

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 21.06.2018. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

1. Dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor, Univerziteta u Beogradu- Farmaceutskog fakulteta, mentor, predsednik komisije
2. Dr Darko Černe, redovni profesor, Univerziteta u Ljubljani- Farmaceutskog fakulteta
3. Dr Aleksandra Stefanović, vanredovni profesor, Univerziteta u Beogradu- Farmaceutskog fakulteta
4. Dr Jelena Vekić, docent, Univerziteta u Beogradu- Farmaceutskog fakulteta
5. Dr Sanja Simić-Ogrizović, redovni profesor, Univerziteta u Beogradu- Medicinskog fakulteta

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom "**Oksidativno-stresni status u krvi i lipoproteinskim frakcijama pacijenata sa hroničnom bolešću bubrega**" kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Miljković Milice, asistenta na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

**I Z V E Š T A J**

**A. Sadržaj doktorske disertacije**

Doktorska disertacija je napisana na 154 strane, ima 32 tabele, 30 slika i 236 literaturnih navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod, Cilj, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura.

**Cilj** ove doktorske disertacije je bio ispitivanje parametara dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u krvi pacijenata sa hroničnom bolešću bubrega (HBB), pacijenata na dijalizi i zdravih ispitanika. Pored toga ova doktorska disertacija je imala za cilj i ispitivanje uticaj pomenutih faktora rizika na oksidativno-stresni status u glavnim lipoproteinskim frakcijama i na remodelovanje ekstracelularnog matriksa (ECM). Takođe cilj je bio i

izračunati odgovarajuće skorove dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije kako bi se procenio sinergistički efekat ovih procesa kao i efekat koji zajedno ostvaruju na oksidativno-stresni status u lipoproteinskim frakcijama kod pacijenata sa različitim stepenom bubrežnog oštećenja.

U poglavlju **Materijal i metode** dati su podaci o ispitanicima i primenjenim metodama. U istraživanju je učestvovalo 117 ispitanika: 77 pacijenata sa hroničnom bolešću bubrega različitog stepena i 40 zdravih ispitanika. Kako bi se stekao detaljniji uvid u povezanost ispitivanih parametara dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije sa stepenom težine hronične bolesti bubrega ispitanici su bili dodatno razvrstani prema terapijskom modalitetu: pacijente sa hroničnom bolešću bubrega koji su na konvencionalnoj terapiji lekovima i na pacijente sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom koji su na hemodijalizi. Istraživanje je planirano i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a na osnovu odobrenja Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu. Grupa zdravih ispitanika je sastavljena nakon detaljnog ispitivanja njihovog zdravstvenog stanja što je podrazumevalo isključivanje ispitanika koji su bolovali od kardiovaskularnih, cerebrovaskularnih, renalnih, bolesti jetre ili malignih bolesti. Takođe, imajući u vidu da su dalja ispitivanja podrazumevala detaljnu analizu lipidnog profila i određivanje parametara oksidativno-stresnog statusa, iz studije su isključeni i pacijenti i zdrave osobe koji su koristili antihiperlipidemike ili neki vid antioksidativne suplementacije. U svim uzorcima krvi određene su koncentracije sledećih biohemijskih parametara: glukoza, ukupan holesterol (UH), LDL-holesterol (LDL-h), HDL-holesterol (HDL-h), trigliceridi (TG), ukupni proteini, urea, kreatinin i mokraćna kiselina enzimskim metodama na automatskom analizatoru Ilab 300+ (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). Razdvajanje HDL i LDL lipoproteina na subfrakcije izvršeno je korišćenjem vertikalne gradijent gel elektroforeze na nedenaturišućem poliakrilamidnom gradijent gelu (3-31%). Za ispitivanje alternativnog reverznog transporta holesterola preko eritocita, iz pune krvi pacijenata i zdravih osoba, primenom centrifugiranja izdvojeni su eritrociti, a potom eritrocitne membrane i hemolizati eritrocita u kojima su određivani koncentracija holesterola u membrani eritrocita (RBC-Mh) i holesterol vezan za hemoglobin (Hb-h). Pored pomenutih eritrocitnih parametara određivan je i nivo methemoglobina (metHb) spektrofotometrijski. Kako bi procenili nivo oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, upotrebom prethodno validiranih spektrofotometrijskih metoda u serumu je izmerena koncentracija uznapredovalih produkata oksidacije proteina

(AOPP), koncentracija tiobarbiturna kiselina-reagujućih supstanci (TBARS), određen je nivo totalnog oksidativnog statusa (TOS), kao i koncentracija ukupnih sulfhidrilnih grupa (ukupne SH grupe) i totalnog antioksidativnog statusa (TAS). Takođe, određena je i ravnoteža između parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, određivanjem prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB). U cilju procene statusa enzima PON1 korišćenjem odgovarjuće kinetičke metode odredili smo paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1 u serumu, dok su masene koncentracije PON1 i PON3 izmerene pomoću tehnike enzimskog imunoeseja (ELISA, R&D systems, Minneapolis, USA). Arilesterazna aktivnost PON1 u HDL2 i HDL3 lipoproteinskim frakcijama određena je nakon elektroforetskog razdvajanja HDL lipoproteina, korišćenjem Trinderove reakcije. U glavnim lipoproteinskim frakcijama (VLDL, LDL, HDL) koje su izdvojene na osnovu gustinskog gradijenta pomoću ultracentrifuge- Thermo Scientific Sorvall WX+ (Thermo Fisher Scientific, USA) određene su koncentracije AOPP, PON1 i PON3. Nivo inflamacije u serumu je određen na osnovu koncentracije pentraxina-3 koji je izmeren korišćenjem ELISA metode (ELISA, R&D systems, Minneapolis, USA). Koncentracija parametara čija se aktivnost povezuje sa remodelovanjem ECM (matriks metaloproteinaza-9 (MMP9), tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza-1 (TIMP1) i galektina-3) određena je imunohemijski pomoću ELISA metode (ELISA, R&D systems, Minneapolis, USA). Rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB) je izračunat na osnovu Framingamskog risk skora (FRS), pri čemu su svi ispitanici podeljeni u tri grupe, sa malim, umerenim i visokim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Skor dislipidemije (DS), oksidativno-stresni skor (OS) i skor inflamacije (IS) su izračunati na osnovu standardizovanih vrednosti parametara dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije, nakon čega je izračuna DOI (**D**islipidemija skor-**O**ksidativno stresni skor-**I**nflamatorni skor) skor kao zbir pojedinačnih skorova.

U poglavlju **Rezultati** najpre su prikazani osnovni demografski i biohemijski parametri za sve ispitanike: starost, zastupljenost pola, indeks telesne mase (ITM), sistolni pritisak, dijastolni pritisak, brzina glomerularne filtracije, koncentracija glukoze, ukupnih proteina, zatim uree, kreatinina i mokraćne kiseline, kao i parametri lipidnog statusa (UH, HDL-H, apoA-I, LDL-H, TG). Takođe, zajedno sa ovim podacima prikazan je i FRS kod pacijenata i zdravih ispitanika. Zatim su prikazani veličina i relativni udeli LDL subfrakcija u svim ispitivanim grupama, kao i Spearmanov-a korelaciona analiza osnovnih biohemijskih parametara, dijametara i distribucije LDL subfrakcija kod bubrežnih bolesnika. Nakon toga su predstavljeni dijametar i relativni udeli HDL subfrakcija kod pacijenata sa smanjenom

funkcijom bubrega i zdravih ispitanika. Nakon analize HDL subfrakcija primenjena Spearmanov-a korelaciona analiza koja je ispitivala povezanost osnovnih biohemijskih parametara, dijametra i distribucije HDLsubfrakcija kod bubrežnih pacijenata. Zatim su prikazani eritrocitni parametri (koncentracija hemoglobina, relativni udeo RBC-Mh, Hb-h i metHb) kod pacijenata sa HBB, pacijenata na dijalizi i u kontrolnoj grupi. U cilju ispitivanja da li LDL fenotip ima uticaj na eritrocitne parametre, podelili smo kontrolnu grupu i grupu bubrežnih pacijenata na LDLA i LDLB fenotip. Nakon toga smo uporedili parametare oksidativnog stresa (AOPP, TBARS i OS), antioksidativne zaštite (ukupne SH grupe i TAS), kao i parametar ravnoteže između oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (PAB) između pomenutih grupa. Takođe parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite smo uporedili i u zavisnosti od LDL fenotipa kod pacijenata i zdravih ispitanika. Primenom Spearmanove korelacione analize ispitivana je povezanost parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa parametrima lipidnog statusa. U sledećoj fazi, analiziran je status enzima paraoksonaze, tako što su arilesterazna i paraoksonazna aktivnost enzima PON1, kao i koncentracije PON1 i PON3, upoređene između ispitivanih grupa. Zatim je prikazan i relativni udeo aktivnosti PON1 kao i sama aktivnost PON1 na HDL2 i HDL3 subfrakcijama kod pacijenata sa HBB, pacijenata na dijalizi i u kontrolnoj grupi. Takođe, prikazan je i status PON1 pre i posle tretmana hemodijalizom. Nakon toga primenom Spearmanove korelacione analize utvrđena je povezanost parametara koji opisuju status enzima paraoksonaze sa biohemijskim parametrima, parametrima lipidnog statusa i parametrima redoks statusa u grupi bubrežnih bolesnika. U izolovanim glavnim lipoproteinskim frakcijama (VLDL, LDL i HDL) izmerene su vrednosti AOPP u cilju procene nivoa oksidativnog stresa kao i koncentracije PON1 i PON3 za procenu antioksidativne zaštite. Dobijeni rezultati su upoređeni između ispitivanih grupa, kao i između lipoproteinskih frakcija. Koncentracije pentraksina-3, zajedno sa MMP-9, TIMP-1 i galektinom-3 su analizirane u grupi pacijenata sa HBB, pacijenata na dijalizi i kod zdravih ispitanika. U sledećem koraku koristeći binarnu logističku regresionu analizu, ispitivane su prediktivne sposobnosti pojedinačnih parametara (pentraksina-3, galektina-3, MMP-9, TIMP-1, jačine glomerularne filtracije) kao i kombinacije više različitih parametara u cilju procene kardiovaskularnog rizika. Dijagnostička tačnost kombinacija ovih parametara je proveravana primenom ROC analize (eng. *receiver operating characteristic curve*), a površina ispod krivih je bila mera tačnosti ispitivanih parametara u identifikovanju bubrežnih pacijenata sa povećanim rizikom za razvoj KVB. Spearmanova korelaciona analiza je korišćena za ispitivanje povezanosti galektina-3, pentraksina-3, MMP-9 i TIMP-1 sa biohemijskim parametrima, parametrima oksidativno-stresnog statusa i parametrima koji

opisuju status enzima PON1. Uzimajući u obzir prethodne rezultate koji ukazuju da kod pacijenata sa HBB i pacijenata na dijalizi postoje brojne promene u parametrima lipidnog statusa, oksidativnom stresu i antioksidativnoj zaštiti, kao i u nivou inflamacije u daljoj analizi su predstavljeni zbirni efekti više različitih faktora rizika preračunavanjem najpre pojedinačnih skorova kao što su skor dislipidemije (DS), oksidativno-stresni skor (OS) i inflamatorni skor (IS), a potom i zbirnog DOI skora.

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

## **B. Opis dobijenih rezultata**

Pacijenti sa oštećenom funkcijom bubrega i kontrolna grupa bili su usklađeni po polu i ITM, dok je prosečna starost pacijenata bila veća u odnosu na zdrave ispitanike. Kada su u pitanju parametri lipidnog statusa, pacijenti sa HBB i pacijenti na hemodijalizi imali su značajno nižu koncentraciju HDL-h u odnosu na kontrolnu grupu, dok se vrednosti TG, LDL-h, i UH nisu razlikovale. Nakon statističke analize dobijenih rezultata, nije uočena razlika u HDL dijametru između zdravih ispitanika i bubrežnih bolesnika. Izmeren relativni udeo većih HDL2 subfrakcija je bio viši kod kontrolne grupe, što je dovelo i do razlike u odnosu HDL2/HDL3 subfrakcija, pri čemu su više vrednosti zabeležene kod zdravih ispitanika.

U daljoj analizi ispitivanjem razlike u eritrocitnim parametrima između zdravih ispitanika i bubrežnih pacijenata sa različitim stepenom oštećenja bubrega, dobijene su značajno niže vrednosti Hb-h u obe grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, dok je s druge strane RBC-Mh bio povišen kod dijaliznih pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom. Ispitivanjem uticaja LDL fenotipa na nivo eritrocitnih parametara, dobijene su statistički značajno više vrednosti Hb-h kod zdravih ispitanika u odnosu na pacijente sa LDLA fenotipom. Takođe značajno više vrednosti Hb-h, pronađene su kod zdravih kontrola sa LDLB fenotipom u poređenju sa bubrežnim pacijentima koji imaju LDL B fenotip. S druge strane vrednosti methemoglobina su bile više kod pacijenata sa LDL B fenotipom u poređenju sa zdravim ispitanicima koji su imali isti fenotip, dok nije bilo razlike između kontrolne grupe i pacijenata sa LDLA fenotipom. Vrednosti RBC-Mh su bile više kod bubrežnih pacijenata sa LDLB fenotipom, u odnosu na zdrave ispitanike koji su imali isti fenotip.

Rezultati ispitivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu pokazali su značajno više vrednosti TOS kod pacijenata sa HBB i dijaliznih pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Slično i koncentracija TBARS je bila viša kod obe grupe pacijenata, dok je koncentracija AOPP pokazala značajno više vrednosti kod dijaliznih

pacijenata u odnosu na zdrave. S druge strane, TAS je bio značajno viši kod pacijenata sa HBB i dijaliznih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, dok je koncentracija ukupnih SH grupa bila snižena u obe grupe pacijenata. Poređenjem po LDL fenotipu, vrednosti TOS i TBARS su bile značajno više kod pacijenata sa LDLA fenotipom u poređenju sa kontrolnom grupom koja je imala isti fenotip. Rezultati su pokazali i da bubrežni bolesnici kako sa LDLA, tako i sa LDLB fenotipom imaju viši nivo totalnog antioksidativnog statusa od kontrolne grupe sa istim fenotipom, dok su s druge strane, zdravi ispitanici sa LDLA fenotipom imali značajno višu koncentraciju ukupnih SH grupa nego odgovarajuća grupa pacijenata.

Statistički značajno niža paraoksonazna i arilesterazna aktivnost izmerena je kod pacijenata sa HBB i pacijenata na hemodijalizi u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, kod pacijenata koji su na redovnoj terapiji hemodijaliznom primećena je značajno niža paraoksonazna aktivnost enzima PON1 u odnosu na pacijente sa HBB. Poređenjem vrednosti koncentracije enzima PON1 i PON3 utvrđene su značajno niže koncentracije enzima kod obe grupe ispitivanih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, kod pacijenata na terapiji hemodijalizom izmerena je značajno niža koncentracija PON3 u odnosu na pacijente sa HBB. Određivanjem relativnog udela aktivnosti PON1 na pojedinačnim HDL2 i HDL3 subfrakcijama, utvrđeno je da relativni udeo aktivnost PON1 bio značajno manje zastupljen na HDL2 subklasama bubrežnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike. Nakon statističke obrade podataka, ustanovljeno je da je arilesterazna aktivnost PON1 bila statistički značajno niža kod bubrežnih bolesnika i na HDL2 i na HDL3 subklasama, iz čega proizilazi da je i odnos aktivnosti PON1 na HDL2 i HDL3 subklasama bio smanjen kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, utvrđeno je da nakon dijalize dolazi do značajnog povećanja paraoksonazne aktivnosti PON1, dok je arilesterazna aktivnost PON1 bila niža posle dijalize. Značajno niža koncentracija PON1 izmerena je kod bubrežnih bolesnika u HDL lipoproteinskoj frakciji u odnosu na kontrolnu grupu, dok se vrednosti izmerene u ostalim lipoproteinskim frakciji nisu razlikovale između pacijenata i zdravih. Poređenjem lipoproteinskih frakcija, koncentracija AOPP je bila najviša u VLDL česticama u odnosu na ostale lipoproteinske čestice u svim analiziranim grupama. Kao što je i očekivano, u svim posmatranim grupama, koncentracije PON1 i PON3 su bile više na HDL lipoproteinskoj frakciji u poređenju sa VLDL frakcijama. Koncentracija inflamatornog markera-pentraksina-3 je bila statistički značajno viša kod bubrežnih bolesnika u poređenju sa zdravim ispitanicima. Koncentracija galektina-3 je bila značajno viša u kontrolnoj grupi nego kod bubrežnih bolesnika, posebno u poređenju sa pacijentima na hemodijalizi. Koncentracije MMP-9 i

TIMP-1 bile značajno više kod bolesnika sa različitim stepenom oštećenja bubrega u odnosu na zdrave ispitanike. Nakon statističke analize podataka uočeno je da su vrednosti skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora, inflamatornog i zbirnog DOI skora bile značajno povišene kod bubrežnih bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike. ROC analiza je pokazala da skor dislipidemije, oksidativno-stresni skor i inflamatorni skor imaju odličnu sposobnost da razlikuju pacijente sa bubrežnom bolešću od zdravih ispitanika, dok je DOI skor kao zbir svih pomenutih skorova, pokazao izvanrednu sposobnost u razdvajanju pacijenata sa oštećenom funkcijom bubrega od zdravih ispitanika.

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

Brojna istraživanja su pokazala da dislipidemija, oksidativni stres i inflamacija dovode do strukturnih, a samim tim i do funkcionalnih promena na HDL česticama. Naši rezultati su potvrdili prethodna istraživanja Alabakovske i saradnika koja ukazuju da je distribucija HDL subklasa pomerena u pravcu malih gustih HDL3 čestica kod pacijenata sa oštećenom funkcijom bubrega (1). Ovi rezultati su u saglasnosti sa ranijim literaturnim podacima koji su pokazali da kod pacijenata sa hroničnom bolešću bubrega, posebno kod pacijenata na hemodijalizi postoji problem u maturaciji HDL čestica, uzimajući u obzir značajno sniženu aktivnost enzima lecitin-holesterol aciltransferaze (LCAT). Pored toga, prethodne studije su pokazale da kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega, postoji i povišena aktivnost enzima holesterol estar transfernog proteina (CETP), što može biti još jedan razlog povećanom relativnom udelu HDL3 subklasa (2, 3).

*In vitro* studije su pokazale da se holesterol može transportovati preko membrana eritrocita u slučaju otežanog reverznog transporta holesterola (4). U toku ove studije pronađeno je da u membrani eritrocita bubrežnih bolesnika postoji značajno niža koncentracija RBC-Mh za koji se smatra da aktivno učestvuje u alternativnom putu reverznog transporta holesterola. Prethodne studije su pokazale da eritrociti učestvuju i u privremenom uklanjanju slobodnog holesterola iz cirkulacije tako što grade Hb-h kompleks (5). U skladu sa tim, značajno niža koncentracija Hb-h u eritrocitima bubrežnih bolesnika ukazuje da eritrociti pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega imaju lošiji "puferski" kapacitet za privremeno uklanjanje potencijalno štetnog viška holesterola iz krvi. U toku daljeg ispitivanja, pronađena veća koncentracija RBC-Mh kod bubrežnih bolesnika sa LDL B fenotipom može biti posledica proaterogenog profila koji je prisutan kod ovih pacijenata (6). Povišena koncentracija metHb u grupi bubrežnih bolesnika sa LDL B fenotipom može se javiti kao posledica povećane lipidne peroksidacije koja je prisutna u ovoj podgrupi (6).

Povišen nivo oksidativnog stresa kod pacijenata sa HBB i kod pacijenata na dijalizi u skladu je sa prethodnim studijama, koje ukazuju da je pored disbalansa u redoks statusu, prisutan i smanjen klirens prooksidativnih supstanci (7). Dobijeni rezultati za TBARS i TOS su pokazali da čak i pacijenti sa dominantno prisutnim povoljnijim LDLA fenotipom imaju povećan nivo TOS i TBARS u poređenju sa zdravim ispitanicima sa istim fenotipom. Ovakav rezultat je u skladu sa prethodnim studijama gde je kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega takođe izmeren viši stepen lipidne peroksidacije i posledično viši nivo oksidativnog stresa bez obzira na fenotip koji je prisutan (8). S druge strane, značajno niže vrednosti ukupnih SH grupa kod pacijenata sa LDLA fenotipom u odnosu na zdrave ispitanike sa istim fenotipom, su posledica povišenog nivoa TOS u grupi pacijenata koji može biti razlog za povećanu potrošnju ukupnih SH grupa (9).

Snižena aktivnost PON1 enzima u serumu obe grupe pacijenata, nedvosmisleno ukazuje na smanjenu sposobnost HDL čestica da učestvuju u sprečavanju oksidativne modifikacije lipoproteina i ćelijske membrane. U prilog ovome govori i snižena specifična aktivnost PON1 koja je zabeležena u obe grupe pacijenata. Prethodne studije su pokazale da oksidativni stres i inflamacija zajedno sa određenim uremijskim toksinima mogu promeniti sastav HDL čestica, što posledično dovodi do smanjenja aktivnosti PON1 kod bubrežnih pacijenata (10,11). Pored strukturalnih promena HDL čestica snižena paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 se objašnjavaju i sniženom koncentracijom apoA-I koji je odgovoran za stabilizaciju aktivnosti PON1 (12). Pored svega navedenog, arilesterazna aktivnost PON1 je bila znatno niža i na HDL2 i na HDL3 subfrakcijama kod pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima (13). Ovakav rezultat je u skladu sa ranijim literaturnim podacima koji ukazuju da promene u strukturi HDL2 i HDL3 čestica, značajno utiču na aktivnost PON1 (14, 15). Pored snižene aktivnosti PON1, snižena koncentracija u grupi pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike prema Lucher i saradnicima, može biti rezultat smanjene sinteze PON1 proteina u jetri koja nastaje delimično kao posledica inhibitornog efekta uremijskih toksina (16). Mali broj studija se bavio promenama na nivou PON3 kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega. Prethodno istraživanje na životinjama je pokazalo da nedostatak PON3 dovodi do povišenog nivoa superoksidnog anjona na nivou mitohondrija, zatim do povećane ekspresije proinflamatornih gena i posledično do povećanog stvaranja aterosklerotskih lezija (17). Tako da snižena koncentracija PON3 pronađena u obe ispitivane grupe pacijenata takođe može biti potencijalni razlog za povišen nivo oksidativnog stresa kod pacijenata sa HBB i pacijenata na hemodijalizi. Analiza distribucije PON1 aktivnosti na HDL subklasama je pokazala da nakon hemodijalize postoji znatno veći



procenat PON1 aktivnosti na HDL2a česticama. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa studijom Gugliucci i saradnika, koji su pronašli da povećano prisustvo PON1 aktivnosti na HDL2 česticama zapravo odražava poboljšano sazrevanje ovih čestica koje se intenzivnije odvija nakon hemodijalize (18).

Ova studija je pokazala da su HDL frakcije bubrežnih bolesnika značajno oslabljene u pogledu antioksidativne zaštite s obzirom na to da je koncentracija PON1 unutar izolovanih HDL frakcija bila niža u grupi pacijenata. Takođe značajna pozitivna korelacija između koncentracije AOPP u HDL frakciji i relativne distribucije HDL3 subfrakcija ukazuje na strukturne promene unutar HDL3 subfrakcija kod pacijenata sa HBB i kod pacijenata na dijalizi. Ovakav rezultat predstavlja direktan dokaz promenjene strukture HDL čestica, koji prema nalazima prethodnih studija nastaje usled međusobne interakcije inflamacije, oksidativnog stresa i uremijskih toksina koji su u velikoj meri prisutni kod bubrežnih bolesnika bez obzira na stepen oštećenja funkcije bubrega (19). Analizom oksidativno-stresnog statusa unutar glavnih lipoproteinskih klasa utvrđeno je da je koncentracija AOPP bila najveća u VLDL frakciji kada se upoređi sa LDL i HDL frakcijom u svim grupama. Ovakav rezultat je u skladu sa prethodnim studijama koje ukazuju da polinezasićene masne kiseline u VLDL frakcijama daju velike količine lipidnih peroksida, koji mogu dovesti do oksidacije proteina unutar VLDL frakcija (20). Povišena koncentracija AOPP u LDL frakciji, u odnosu na HDL u svim posmatranim grupama ukazuje na povećanje oksidativne modifikacije apoB-100 u LDL česticama (21).

U našoj studiji obe grupe pacijenata su imale veću koncentraciju pentraksina-3 u odnosu na zdrave ispitanike, pri čemu su najviše vrednosti bile prisutne kod pacijenata na dijalizi. U skladu sa prethodnim studijama pretpostavljamo da prisustvo uremijskih toksina, oksidativnog stresa i dislipidemije kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega može biti okidač za pojačano stvaranje pentraksina-3 što dovodi do kontinuirane sistemske inflamacije niskog stepena (22). Takođe, Rusnati i saradnici su ukazali na povezanost ekspresije pentraksina-3 sa procesom reorganizacije matriksa i angiogeneze (23). Naime, pored inflamacije, prethodne studije su pokazale da i oksidativni stres ima bitnu ulogu u indukciji ekspresije gena i sintezi enzima MMP-9 (23, 24). Naime, pokazano je da oksidativni stres pored toga što stimuliše sintezu enzima, utiče i na oksidaciju sulfhidrilnih grupa unutar enzima i tako aktivira MMP (25). Imajući u vidu da su rezultati naše studije nedvosmisleno pokazali da ispitivani pacijenti bez obzira na stepen oštećenja funkcije bubrega imaju visok nivo i oksidativnog stresa i inflamacije, može se pretpostaviti da su upravo ovi procesi odgovorni za povećane koncentracije MMP-9 i TIMP-1. Pored ravnoteže MMP i TIMP, koja

je direktno odgovorna za regulaciju degradacije ekstracelularnog matriksa, određene studije ukazuju da je galektin-3 takođe bitan činilac u ovom procesu (26). U studiji sprovedenoj na životinjskim modelima, težina fibroze uretre je bila značajno povećana kod miševa koji su imali nedostatak gena za galektin-3 (27). Pored toga, intracelularni galektin-3 sprečava apoptozu, tako što u citoplazmi inhibira aktivaciju kaspaza. Uzimajući u obzir sve ove činjenice, smanjena koncentracija galektina-3 kod pacijenata na dijalizi može ukazati na povećanje apoptotičkih procesa, što dovodi do dubljeg oštećenja bubrega (27). Pored uloge u preuređenju ekstracelularnog matriksa, prethodne studije su pokazale da galektin-3 posreduje u preuzimanju oksidovanog LDL-h (28). S obzirom na to da su male guste LDL čestice podložnije oksidaciji, bilo je očekivano da postoji veza između galektina-3 i LDL dijametra, što je tokom naše studije i potvrđeno. Mali broj studija se bavio ispitivanjem povezanosti između galektina-3 i parametara lipidnog statusa, posebno kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega.

DOI skor, kao zbir skora dislipidemija, oksidativno-stresnog skora i inflamatornog skora predstavlja model preračunavanja aditivnog dejstva različitih, ali međusobno povezanih faktora rizika. Veglia i saradnici (29) su predložili proračun za oksidativno-stresni skor na osnovu standardizovanih vrednosti parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite što je poslužilo kao osnova za konstruisanje ovog skora. Kao što je i očekivano, svi pojedinačni skorovi, kao i zbirni DOI skor bili su značajno viši kod bubrežnih bolesnika u poređenju sa zdravim ispitanicima, što ukazuje da se DOI skor može koristiti da prikaže ukupan efekat različitih faktora rizika koji su uključeni kako u progresiju bubrežne bolesti, tako i u razvoj ateroskleroze kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega. Takođe, rezultati ove studije su pokazali da je vrednost DOI skora najveća u grupi pacijenata na dijalizi, što ukazuje na najjaču interakciju između dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije upravo kod pacijenata sa terminalnom bubrežnom insuficijencijom.

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

Hronična bolest bubrega predstavlja stanje koje se karakteriše brojnim tradicionalnim i netradicionalnim faktorima rizika za razvoj KVB, pri čemu je dokazano da dislipidemija, oksidativni stres i inflamacija zahvaljujući međusobnim interakcijama i aditivnom dejstvu predstavljaju faktore koji značajno doprinose nastanku i progresiji ateroskleroze (30).

Pored kvantitativnih promena u nivou lipoproteina, dislipidemija kod pacijenata sa HBB se karakteriše i promenama u strukturi i funkciji lipoproteinskih čestica. Povišen relativni udeo malih gustih HDL3 čestica, pronađen kod pacijenata sa HBB i kod pacijenata

na dijalizi, ukazuje na poremećaj u sintezi i sazrevanju, što se nedvosmisleno odražavana ulogu ovih čestica u reverznom transportu holesterola. Upravo iz ovih razloga, imajući u vidu smanjenu koncentraciju i neadekvatnu ulogu HDLčestica, ova studija se prvi put bavila ispitivanjem RBC-Mh i Hb-h čija se vrednost povezuje sa alternativnim putem transporta holesterola putem eritrocita. Snižen relativni udeo Hb-h i povećan relativni udeo RBC-Mh kod pacijenata sa hroničnom bolešću bubrega i kod pacijenata na dijalizi otvara mogućnost daljeg ispitivanja reverznog transporta holesterola posredovanog eritrocitima. Ova studija se prvi put bavila i poređenjem bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa LDLA, odnosno LDLB fenotipom, pri čemu je utvrđeno da bez obzira na LDL fenotip pacijenti imaju povećan nivo holesterola u membrani eritrocita i snižen nivo holesterola vezanog za hemoglobin.

Povišen nivo oksidativnog stresa koji posledično dovodi do lipidne peroksidacije i oksidacije proteina kod pacijenata sa HBB i pacijenata na dijalizi, u ovoj studiji je dokazan visokim vrednostima TBARS, AOPP i TOS. S druge strane, snižena koncentracija ukupnih –SH grupa reflektuje snižen nivo antioksidativne zaštite kod pacijenata sa oštećenom funkcijom bubrega. Poređenjem bubrežnih bolesnika i zdravih ispitanika sa LDLA, odnosno LDLB fenotipom, utvrđeno je da bez obzira na prisustvo LDL fenotipa pacijenti imaju povišene parametre oksidativnog stresa. Takođe, vrednosti parametara oksidativnog stresa su bile više kod pacijenata sa proaterogenim LDLB fenotipom u odnosu na pacijente sa LDLA fenotipom.

Kvantitativne i kvalitativne promene na HDL česticama, kao i prisustvo uremijskih toksina dovode do smanjene paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1 u serumu, što je praćeno niskom koncentracijom PON1 i PON3 kod pacijenata sa hroničnom bolešću bubrega, posebno kod pacijenata na dijalizi. U prilog promenjenoj strukturi i smanjenoj antioksidativnoj ulozi HDL čestica govori i značajno niža koncentracija PON1 u izolovanim HDL frakcijama bubrežnih bolesnika. U ovoj studiji je po prvi put analizirana distribucija enzima PON1 između različitih HDL subklasa zajedno sa arilesteraznom aktivnošću PON1 na HDL2 i HDL3 subklasama, pri čemu je utvrđeno da postoji značajno veća zastupljenost PON1 aktivnosti na HDL3 subklasi pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima, dok je arilesterazna aktivnost PON1 bila značajno niža i na HDL2 i na HDL3 subfrakcijama kod pacijenata sa hroničnom bolešću bubrega i kod pacijenata na dijalizi u poređenju sa zdravim ispitanicima. Proces hemodijalize je pokazao pozitivan uticaj na paraoksonaznu aktivnost PON1 kao i na relativni udeo PON1 aktivnosti na HDL2a subfrakciji koje su bile značajno više neposredno posle tretmana dijalizom. S druge strane, arilesterazna aktivnost PON1 u

serumu je bila značajno snižena, što se odrazilo i na aktivnost PON1 na HDL2 i HDL3 subfrakcijama koje su takođe bile niže posle tretmana dijalizom.

Povišen nivo inflamacije prisutan kod pacijenata sa HBB, posebno kod pacijenata na dijalizi odražava se kroz povišene vrednosti pentraksina-3.

Intenzivan proces remodelovanja ECM, koji se dešava usled povrede tkiva bubrega, je potvrđen kroz povišene koncentracije MMP-9, TIMP-1 i galektina-3, pri čemu neadekvatna kontrola ovog procesa u uslovima povišenog oksidativnog stresa može doprineti progresiji bolesti bubrega, posebno kod pacijenata na dijalizi gde su promene ovih parametara bile posebno izražene.

S obzirom na činjenicu da bubrežni pacijenti imaju više tradicionalnih i netradicionalnih faktora rizika koji doprinose razvoju ateroskleroze, potencijalna klinička upotreba izračunatog DOI skora, ogleda se u većoj osetljivosti zbirnog DOI skor u odnosu na pojedinačne parametre koji se koriste za njegovo izračunavanje. Posebno je važno istaknuti, upotrebu ovog skora u otkrivanju malih razlika između bubrežnih bolesnika u pogledu rizika od KVB. Pored toga, izračunavanje skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora i skora inflamacije može biti korisno u proceni koji proces je dominantno prisutan u grupi pacijenata i samim tim može služiti kao vodič za dalje preventivne mere, koje treba primeniti kako bi se smanjili različiti kardiovaskularni faktori rizika.

#### **Literatura:**

1. Alabakovska SB, Todorova BB, Labudovic DD, Tosheska KN. LDL and HDL subclass distribution in patients with end-stage renal diseases. *Clin Biochem.* 2002; 35: 211–216.
2. Kaysen GA. Dyslipidemia in chronic kidney disease: Causes and consequences. *Kidney International* 2006; 70:55-58.
3. Pahl MV, Ni Z, Sepassi L, Moradi H. Vaziri ND. Plasma phospholipid transfer protein, cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyltransferase in end-stage renal disease (ESRD). *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2541–2546.
4. Hung KT, Berisha SZ, Ritchey BM, Santore J, Smith JD. Red blood cells play a role in reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32:1460-5.
5. Nikolic M, Stanic D, Antonijevec N, Niketic V. Cholesterol bound to hemoglobin in normal human erythrocytes: a new form of cholesterol in circulation? *Clin Biochem.* 2004; 37:22–6.

6. Bowden RG, Wilson RL, Beaujean AA. LDL particle size and number compared with LDL cholesterol and risk categorization in end-stage renal disease patients. *J Nephrol.* 2011; 24:771-777.
7. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009; 46:241-81.
8. Vekic J, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Topic A, et al. Association of oxidative stress and PON1 with LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur J Clin Invest.* 2007; 37:715–23.
9. Elshamaa MF, Sabry S, Nabih M, Elghoroury EA, El-Saaied GS, Ismail AAG. Alteration in plasma total antioxidant capacity, cardiotoxic lipid peroxidation product and C-reactive protein: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in children on hemodialysis. *J Clin Basic Cardiol.* 2008; 11:2-7.
10. Florens N, Calzada C, Lyasko E, Juillard L, Soulage CO. Modified lipids and lipoproteins in chronic kidney disease: A new class of uremic toxins. *Toxins.* 2016; 8:376.
11. Holzer M, Schilcher G, Curcic S. Dialysis modalities and HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26:2267-2276.
12. Soran H, Schofield JD, Durrington PN. Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol.* 2015; 6:222.
13. Honda H, Hirano T, Ueda M, Kojima S, Mashibada S, Hayase Y, Michihata T, Shibata T. High-density lipoprotein subfractions and their oxidized subfraction particles in patients with chronic kidney disease. *J Atheroscler Thromb* 2016; 23:81-94.
14. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billeckes, La Du BN. Human Serum paraoxanase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: Apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:2214–25.
15. Carnuta MG, Stancu CS, Toma L, Sanda GM, Niculescu LS, Deleanu M, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients. *Sci Rep.* 2017; 7: 7295.

16. Luscher TF, Landmesser U, von Eckardstein A, Fogelman AM. High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circ Res*. 2014;114:171-82
17. Schweikert EM, Devarajan A, Witte I, et al. PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. *Cell Death Differ*. 2012; 19:1549-60.
18. Gugliucci A, Kinugasa E, Ogata H, Caccavello R, Kimura S. Activation of paraoxonase 1 after hemodialysis is associated with HDL remodeling and its increase in the HDL2 fraction and VLDL. *ClinChimActa*. 2014; 430:9-14.
19. Holzer M, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, El-Gamal D, Binder V, Wadsack C, Heinemann A, Marsche G. Uremia alters HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22:1631-1641.
20. Poirier B, Michel Ofz, Bazin R, et al. Conjugated dienes: a critical trait of lipoprotein oxidizability in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16:1598-1606.
21. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, et al. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*. 2017; 132: 19-27.
22. Yilmaz MI, Sonmez A, Ortiz A, et al. Soluble TWEAK and PTX3 in nondialysis CKD patients: impact on endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011; 6:785-92.
23. Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, *et al*. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood*. 2004; 104:92-9.
24. Bahrehmand F, Vaisi-Raygani A, Kiani A, *et al*. Matrix metalloproteinase 9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress. *Lupus*. 2015; 24:597-605.
25. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 2003;200(4):448-64
26. Domic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760:616-35
27. Okamura D, Pasichnyk K, Lopez-Guisa JM, *et al*. Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300:245-53

28. Tian L, Chen K, Cao J, et al. Galectin-3-induced oxidized low-density lipoprotein promotes the phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells. *Molecular Medicine Reports*. 2015;12:4995-5002
29. Veglia F, Werba JP, Tremoli E, Squellerio I, Sisillo E, Parolari A, Minardi F, Cavalca V. Assessment of oxidative stress in coronary artery bypass surgery: comparison between the global index OXY-SCORE and individual biomarkers. *Biomarkers*. 2009;14:465-72
30. Vaziri ND. Role of dyslipidemia in impairment of energy metabolism, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18:265-268

## **E. Objavljeni rezultati koji čine deo doktorske disertacije**

1. **Milica Miljković**, Jelena Kotur-Stevuljević, Aleksandra Stefanović, Aleksandra Zeljković, Jelena Vekić, Tamara Gojković, Nataša Bogavac-Stanojević Milan Nikolić, Sanja Simić-Ogrizović, Vesna Spasojević-Kalimanovska, Zorana Jelić-Ivanović. Oxidative stress and hemoglobin-cholesterol adduct in renal patients with different LDL phenotypes. *International urology and nephrology* 2016; 48:1683-1690 (IF 1,692; rang časopisa M23 (54/77) u kategoriji Urology and Nephrology)
2. **Milica Miljković**, Aleksandra Stefanović, Nataša Bogavac-Stanojević, Sanja Simić-Ogrizović, Jerka Dumić, Darko Černe, Zorana Jelić-Ivanović, Jelena Kotur-Stevuljević. Association of Pentraxin-3, Galectin-3 and Matrix Metalloproteinase-9/TIMP-1 with Cardiovascular Risk in Renal Disease Patients. *Acta Clinica Croatica* 2017; 56: 673-680 (IF 0,452; rang časopisa M23 (139/154) u kategoriji Medicine, General & Internal)
3. **Milica Miljković**, Aleksandra Stefanović, Sanja Simić-Ogrizović, Jelena Vekić, Nataša Bogavac-Stanojević, Darko Černe, Petra Kocbek, Janja Marc, Zorana Jelić-Ivanović, Vesna Spasojević-Kalimanovska, Jelena Kotur-Stevuljević. Association of dyslipidemia, oxidative stress, and inflammation with redox status in VLDL, LDL, and HDL lipoproteins in patients with renal disease. *Angiology* 2018;2018:1-10 (IF 3,022; rang časopisa M22 (25/65) u kategoriji Peripheral Vascular Disease)



## **F. Mišljenje i predlog**

Na osnovu svega izloženog smatramo da ova doktorska disertacija predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Istraživanje međusobne povezanosti i uticaja koji dislipidemija, oksidativni stres i inflamacija ostvaruju na lipoproteinske čestice predstavlja prvo kliničko ispitivanje aditivnog efekta ovih procesa kod pacijenata sa hroničnom bolešću bubrega i kod pacijenata na dijalizi. Rezultati ove doktorske disertacije doprinose boljem razumevanju uloge koju promenjene lipoproteinske čestice imaju u nastanku kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega. Rezultati ove doktorske disertacije publikovani su u tri rada u međunarodnim časopisima kategorije M22 (jedan rad) i M23(dva rada).

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 "**Oksidativno-stresni status u krvi i lipoproteinskim frakcijama pacijenata sa hroničnom bolešću bubrega** ", kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Miljković Milice.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

---

Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević, mentor  
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Prof.dr Darko Černe  
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Ljubljani

---

Prof. dr Aleksandra Stefanović  
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Doc. dr Jelena Vekić  
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Prof. dr Sanja Simić-Ogrizović  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu