i raspodele LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM, u zavisnosti od koncentracije LDL-H (optimalni i povišen). Potom je ispitana korelacija koncentracija PCSK9 sa dijametrima i relativnim udelima LDL i HDL subfrakcija u navedenim grupama. U grupi sa T1DM dodatno je ispitana i korelacija PCSK9, odnosno udela malih gustih LDL čestica, sa indeksom insulinske rezistencije (eGDR) i dnevnom dozom insulina, uzimajući u obzir postignutu metaboličku kontrolu. Potom su analizirani nivoi iRNK, odnosno genske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i RAGE u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, kao i koncentracije TGF- $\beta$ 1 i sRAGE u plazmi i serumska koncentracija hsCRP, u odnosu na postignutu metaboličku kontrolu kod pacijenata sa T1DM.

U narednom delu ovog poglavlja je ispitivan uticaj uticaj pridruženih autoimunskih bolesti na lipidne i inflamatorne markere ateroskleroze. Najpre su prikazani demografski podaci tri grupe pacijenata sa T1DM, odnosno pacijenata sa pridruženim autoimunskim tireoiditisom (ATD), pridruženom celijačnom bolešću (CB) i pacijenti bez komorbiditeta. Potom su ispitane razlike u koncentracijama parametara metaboličke kontrole, inflamacije, tireoidnog i lipidnog statusa između navedenih grupa. Dalja evaluacija lipidnog statusa pacijenata sa T1DM i pridruženim autoimunskim bolestima-izvršena je ispitivanjem veličine i raspodele LDL i HDL subfrakcija, koncentracija PCSK9 i indeksa ateroskleroze (LDL-H/HDL-H). Da bi se utvrdila povezanost indeksa ateroskleroze sa kliničkim i laboratorijskim parametrima pacijenata sa T1DM, urađena je linearna regresiona analiza. Uticaj pridružene autoimunske bolesti na razvoj dislipidemije u T1DM ispitivan je binarnom logističkom analizom, uz korekciju za demografske karakteristike, parametre metaboličke kontrole, tireoidnog i statusa inflamacije.

Dalje je ispitivan značaj povezanosti ekskrecije albumina sa ispitivanim lipidnim i inflamatornim markerima u cilju procene uloge dislipidemije i inflamacije u razvoju dijabetesnih komplikacija. U ovom

delu analize iz originalnog uzorka su izuzeti pacijenti sa pridruženim autoimunskim bolestima. Svi pacijenti su razvrstani u grupe po kvartilima urinarne ekskrecije albumina, a zatim je izvršeno poređenje demografskih i kliničkih parametara. Potom je ispitivana razlika biohemijskih parametara, veličine i raspodele lipoproteinskih subfrakcija i koncentracije PCSK9 po kvartilima urinarne ekskrecije albumina. Nakon toga, prikazana je analiza genske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i RAGE i njihovih koncentracija u plazmi po kvartilima urinarne ekskrecije albumina. Potom je urađena ordinalna logistička regresiona analiza sa ciljem da se utvrdi prediktivni potencijal ispitivanih markera inflamacije za pojavu ranog povećanja urinarne ekskrecije albumina. Na kraju je analizirana nezavisna povezanost ispitivanih markera inflamacije sa T1DM binarnom logističkom regresionom analizom. Primenom multivarijantne analize je izvršena korekcija za demografske karakteristike i vrednosti laboratorijskih parametara koji su se značajno razlikovali između pacijenata i kontrola. Ova analiza je izdvojila inflamatorne markere koji mogu biti nezavisni prediktori T1DM.

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

## **B. Opis dobijenih rezultata**

Ispitivana grupa pacijenata sa T1DM i kontrolna grupa (KG) su bile usklađene po polu i uzrastu. Pored ovih, ni druge demografske karakteristike ispitanika se nisu značajno razlikovale. Biohemijski parametri funkcije bubrega, jetre i tireoidne žlezde se nisu značajno razlikovali, sa izuzetkom mokraćne kiseline koja je bila značajno niža kod pacijenata sa T1DM. Očekivano, parametri metaboličke kontrole su bili značajno povišeni u grupi sa T1DM dok se parametri lipidnog statusa nisu značajno razlikovali, sa izuzetkom koncentracija HDL-H, koje su bile više kod pacijenata. Rezultati analize veličine i raspodele lipoproteinskih subfrakcija u ispitivanim grupama su pokazali da je u poređenju sa KG, u grupi pacijenata nađen značajno viši relativni udeo LDL I i LDL II subfrakcija i značajno niži udeo malih gustih LDL čestica (sdLDL). Pacijenti su imali značajno niži udeo HDL 2b a viši udeo malih HDL 3a, 3b i 3c subfrakcija. Poređenjem koncentracija PCSK9 u plazmi dece sa T1DM i zdrave dece, nije utvrđena statistički značajna razlika. Koncentracije PCSK9 su bile značajno više kod pacijenata sa povišenim koncentracijama LDL-H u odnosu na pacijente sa optimalnim koncentracijama LDL-H. U skladu sa tim, kod pacijenata sa T1DM je utvrđena pozitivna korelacija između koncentracija PCSK9 i koncentracija UH, TG, LDL-H i non-HDL-H. U istoj grupi, koncentracije PCSK9 su bile u pozitivnoj korelaciji sa veličinom LDL čestica i relativnim udelom malih HDL 3a čestica, a u negativnoj korelaciji sa relativnim udelom malih LDL IV subfrakcija i veličinom HDL čestica. Pored toga, utvrđeno je da koncentracije PCSK9 u plazmi pacijenata pozitivno koreliraju sa udelom HbA<sub>1c</sub> i prosečnom koncentracijom glukoze.

Analiza genske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i RAGE u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i koncentracija TGF- $\beta$ 1 i sRAGE u plazmi, je pokazala značajno nižu gensku ekspresiju kod pacijenata sa T1DM nego u KG i značajno višu koncentraciju ovih inflamatornih markera u plazmi pacijenata. Utvrđena povezanost ispitivanih inflamatornih markera sa T1DM je bila nezavisna od drugih demografskih i biohemijskih parametara. Analiza korelacije ispitivanih inflamatornih markera sa parametrima metaboličke kontrole i lipidnog statusa u grupi pacijenata je pokazala da su koncentracije TGF- $\beta$ 1 i sRAGE pozitivno korelirale sa dužinom trajanja bolesti, a nivoi iRNK TGF- $\beta$ 1 su bili u negativnoj korelaciji sa urinarnom ekskrecijom albumina. Koncentracije sRAGE su bile u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama UH, LDL-H i non-HDL-H u grupi pacijenata, dok u KG nije bilo statistički značajne korelacije. U grupi pacijenata nivoi TGF- $\beta$ 1 iRNK su bili u negativnoj korelaciji sa veličinom

LDL čestica, a u pozitivnoj sa relativnim udelima LDL III, dok su koncentracije TGF- $\beta$ 1 pozitivno korelirale sa udelima LDL II, a negativno sa udelima malih gustih LDL čestica (LDL III i IV). Koncentracije TGF- $\beta$ 1 su bile u negativnoj korelaciji sa relativnim udelima HDL 2a, a u pozitivnoj udelima HDL3b subfrakcija. Nasuprot, nivoi TGF- $\beta$ 1 iRNK su negativno korelirali sa udelima HDL3b subfrakcija. Nije bilo značajne korelacije između genske ekspresije i koncentracija TGF- $\beta$ 1 i RAGE u plazmi sa koncentracijama PCSK9 u ispitivanim grupama ispitanika, ali je kod pacijenata sa T1DM utvrđena pozitivna korelacija između koncentracija PCSK9 i hsCRP. U ispitivanoj grupi pacijenata sa T1DM nije bilo značajne korelacije između genske ekspresije TGF- $\beta$ 1 i koncentracije TGF- $\beta$ 1, kao ni korelacije između genske ekspresije RAGE i koncentracije sRAGE u plazmi. S druge strane, pokazana je pozitivna korelacija između nivoa iRNK TGF- $\beta$ 1 i RAGE, kao i pozitivna korelacija između koncentracija TGF- $\beta$ 1 i sRAGE.

Dalje je ispitivan uticaj metaboličke kontrole na lipidne i inflamatorne markere kod pacijenata sa T1DM. Najpre je poređenjem demografskih i biohemijskih parametara kod pacijenata sa dobrom, suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom, da između posmatranih grupa nema razlike po uzrastu, polu i antropometrijskim karakteristikama, kao i da su pacijenti različitog pubertetskog stadijuma i stepena uhranjenosti ravnomerno zastupljeni po grupama. Uočeno je značajno povećanje koncentracije glukoze, udela HbA<sub>1c</sub>, prosečne koncentracije glukoze i doza insulina sa pogoršanjem metaboličke kontrole. Koncentracije UH, LDL-H i TG su značajno rasle sa pogoršanjem metaboličke kontrole, nezavisno od dnevne doze insulina i statusa uhranjenosti, dok se koncentracija HDL-H nije razlikovala. Sem toga, sa pogoršanjem metaboličke kontrole došlo je i do redistribucije lipoproteinskih subfrakcija u pravcu manjih, proaterogenih čestica, što se ogledalo kroz značajno smanjenje udela LDL I i HDL 2b subfrakcija, uz istovremeni porast udela sLDL i malih HDL 3c čestica. Opisane razlike su bile nezavisne od statusa uhranjenosti i dnevne doze insulina. Okosnicu ovog dela istraživanja čine rezultati koji pokazuju značajan efekat metaboličke kontrole T1DM na koncentraciju PCSK9. Naime, utvrđen je postepen i značajan porast koncentracija PCSK9 idući od grupe sa dobrom, preko grupe sa suboptimalnom do grupe sa lošom metaboličkom kontrolom. Ovaj trend je potvrđen i kada su posebno analizirane koncentracije PCSK9 u zavisnosti od pola. Utvrđeno je i da su pacijenti sa lošom i suboptimalnom metaboličkom kontrolom i povišenim koncentracijama LDL-H imali značajno više koncentracije PCSK9 u odnosu na pacijente sa istim stepenom metaboličke kontrole, ali sa optimalnim koncentracijama LDL-H. U grupi pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom ustanovljena je značajna pozitivna korelacija koncentracija PCSK9 sa dijametrima LDL čestica i negativna korelacija sa relativnim udelima malih gustih LDL čestica. U grupi sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom ustanovljeno je da koncentracija PCSK9 pozitivno korelira sa dnevnom dozom insulina, udelom HbA<sub>1c</sub>, koncentracijama TG, UH i LDL-H i relativnim udelom HDL3c subfrakcija, a negativno sa veličinom HDL čestica. Multivarijantna regresiona analiza je pokazala da su kod pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom više koncentracije PCSK9 bile značajno udružene sa većim dijametrima LDL čestica i nižim udelima malih gustih LDL čestica, kao i sa manjim dijametrima HDL čestica. Kod pacijenata sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom, koncentracije PCSK9 su nakon multivarijantne regresione analize pokazale nezavisnu povezanost sa koncentracijama TG, dnevnom dozom insulina i relativnim udelima HDL3c subfrakcija. Koncentracije PCSK9 su bile u značajnoj inverznoj korelaciji sa eGDR, indeksom insulinske rezistencije u T1DM, bez obzira na stepen postignute metaboličke kontrole. Koncentracije PCSK9 su bile u pozitivnoj korelaciji sa dnevnom dozom insulina kod pacijenata sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom, dok je kod pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom udeo malih gustih LDL čestica bio u inverznoj korelaciji sa dnevnom dozom

insulina. Pogoršanje metaboličke kontrole je uslovalo značajno sniženje nivoa iRNK TGF- $\beta$ 1 i RAGE . Pored toga, pacijenti sa dobrom metaboličkom kontrolom su imali značajno niže koncentracije ovih inflamatornih markera u odnosu na pacijente sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom. Sa pogoršanjem metaboličke kontrole, ustanovljen je značajni porast koncentracija hsCRP.

Poređenjem demografskih podataka i parametara metaboličke kontrole pacijenata sa i bez pridruženih autoimunskih bolesti (ATD i CB) nije utvrđena statistički značajna razlika. Poređenjem parametara lipidnog statusa je utvrđena značajno viša koncentracija HDL-H u grupi bez pridružene autoimunske bolesti u odnosu na pacijente sa T1DM i CB. Učestalost dislipidemije kod pacijenata koji imaju samo T1DM i u obe grupe sa pridruženim autoimunskim bolestima je bila značajno viša nego u KG. Veličina i raspodela LDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM sa i bez pridruženih autoimunskih bolesti se nisu značajno razlikovale, ali je utvrđena značajna razlika između dijametara HDL čestica kod pacijenata sa CB u odnosu na pacijente bez pridružene bolesti. Pored toga, u ispitivanim grupama pacijenata ukupan udeo velikih HDL 2 subfrakcija je bio značajno niži, a udeo malih HDL čestica je bio značajno viši nego u KG. Utvrđena je i značajno viša vrednost indeksa ateroskleroze kod pacijenata sa CB u odnosu na pacijente bez pridružene autoimunske bolesti. Rezultati univarijantne analize su pokazali da je indeks ateroskleroze u pozitivnoj korelaciji sa indeksom telesne mase (ITM), udelom HbA<sub>1c</sub>, koncentracijama TG i anti-TPO antitela. Nakon multivarijantne regresione analize je pokazano da su koncentracije TG i anti-TPO značajni nezavisni prediktori povišenih vrednosti indeksa ateroskleroze. Potencijalni uticaj pridružene autoimunske bolesti na rizik za razvoj dislipidemije u T1DM je ispitan binarnom logističkom analizom. Ova analiza je potvrdila da je veza između CB i ATD i sniženih koncentracija HDL-H nezavisna od uzrasta, pola, pubertetskog statusa, ITM i koncentracija TG, TSH i hsCRP.

Potencijalni značaj određivanja lipidnih i inflamatornih markera za razvoj komplikacija analiziran je na osnovu ekskrecije albumina u urinu. Pošto u ispitivanoj grupi nije bilo pacijenata sa mikroalbuminurijom, analiza je nastavljena podelom pacijenata na osnovu kvartilnih vrednosti za urinarnu ekskreciju albumina u uzorku. Najpre je analizom demografskih karakteristika, pokazano da su pacijenti sa najnižom ekskrecijom albumina bili značajno mlađi od pacijenata u ostalim kvartilnim grupama. Utvrđeno je da porastom ekskrecije albumina rastu koncentracije kreatinina u serumu. Pacijenti sa najvećom ekskrecijom albumina (četvrta kvartilna grupa) su imali značajno nižu koncentraciju LDL-H i značajno manje dijemetre LDL čestica u odnosu na pacijente iz prve kvartilne grupe. Pored toga porastom ekskrecije albumina je značajno je rastao udeo HDL3b subfrakcija, kao i udeo malih HDL čestica. Koncentracije PCSK9 se nisu značajno razlikovale između ispitivanih kvartilnih grupa. Genska ekspresija TGF- $\beta$ 1 je opadala sa povećanjem ekskrecije albumina, odnosno bila je značajno niža kod pacijenata četvrte kvartilne grupe u odnosu na prvu. Za razliku od genske ekspresije, koncentracije TGF- $\beta$ 1 u plazmi se nisu značajno razlikovale po kvartilima urinarne ekskrecije albumina. Takođe, nije bilo razlike ni u genskoj ekspresiji RAGE, kao ni u koncentracijama sRAGE u plazmi. Rezultati ordinalne logističke regresione analize su pokazali da su genska ekspresija TGF- $\beta$ 1 i koncentracija sRAGE u plazmi značajno udruženi sa ranim povećanjem urinarne ekskrecije albumina. U multivarijantnoj analizi je potvrđen nezavisan uticaj nižih nivoa TGF- $\beta$ 1 iRNK na rano povećanje ekskrecije albumina u ispitivanoj grupi pacijenata sa T1DM.

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

Rezultati dosadašnjih istraživanja su potvrdili da se ateroskleroza nalazi u osnovi nastanka makrovaskularnih komplikacija kod pacijenata sa T1DM, te da nastaje još u ranom detinjstvu i progredira u kardiovaskularne bolesti (KVB) u kasnijem životnom dobu (1, 2). Tradicionalni faktori rizika za pojavu ateroskleroze - dislipidemija, hipertenzija i gojaznost, uz faktore rizika koji su karakteristični za dijabetes, poput uznapredovale glikacije, mikroalbuminurije, oksidativnog stresa i inflamacije, doprinose većoj prevalenci ateroskleroze kod obolelih, a pokazani su i u brojnim studijama i kod pedijatrijske populacije (2). Naša studija obuhvatila je pacijente bez prisutnih komplikacija dijabetesa i pokazala da nije bilo značajne razlike između tradicionalnih faktora rizika između pacijenata i zdravih ispitanika. Evaluacija lipidnog statusa je pokazala da pacijenti imaju značajno više koncentracije HDL-H, što je u saglasnosti sa sprovedenim istraživanjima (2,3). Ovo neočekivano povećanje koncentracije HDL-H kod pacijenata sa T1DM se smatra posledicom periferne hiperinsulinemije koja nastaje usled intenzivne subkutane insulinske terapije (4,5). Snižene koncentracije HDL-H ( $<0,9$  mmol/L) je imalo 2% pacijenata uključenih u ovu studiju, što je znatno manje nego u drugim studijama (4,5). Prema preporukama nacionalnih i međunarodnih vodiča kliničke prakse za dijabetes melitus koncentracije LDL-H  $>2,6$  mmol/L se smatraju rizičnim za pedijatrijsku populaciju (1). U ovoj studiji povišene koncentracije LDL-H imalo je 23,2% pacijenata, dok je u drugim studijama rizične vrednosti imalo i do 38% ispitanika (2,4,5). Međutim, standardni lipidni status koji ne odstupa od preporučenih vrednosti ne isključuje promene u distribuciji lipoproteinskih subfrakcija ka proaterogenom profilu, koji je ranijim istraživanjima okarakterisan dominacijom sdLDL, povećanim udelom VLDL čestica, te smanjenjem udela velikih HDL čestica, odnosno sniženom koncentracijom HDL-H (6). Istraživanja raspodele i veličine lipoproteinskih čestica u pedijatrijskoj populaciji sa T1DM su malobrojna. SEARCH studija je pokazala viši udeo sdLDL čestica kod dece i adolescenata sa T1DM (3). Rezultati ove studije su pokazali da je udeo sdLDL kod pacijenata bio značajno niži u odnosu na KG, a udeo većih LDL I i LDL II subfrakcija značajno viši. Prikazani rezultati su u saglasnosti sa studijom Gallo i saradnika koji su ustanovili značajno niže koncentracije sdLDL kod pacijenata sa T1DM u odnosu na zdravu decu (7). Nasuprot, u studiji koju su publikovali Gourgari i saradnici nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji sdLDL između ispitanika sa T1DM i zdravih (8). Uočene razlike u rezultatima aktuelne i ranije objavljenih studija posledica su razlika u uzrastu ispitanika, dužini trajanja dijabetesa i prisustva pridruženih komorbiditeta. Novija istraživanja ukazuju da gubitak ateroprotektivnih svojstava HDL čestica, odnosno stvaranje disfunkcionalnih HDL čestica, ima važnu ulogu u nastanku ateroskleroze (9). Istraživanja su ukazala na recipročni odnos između udela velikih HDL subfrakcija i rizika za razvoj kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti, te pozitivnu korelaciju koncentracije malih HDL čestica sa kardiovaskularnim rizikom (6). U skladu sa prethodnim, pacijenti sa T1DM u ovoj studiji su imali značajno veći udeo malih HDL čestica u odnosu na KG, uz sniženje udela većih HDL2b subfrakcija. Slična istraživanja su dala heterogene rezultate, te je u jednoj studiji utvrđen porast koncentracije malih HDL čestica (8), dok je u drugom istraživanju utvrđena viša koncentracija velikih HDL čestica kod pacijenata sa T1DM u odnosu na zdravu decu (7). Striktno održavanje metaboličke kontrole u T1DM je ključni faktor u sprečavanju mikro i makrovaskularnih komplikacija dijabetesa. Povezanost neadekvatne metaboličke kontrole i dislipidemije je prepoznata i u pedijatrijskoj populaciji sa T1DM kao jedan od faktora rizika za nastanak ateroskleroze (5). Ovim istraživanjem je potvrđen porast koncentracija UH, LDL-H i TG sa pogoršanjem metaboličke kontrole, ali nisu ustanovljene razlike u koncentracijama HDL-H između ispitivanih grupa sa različitim stepenom metaboličke kontrole, što je u saglasnosti sa drugim studijama sprovedenim u okviru pedijatrijske

populacije sa T1DM (2,5). Efekat metaboličke kontrole na lipidni profil je potvrđen i kroz preraspodelu LDL i HDL subfrakcija prema manjim i gušćim česticama, sa pogoršanjem metaboličke kontrole. Ovi rezultati odgovaraju nalazima studija u populaciji pedijatrijskih pacijenata sa dijabetesom, koje su pokazale porast koncentracije sdLDL sa pogoršanjem metaboličke kontrole (3), kao i rezultatima istraživanja sprovedenim kod odraslih pacijenata sa T1DM kod kojih je intenzivna insulinska terapija dovela do smanjenja udela HbA<sub>1c</sub>, koncentracije sdLDL i malih HDL čestica (10).

Rezultati nedavno publikovanih studija su ukazali da je koncentracija PCSK9, enzima koji se smatra ključnim faktorom za regulaciju ekspresije LDL receptora i koncentracije LDL-H, novi lipidni faktor rizika za razvoj KVB, a takođe su i potvrdili povezanost povišenih koncentracija ovog parametra sa aterogenim lipidnim profilom kod pacijenata sa KVB (11). Novija istraživanja PCSK9 su usmerena na rasvetljavanje njegove uloge u razvoju ateroskleroze u stanjima udruženim sa poremećenom homeostazom glukoze. Nedavno je publikovana studija koja je po prvi put ispitivala koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM pedijatrijskog uzrasta, a rezultati su pokazali da su koncentracije PCSK9 značajno više kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (12). Dodatno, istraživanja su utvrdila da su koncentracije PCSK9 značajno više kod zdravih devojčica i devojčica obolelih od T1DM, a takođe i da postoje značajne razlike u koncentracijama kod zdrave dece različitog uzrasta (12,13). U aktuelnoj studiji nisu pokazane značajne razlike u koncentracijama PCSK9 između pacijenata i kontrola, kao ni uticaj pola i uzrasta, što je u skladu sa dosadašnjim saznanjima da koncentracije PCSK9 u plazmi imaju veliku interindividualnu varijaciju. Takođe, u KG nije utvrđena povezanost između koncentracija PCSK9 i parametara standardnog lipidnog profila, za razliku od rezultata studije koju su publikovali Baass i saradnici (13). Sa druge strane, u grupi sa T1DM utvrđena je značajna pozitivna korelacija između koncentracija PCSK9 i LDL-H, što je u saglasnosti sa drugim studijama sprovedenim kod pacijenata sa dijabetesom (14). Rezultati ove studije su ukazali značajan uticaj metaboličke kontrole na koncentracije PCSK9 u plazmi pacijenata sa dijabetesom. Naime, koncentracije PCSK9 su značajno rasle sa porastom udela HbA<sub>1c</sub>, te su najviše vrednosti ovog parametra imali pacijenti sa lošom metaboličkom kontrolom. U istoj grupi bilo je i najviše pacijenata sa povišenim koncentracijama LDL-H, što ukazuje da PCSK9 sudeluje u razvoju dislipidemije u T1DM. Uticaj loše metaboličke kontrole na porast koncentracija LDL-H i PCSK9 je prethodno uočen u studiji koja je ispitivala odrasle pacijente sa T1DM (14). Kod pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom i optimalnim nivoima LDL-H su dobijene niže koncentracije PCSK9, ali je utvrđena negativna korelacija između PCSK9 i udela sdLDL čestica, dok u grupi sa lošom metaboličkom kontrolom nije bilo značajne korelacije. Suprotno tome, u drugim istraživanjima je opisana pozitivna korelacija između udela sdLDL i koncentracije PCSK9 (11), ali su te studije ispitivale odrasle pacijente sa KVB. U ovom istraživanju je po prvi put utvrđeno da koncentracije PCSK9 negativno koreliraju sa dijametrima HDL čestica, što dodatno potvrđuje proaterogeni potencijal ovog enzima. Pored ovoga, povezanost PCSK9 sa koncentracijom TG i udelom malih HDL subfrakcija, koja je bila nezavisna od koncentracije drugih lipidnih parametara i dnevne doze insulina, je ukazala da razvoj dislipidemije u T1DM može biti posledica insulinske rezistencije. Novija istraživanja potvrđuju mogućnost razvoja rezistencije na insulin i kod pacijenata sa T1DM, kao i njenu direktnu povezanost sa proaterogenim lipidnim profilom (15). Rezultati ove studije ukazuju da je veći stepen insulinske rezistencije udružen sa višim koncentracijama PCSK9, nezavisno od postignute metaboličke kontrole.

U pedijatrijskoj populaciji, ATD i CB predstavljaju najčešće autoimunske bolesti udružene sa T1DM (16). Hronična inflamacija koja prati autoimunske bolesti utiče na ubrzani razvoj ateroskleroze, pre svega zbog oštećenja endotela izazvanog medijatorima inflamacije. U ovom istraživanju je utvrđeno da je učestalost dislipidemije značajno viša kod pacijenata sa T1DM i pridruženim autoimunskim



bolestima, u odnosu na KG. Ovi rezultati su u saglasnosti sa sličnim istraživanjima koja su obuhvatila pedijatrijsku populaciju (17,18). Pacijenti sa ATD ili CB u aktuелnoj studiji su imali značajno niže koncentracije HDL-H od pacijenata sa T1DM ali bez koegzistirajućih autoimunskih bolesti, kao i značajno manje dijemetre HDL čestica, što je posebno bilo izraženo u grupi sa CB. Opisani proaterogeni lipidni profil kod pacijenata sa T1DM i CB je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja (18). Rezultati brojnih studija su pokazali da je indeks ateroskleroze dobar prediktor rizika za razvoj KVB. Značaj ovog markera se posebno ističe u populacijama pacijenata koji nemaju izrazito povišene koncentracije LDL-H, kao što su pacijenti sa T1DM i pedijatrijska populacija. U ovom istraživanju je utvrđena nezavisna povezanost koncentracije TG i anti-TPO antitela sa indeksom ateroskleroze, što ukazuje na povećan kardiovaskularni rizik pedijatrijskih pacijenata sa T1DM i autoimunskim bolestima tireoidne žlezde, nezavisno od stepena njene disfunkcije. Prethodne studije su pokazale da kod pedijatrijskih pacijenata sa T1DM i CB može doći do ranog povećanja ekskrecije albumina (19). Rezultati ovog istraživanja dodatno sugerišu da je povećana urinarna ekskrecija albumina udružena sa nižim koncentracijama HDL-H kod pacijenata sa komorbiditetima.

Autoimunski poremećaj u T1DM se karakteriše destrukcijom  $\beta$  ćelija pankreasa, posredovanom, pre svega, delovanjem T limfocita. Novija istraživanja pokazuju da nivo genske ekspresije medijatora uključenih u kontrolu inflamacije i imunološkog odgovora, u ćelijama periferne krvi i njihove koncentracije u plazmi, mogu da variraju u zavisnosti od dužine trajanja dijabetesa i starosti pacijenta (20). U ovoj studiji nivoi TGF- $\beta$ 1 iRNK su bili značajno niži kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. U ovom istraživanju, koncentracije TGF- $\beta$ 1 u plazmi pacijenata sa T1DM su bile značajno više u poređenju sa koncentracijama kod zdrave dece, saglasno objavljenim studijama koje su obuhvatile pedijatrijsku populaciju sa T1DM (21). U aktuелnoj studiji koncentracije inflamatornih markera, TGF- $\beta$ 1, RAGE i hsCRP, su ostale značajno povezane sa T1DM i nakon korekcije za utvrđene razlike u demografskim i biohemijskim parametrima između pacijenata i KG. Pored toga, ova studija je ukazala i na značajna povezanost genske ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa distribucijom lipoproteinskih subfrakcija. Rezultati su pokazali povezanost niskih koncentracija TGF- $\beta$ 1 sa povišenim udelom većih HDL subfrakcija i niske genske ekspresije TGF- $\beta$ 1 sa većim udelom manjih HDL subfrakcija. Potencijalni mehanizam kojim se može objasniti ova povezanost je opisan u *in vitro* istraživanjima, gde je pokazan uticaj TGF- $\beta$ 1 na ulogu HDL u reverznom transportu holesterola (22). Pored toga, rezultati ove doktorske disertacija su ukazali i da stepen postignute metaboličke kontrole utiče na gensku ekspresiju i koncentracije ispitivanih markera inflamacije.

Novija istraživanja pokazuju da su posledice interakcije RAGE i njihovih liganada na ćelijama imunskog sistema, kao i na endotelnim ćelijama, povezane sa razvojem T1DM i njegovih komplikacija. U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da su nivoi RAGE iRNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi značajno niži, a koncentracije sRAGE u plazmi značajno više kod pacijenata nego kod zdravih ispitanika. Kod dece obobile od T1DM su ranije dokumentovane snižene ekspresije gena za RAGE samo kod pacijenata sa ispoljenim mikrovaskularnim komplikacijama (23), dok drugi autori nisu utvrdili značajne razlike između pacijenata i kontrola (24). Saglasno rezultatima prikazanim u ovoj studiji, prethodna opservaciona studija je utvrdila da su koncentracije sRAGE kod dece sa T1DM povišene (24), dok je u prospektivnoj studiji koja je pratila pacijente od faze predijabetesa sve do razvoja T1DM uočeno opadanje koncentracije ovog parametra (25). Nalaz pozitivne korelacije koncentracija sRAGE sa koncentracijama UH, LDL-H i non-HDL-H se slaže sa rezultatima drugih studija (26) i ukazuje na zajednički uticaj inflamatornih i tradicionalnih faktora rizika u razvoju komplikacija. Iako se smatra da solubilne forme RAGE receptora mogu imati protektivni efekat, ta hipoteza nije potvrđena u dosadašnjim

istraživanjima pedijatrijskih pacijenata sa T1DM (26). U prilog ovoj činjenici govore i rezultati EURODIAB studije koja je obuhvatila odrasle pacijente sa T1DM i pokazala povezanost između visokih koncentracija sRAGE i povišenog kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (27). Druga klinička istraživanja su prikazala asocijaciju niskih koncentracija sRAGE i esRAGE sa visokim rizikom za razvoj KVB drugih komplikacija T1DM (28). Uočene razlike u rezultatima aktuelne i ranije objavljenih studija proizilaze iz razlika u uzrastu ispitanika, dužini trajanja dijabetesa i prisustva pridruženih komorbiditeta.

Mikroalbuminurija je poznati faktor rizika za pojavu dijabetesne nefropatije, ali i nezavisni prediktor disfunkcije endotela, te u skladu sa tim i rani marker KVB (1). Skrining na mikroalbuminuriju sastavni deo protokola za praćenje toka T1DM (1). Noviji dokazi su ukazali da rano povećanje brzine ekskrecije albumina ima prediktivni značaj za razvoj mikro- i makroalbuminurije posle puberteta, čak i kada su izmerene vrednosti u okviru referentnog intervala (29,30), te je u skladu sa tim postavljena granična vrednost za rano povećanje ekskrecije albumina na  $>7,5 \mu\text{g}/\text{min}$  (28). Iako ispitanici uključeni u ovo istraživanje nisu imali komplikacije dijabetesa, niti mikroalbuminuriju, kod četvrtine pacijenata urinarna ekskrecija albumina je bila  $>7,5 \mu\text{g}/\text{min}$ . U ovom istraživanju je utvrđeno je da pacijenti u grupi sa najvišom ekskrecijom albumina imaju najniže koncentracije LDL-H i najveći udeo velikih LDL subfrakcija, dok je u ranije objavljenim studijama uočen porast koncentracija LDL-H i non-HDL-H sa porastom ekskrecije albumina (30). Rezultati ove studije su pokazali da se sa povećanjem ekskrecije albumina značajno smanjuje ekspresija gena za TGF- $\beta$ 1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, a raste koncentracija kreatinina u serumu. Uzimajući u obzir činjenicu da su koncentracije TGF- $\beta$ 1 u plazmi pacijenata bile značajno više nego u KG, može se pretpostaviti da cirkulišuće koncentracije TGF- $\beta$ 1 potiču iz bubrega, kao posledica povećane lokalne ekspresije. Novija istraživanja (29,30) ukazuju na povezanost ranog povećanja ekskrecije albumina sa perzistentnom mikroalbuminurijom i razvojem dijabetesne nefropatije kod dece i adolescenata sa T1DM, kao i povećanu koncentraciju TGF- $\beta$ 1 kod dece sa već ustanovljenim mikrovaskularnim komplikacijama (21).

### **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 113 izvora. Preklapanje teksta sa tri izvora iznosi 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, bibliografskih podataka, naziva metoda, reagenasa i određivanih analita, te opštih mesta i podataka u vezi sa temom disertacije.

Na osnovu rezultata provere zaključujemo da je doktorska disertacija Dragane Bojanin u potpunosti originalna, kao i da su poštovana akademska pravila citiranja.

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

Epidemiološke studije ukazuju da je rast incidencije T1DM najizraženiji u zemljama u razvoju, o čemu svedoče i podaci studija sprovedenih u Srbiji i zemljama u regionu. Pedijatrijski pacijenti sa T1DM pripadaju najvišoj kategoriji rizika za razvoj ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Stoga su istraživanja tradicionalnih i novih faktora rizika i faktora udruženih sa dijabetesom u pedijatrijskoj populaciji dragoceni doprinos u prevenciji razvoja komplikacija T1DM, posebno zbog osetljivosti ispitivane populacije.

Evaluacija standardnih i novih lipidnih biomarkera kod pacijenata sa T1DM i zdrave dece u ovoj studiji, dala je detaljni prikaz lipidnog statusa, i pružila uvid u to kako primenjena insulinska terapija, postignuta metabolička kontrola i prisutni komorbiditeti utiču na lipidni status i profil lipoproteinskih subfrakcija. Ova analiza je ukazala da pacijenti sa T1DM imaju više koncentracije HDL-H u odnosu na zdravu decu, ali istovremeno i značajno viši udeo malih, proaterogenih HDL subfrakcija, što ukazuje da su HDL čestice u T1DM disfunkcionalne i potvrđuje značaj detaljne analize lipidnog profila u ovoj populaciji pacijenata. Važno je istaći da su rezultati ove doktorske disertacije dali originalni naučni doprinos rasvetljavanju uloge PCSK9 u razvoju dislipidemije u T1DM i ukazali na značajan uticaj postignute metaboličke kontrole, terapije insulinom i prisustva insulinske rezistencije na lipidni status. Kako u osnovi nastanka T1DM leži poremećaj imunskog i inflamatornog odgovora, utvrđena snižena genska ekspresija i povišene koncentracije TGF- $\beta$ 1 i RAGE kod pacijenata sa T1DM pružaju važan doprinos razumevanju etiopatogeneze i progresije T1DM. Utvrđena povezanost između genske ekspresije i koncentracije inflamatornih markera, parametara proširenog lipidnog statusa i metaboličke kontrole implicira zajedničko delovanje inflamacije i dislipidemije u razvoju komplikacija T1DM..

Treba dodati da rezultati ove doktorske disertacije imaju i praktičan značaj, kao i potencijalne kliničke implikacije, jer sugerišu da bi određivanje aterogenog indeksa moglo biti od koristi za pacijente sa T1DM i pridruženim autoimunskim bolestima. Imajući u vidu laku dostupnost ovog markera u rutinskoj laboratorijskoj praksi, aterogeni indeks bi mogao pružiti značajne informacije o stepenu poremećaja ravnoteže između proaterogenih i aterogenih lipoproteina u plazmi i na taj način uticati na buduće preventivne mere. Takođe, utvrđena povezanost ekskrecije albumina sa genskom ekspresijom i koncentracijama inflamatornih markera i malih, disfunkcionalnih HDL subfrakcija ukazuje na značaj otkrivanja ranog povećanja ekskrecije albumina kao indikatora povećanog kardiovaskularnog rizika uslovljenog dislipidemijom i hroničnom inflamacijom.

## Literatura

1. Donaghue KC, Marcovecchio L, Wadwa RP, Chew EY, Wong TY, Calliari LE, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Microvascular and macrovascular complications in children and adolescents *Pediatr Diabetes* 2018; 19: 262–74.
2. Snell Bergeon JK, Nadeau K. Cardiovascular disease risk in young people with type 1 diabetes. *J Cardiovasc Trans Res.* 2012; 5:446-62.
3. Guy J, Ogden L, Wadwa RP, Hamman RF, Mayer-Davis EJ, Liese AD, D'Agostino R , et al. Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. *Diabetes Care.* 2009;32:416-20.
4. Edge JA, James T, Shine B. Longitudinal screening of serum lipids in children and adolescents with Type 1 diabetes in a UK clinic population. *Diabet Med.* 2008;25:942-8.
5. Maahs DM, Dabelea D, D'Agostino RB, Jr, Andrews JS, Shah AS, Crimmins N, et al. Glucose Control Predicts 2-Year Change in Lipid Profile in Youth with Type 1 Diabetes. *J Pediatr.* 2013;162:10.
6. Holmes MV, Milwood IY, Kartsonaki C, Hill MR, Bennett DA, Boxall R, et al. Lipids, Lipoproteins, and metabolites and risk of myocardial infarction and stroke. *J Am Cardiol.* 2018; 71:620-32.
7. Gallo LM, Silverstein JH, Shuster JJ, Haller MJ. Arterial stiffness, lipoprotein particle size, and lipoprotein particle concentration in children with type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2010;23:661-7.

8. Gourgari E, Playford MP, Campia U, Dey AK, Cogen F, Gubb-Weiser S, et al. Low cholesterol efflux capacity and abnormal lipoprotein particles in youth with type 1 diabetes: a case control study. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17:158.
9. Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. Biological consequences of dysfunctional HDL. *Curr Med Chem.* 2019; 26: 1644-64.
10. Zhang Y, Jenkins AJ, Basu A, Stoner JA, Lopes-Virella MF, Klein RL. Associations between intensive diabetes therapy and NMR-determined lipoprotein subclass profiles in type 1 diabetes *J Lipid Res.*2016;57:310-7.
11. Zhang Y, Xu RX, Li S, Zhu CG, Guo Yj, Li JJ. Association of plasma small dense LDL cholesterol with PCSK9 levels in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25: 426-433.
12. Levenson AE, Wadwa PR, Shah AS, Khoury PR, Kimball TR, Urbina EM. PCSK9 is increased in youth with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2017; 40: e85–e87.
13. Baass A, Dubuc G, Tremblay M, Delvin EE, O'Loughlin J, et al. Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents. *Clin Chem.* 2009; 55:1637-45.
14. Laugier Robiole S, Verges B, Le Bras M, Gand E, Bouillet B, Saulnier PJ et al. Glycaemic control influences the relationship between plasma PCSK9 and LDL cholesterol in type 1 diabetes. *Diabetes obes metab.* 2017;19:448-51.
15. Cree-Green M, Maahs DM, Ferland A, Hokanson JE, Wang H, Pyle L, et al. Lipoprotein subfraction cholesterol distribution is more atherogenic in insulin resistant adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes .* 2016;17: 257–65.
16. Mahmud FH, Elbarbary NS, Fröhlich-Reiterer E, Holl RW, Kordonouri O, Knip M, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Other complications and associated conditions in children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2018; 19:275–86.
17. Denzer C, Karges B, Nake A, Rosenbauer J, Schober E, Schwab OK, et al. Subclinical hypothyroidism and dyslipidemia in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2013; 168:601-8.
18. Warncke K, Liptay S, Fröhlich-Reiterer E, Scheuing N, Schebek M, Wolf J, et al. Vascular risk factors in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes complicated by celiac disease: results from the DPV initiative. *Pediatr Diabetes.* 2016;17:191-8.
19. Pham-Short A, Donaghue K, Ambler G, Chan A, Hing S, Cusumano J, et al. Early elevation of albumin excretion rate is associated with poor gluten-free diet adherence in young people with coeliac disease and diabetes. *Diabet Med.* 2014;31:208-12.
20. Jin Y, Sharma A, Carey C, Hopkins D, Wang X, Robertson DG, et al. The expression of inflammatory genes is upregulated in peripheral blood of patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2013; DC\_121986.
21. Zorena K, Raczyńska D, Wiśniewski P, Malinowska E, Myśliwiec M, Raczyńska K, et al. Relationship between Serum Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Concentrations and the Duration of Type 1 Diabetes Mellitus in Children and Adolescents. *Mediators Inflamm.* 2013;2013: 849457.
22. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26:673-85.

23. Miura J, Uchigata Y, Yamamoto Y, Takeuchi M, Sakurai S, Watanabe T, et al. AGE down-regulation of monocyte RAGE expression and its association with diabetic complications in type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 2004;18:53-9.
24. Dettoraki A, Gil AP, Spiliotis BE. Association between serum levels of the soluble receptor (sRAGE) for advanced glycation endproducts (AGEs) and their receptor (RAGE) in peripheral blood mononuclear cells of children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2009;22:895-904.
25. Salonen KM, Ryhänen SJ, Forbes JM, Borg DJ, Härkönen T, Ilonen J, et al. Decrease in circulating concentrations of soluble receptors for advanced glycation end products at the time of seroconversion to autoantibody positivity in children with prediabetes. *Diabetes Care.* 2015;38:665-70.
26. Heier, M., Margeirsdottir, H.D., Gaarder, M. Knut Haakon Stensæth, Cathrine Brunborg, Peter Abusdal Torjesen, et al. Soluble RAGE and atherosclerosis in youth with type 1 diabetes: a 5-year follow-up study. *Cardiovasc Diabetol.* 2015; 14:126.
27. Nin JWM, Jorsal A, Ferreira I, Schalkwijk CG, Prins MH, Parving HH, et al. Higher plasma soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE) levels are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. *Diabetes.* 2010;59:2027-32.
28. Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, Matsuoka TA, Sakamoto K, Yasuda T, et al. Serum endogenous secretory RAGE level is an independent risk factor for the progression of carotid atherosclerosis in type 1 diabetes. *Atherosclerosis.* 2009;204:288-92.
29. Maftai O, Pena AS, Sullivan T, Jones TW, Donaghue KC, Cameron FJ, et al. Early atherosclerosis relates to urinary albumin excretion and cardiovascular risk factors in adolescents with type 1 diabetes: adolescent type 1 diabetes cardio-renal intervention trial (AddIT). *Diabetes Care.* 2014; 37:3069-75.
30. Marcovecchio L, Chiesa ST, Armitage J, Daneman D, Donaghue KC, Jones TW, et al. Renal and cardiovascular risk according to tertiles of urinary albumin-to-creatinine ratio: The adolescent type 1 diabetes Cardio-Renal Intervention Trial (AddIT). *Diabetes Care.* 2018, 41:1963-9

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

1. **Bojanin D**, Vekic J, Milenkovic T, Vukovic R, Zeljkovic A, Stefanovic A, Janac J, Ivanisevic J, Mitrovic K, Miljkovic M, Spasojevic-Kalimanovska V. Association between proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) and lipoprotein subclasses in children with type 1 diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Atherosclerosis* 2019;280:14-20. (M21; IF=4,255)
2. **Bojanin D**, Milenkovic T, Vekic J, Vukovic R, Zeljkovic A, Janac J, Ivanisevic J, Todorovic S, Mazibrada I, Spasojevic-Kalimanovska V. Effects of co-existing autoimmune diseases on serum lipids and lipoprotein subclasses profile in paediatric patients with type 1 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2018 ;54:11-17. (M22; IF=2,430)

## G. Mišljenje i predlog

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Prevencija razvoja ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti u pedijatrijskoj populaciji je oblast od posebnog značaja, a deca i adolescenti sa T1DM predstavljaju izuzetno vulnerabilnu grupu. Istraživanje ranih lipidnih i inflamatornih markera ateroskleroze je prvo kliničko ispitivanje ovih biomarkera kod pedijatrijskih pacijenata sa T1DM u našoj populaciji. Rezultati ove doktorske disertacije pružaju nova saznanja o kliničkom značaju određivanja novih lipidnih i inflamatornih biomarkera kod pacijenata sa T1DM i doprinose boljem razumevanju interaktivne uloge dislipidemije i inflamacije u razvoju i progresiji bolesti, te omogućavaju primenu stečenih informacija u budućim istraživanjima u cilju prevencije i smanjenja rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti u ovoj populaciji pacijenata. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u dva rada u međunarodnim časopisima kategorije M21 i M22.

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 „**Rani lipidni i inflamatorni markeri ateroskleroze kod dece sa tipom 1 dijabetes melitusa: uticaj metaboličke kontrole i komorbiditeta**“, kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Dragane Bojanin.

Beograd 02. 03.2020.

dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, mentor, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

dr Jelena Vekić, mentor, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

dr Ana Ninić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu- Farmaceutski fakultet

---

dr Tatjana Milenković, naučni saradnik  
Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić” u Beogradu